

**Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie**  
in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommisarischer Leiter: Prof. Dr. med. Christian Weber  
(vormalige Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum)

**Rolle der Rezeptorkinasen GRK-2 und GRK-3 für die Regulation  
des humanen B<sub>2</sub> Bradykinin Rezeptors**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Benjamin Welte**

aus  
Coburg

2013

mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Alexander Faußner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Schauber  
Priv. Doz. Dr. Maciej Lech  
Priv. Doz. Dr. Ute Wilbert-Lampen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der  
mündlichen Prüfung: 25.04.2013

**für Carina**

<b>A</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
B.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	3
B.2	G-Proteine	5
B.3	Desensibilisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	6
B.4	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs)	7
B.5	Arrestinfamilie	13
B.6	Funktion der GTPase Dynamin	13
B.7	Kallikrein-Kinin System	14
B.8	Kinine	16
B.9	B <sub>1</sub> und B <sub>2</sub> Bradykininrezeptoren	17
B.10	Signaltransduktion des B <sub>2</sub> R	18
B.10.1	MAPK Signalweg	18
B.10.2	Arachidonsäure Signalweg nach Aktivierung des B <sub>2</sub> R	19
B.11	Desensibilisierung und Internalisierung des B <sub>2</sub> R	20
<b>C</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISE</b>	<b>22</b>
<b>D</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
D.1	Material	23
D.1.1	Geräte	23
D.1.2	Chemikalien und Materialien	24
D.1.3	Primer	26
D.1.4	Vektoren	26
D.1.5	Bakterienstamm	27
D.1.6	Säugetierzelllinie	28

D.1.7 Antikörper	28
D.1.8 Puffer	28
D.1.9 Lösungen	29
D.1.10 Computerprogramme	30
D.2 Methoden	30
D.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
D.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30
D.2.1.2 Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR	31
D.2.1.3 Auftrennung von DNA Fragmenten	34
D.2.1.4 Elution von DNA aus dem Agarosegel	34
D.2.1.5 Bestimmung der DNA Konzentration	35
D.2.1.6 Restriktion und Ligation von DNA Fragmente	35
D.2.1.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli-Stämme	37
D.2.1.8 Kolonie-PCR	37
D.2.1.9 Kultivierung von E.coli Stämmen	38
D.2.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	39
D.2.1.11 DNA Sequenzierung	39
D.2.2 Zellbiologische Methoden	39
D.2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen	39
D.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen	40
D.2.2.3 Das Flp – In <sup>TM</sup> T-REx <sup>TM</sup> Expressionssystem	41
D.2.2.4 Transfektion von HEK 293 Zellen	43
D.2.2.4.1 Stabile Transfektion	43
D.2.2.4.2 Transiente Transfektion	44
D.2.3 Proteinbiochemische Methoden	44
D.2.3.1 Lyse der Zellen	44
D.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
D.2.3.3 Proteintransfer (Western-Blot)	45
D.2.3.4 Nachweis von Proteinen mit Antikörper	45
D.2.3.5 Internalisierung von [ <sup>3</sup> H]-Bradykinin	46
D.2.3.6 Messung der Freisetzung von Arachidonsäure	47
D.2.3.7 Phospho-Erk1/2 Assay	47

<b>E</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
E.1	Regulierbare Expression der GRK Mutanten	49
E.2	Einfluss der GRK-2 und GRK-3 auf die Internalisierung des B <sub>2</sub> Rwt	50
E.3	Einfluss der Kinase-inaktiven GRK-2 K220R und GRK-3 K220R auf die Internalisierung des B <sub>2</sub> Rwt	52
E.4	Einfluss der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R auf die Internalisierung ausgewählter B <sub>2</sub> R Mutanten	53
E.5	Einfluss der GRK-2 und GRK-3 Mutanten R106A und R587Q auf die Internalisierung des B <sub>2</sub> Rwt	56
E.6	Einfluss von wtGRK-3 und GRK-3 Mutanten R106A, K220R und R687Q auf das Phospho-ERK1/2 und Total-ERK1/2 Signal	57
E.7	Regulierbare Expression von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A Mutante	59
E.8	Einfluss von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A auf die Internalisierung des B <sub>2</sub> Rwt	59
E.9	Phospho-ERK1/2 und Total-ERK1/2 Signal von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A	61
E.10	Bestimmung der Arachidonsäurefreisetzung nach Stimulation des B <sub>2</sub> R	62
E.11	Arachidonsäurefreisetzung des B <sub>2</sub> Rwt im Vergleich zur B <sub>2</sub> R Mutante R128A	63

<b>F</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
F.1	Spezifität der GRK-2 und GRK-3 für den B <sub>2</sub> R	65
F.2	Abhängigkeit der Internalisierung des B <sub>2</sub> R von der Phosphorylierung durch die GRK-2 und GRK-3	67
F.3	Abhängigkeit der Internalisierung des B <sub>2</sub> R von der G-Proteinaktivierung	70
F.4	Abhängigkeit des ERK1/2 Signalweg von der G-Proteinaktivierung und Phosphorylierung des B <sub>2</sub> R	71
F.5	Zusammenfassung der Signalterminierung des B <sub>2</sub> R durch GRK-2/GRK-3	72
F.6	Rolle von Dynamin-1 für den Bradykininrezeptor B <sub>2</sub> R	74
<b>G</b>	<b>RESÜMEE UND AUSBLICK</b>	<b>76</b>
<b>H</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>I</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>90</b>
<b>J</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>91</b>
<b>K</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>92</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[ <sup>3</sup> H]-BK	Tritium-markiertes Bradykinin
AA	Arachidonsäure
ACE	Angiotensin-converting Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
B <sub>1</sub> R	B <sub>1</sub> -Bradykininrezeptor
B <sub>2</sub> R	B <sub>2</sub> -Bradykininrezeptor
BK	Bradykinin
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CMV	Cytomegalie Virus
COS	etablierte Karzinom-Zelllinie aus der Niere einer afrikanischen Affenart
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat (N = A, T, G, C)
DTT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FRT	Flp recombinase target
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Human embryonic kidney cells
HRP	Horse radish peroxidase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KD	Kallidin



KLK	Kallikrein
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PH	Pleckstrin Homologie Domäne
PKC	Proteinkinase C
PLC- $\beta$	Phospholipase C- $\beta$
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat
RH	<u>R</u> egulator of G-Protein Signaling <u>H</u> omology Domain
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline buffer
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
SEM	Standardfehler
U	Unit
wt	Wildtyp

### Aminosäuren (Ein-und Drei-Buchstaben Code)

A (Ala) Alanin	I (Ile) Isoleucin	R (Arg) Arginin
C (Cys) Cystein	K(Lys) Lysin	S (Ser) Serin
D (Asp) Asparaginsäure	L (Leu) Leucin	T (Thr) Threonin
E (Glu) Glutaminsäure	M (Met) Methionin	V (Val) Valin
F (Phe) Phenylalanin	N (Asn) Asparagin	W (Trp) Tryptophan
G (Gly) Glycin	P (Pro) Prolin	Y (Tyr) Tyrosin
H (His) Histidin	Q (Gln) Glutamin	

## A ZUSAMMENFASSUNG

Der B<sub>2</sub> Bradykinin Rezeptor (B<sub>2</sub>R) gehört zur Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). 30-50% der auf dem Markt erhältlichen Medikamente erzielen ihre Wirkung über GPCRs. Sie sind damit eines der erfolgreichsten Zielsysteme für die pharmakologische Forschung (Drews et al., 2000). Durch antagonistische Blockade des B<sub>2</sub>R wurde seine Beteiligung bei einer Vielzahl von Erkrankungen untersucht, darunter Asthma bronchiale (Akbari et al., 1996), allergische Rhinitis (Turner et al., 2001), Pankreatitis (Asano et al., 1997), Osteoarthritis (Bond et al., 1997), Hirnödem (Marmarou et al., 1999) und Alzheimer (Prediger et al., 2008). Für das lebensbedrohliche seltene hereditäre Angioödem wird seit kurzer Zeit der B<sub>2</sub>R Antagonist Icatibant erfolgreich eingesetzt (Bork et al., 2007; Cicardi et al., 2010). Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass bei der bewährten Behandlung der arteriellen Hypertonie mit ACE (*angiotensin converting enzyme*)-Inhibitoren die Verhinderung der Degradation der Kinine und die daraus resultierende Stimulation des B<sub>2</sub>R eine nicht unerhebliche Rolle spielt (Moreau et al., 2005; Regoli et al., 2012). Der B<sub>2</sub>R stellt somit ein interessantes Ziel für die pharmakologische Forschung dar. Ein umfassenderes Verständnis der genauen molekularen Interaktionen zwischen dem B<sub>2</sub>R und seinen regulatorischen Proteinen, würde die Generierung entsprechender wirkungsspezifischer B<sub>2</sub>R-Liganden wesentlich erleichtern.

Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, die Rolle der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen GRK-2 und GRK-3 im Hinblick auf die Internalisierung und ERK1/2-Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R zu erforschen. Insbesondere sollte die Bedeutung der Kinaseaktivität der GRKs für die Internalisierung und Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R untersucht werden.

In dieser Doktorarbeit wurde zum einen gezeigt, dass die GRK-3 spezifischer als die GRK-2 mit dem B<sub>2</sub>R interagiert. Mit Hilfe einer Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante konnte zum anderen erstmalig belegt werden, dass für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R die Kinaseaktivität der GRK-3 nicht unbedingt notwendig ist. Auch die Fähigkeit der Kinase an die G-Proteinuntereinheiten G<sub>αq/11</sub> und G<sub>βγ</sub> zu binden ist für die Internalisierung des Rezeptors nicht von Bedeutung. Ganz im Gegensatz dazu ist für die Terminierung des ERK1/2 (MAPK) Signals nach Stimulation des B<sub>2</sub>R die

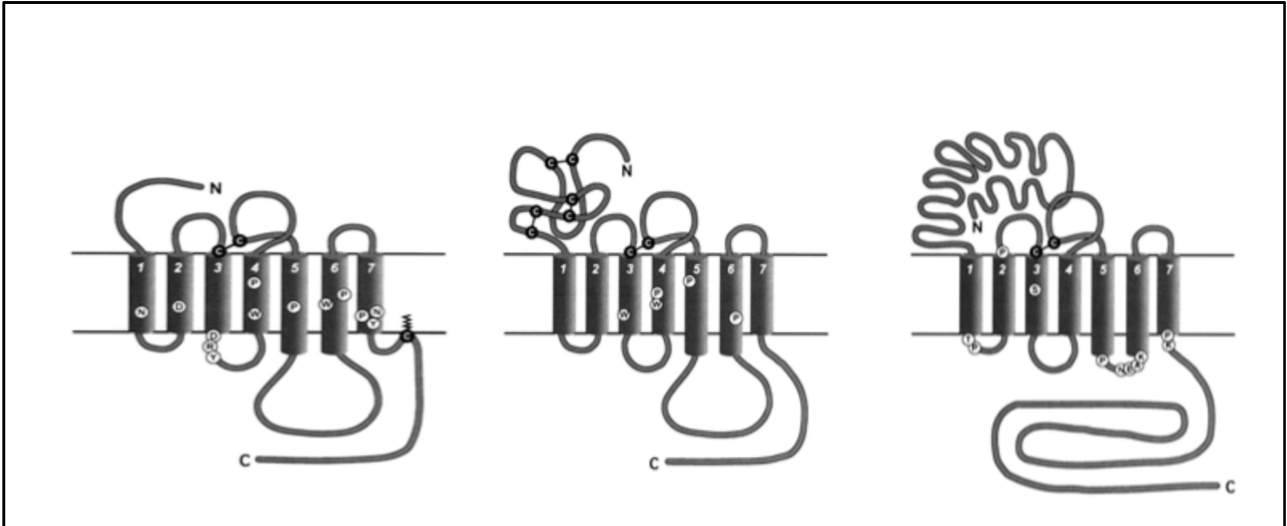
Fähigkeit der GRK-3 zur Bindung an die G-Proteinuntereinheiten  $G_{\alpha q/11}$  und  $G_{\beta\gamma}$  entscheidend, während die Kinaseaktivität der GRK-3 hierfür nicht erforderlich ist. Damit ergibt sich folgendes Modell der Regulation des  $B_2R$ : Die schnelle Abschaltung des ERK1/2-Signals erfolgt über die Rekrutierung von - vor allem - der GRK-3 durch nach der G-Proteinaktivierung freien  $G_{\beta\gamma}$  Untereinheiten und das Abfangen der aktiven  $G_{\alpha q/11}$  Untereinheiten durch Bindung an die RH-Domäne der GRK. Die längerfristige Reduzierung des  $B_2R$  Signals erfolgt über die Internalisierung des  $B_2R$ . Diese kann entweder unabhängig von einer G-Proteinaktivierung oder einer Phosphorylierung direkt vermittelt über GRK-2/-3 (und deren Bindung an *clathrin-coated pits*) erfolgen oder indirekt durch Phosphorylierung des  $B_2R$  C-Terminus durch GRK-2/-3 und anschließender Rekrutierung der Internalisierungs-Adapter-Proteine  $\beta$ -Arrestin 1 und  $\beta$ -Arrestin 2 an die phosphorylierten Rezeptor-Sequenzen. Damit ist die Phosphorylierung des  $B_2R$  nicht unbedingt für seine Internalisierung erforderlich, entscheidet aber möglicherweise über sein weiteres Schicksal bezüglich Recycling oder Degradation.

## B EINLEITUNG

### B.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Durch die Sequenzierung des humanen Genoms im Jahr 2001 wurden circa 720 Gene identifiziert, die zu der Superfamilie der GPCRs (*G Protein-coupled receptors*) gehören (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Von diesen 720 Genen codieren ungefähr 360 Gene für sensorische Rezeptoren. Bei den anderen 360 Genen konnte bei 210 Rezeptoren ein endogener Ligand gefunden werden. Die restlichen 150 Rezeptoren werden als *orphan*-GPCR bezeichnet, da bisher kein entsprechender Ligand und demzufolge oft noch keine Funktion gefunden werden konnte (Wise et al., 2004). Die GPCRs spielen eine bedeutende Rolle in der Pharmakotherapie. 30-50% der auf dem Markt befindlichen Medikamente erzielen ihre Wirkung direkt oder indirekt über GPCRs. Sie sind somit das erfolgreichste Zielsystem für die pharmakologische Forschung (Drews et al., 2000). Für den Menschen konnten bisher vier Kristallstrukturen von inaktiven GPCRs durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor (Rasmussen et al., 2007), der  $A_{2A}$ -Adenosinrezeptor (Jaakola et al., 2008), der Dopamin  $D_3$  Rezeptor (Chien et al., 2010) und der Chemokinrezeptor CXCR4 (Wu et al., 2010). Die Gruppe um Brian Kobilka konnte 2011 erstmalig die Kristallstruktur eines aktiven GPCR mit seinem G-Protein -des aktivierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor mit dem G-Protein  $G_s$  -aufklären (Rasmussen et al., 2011). GPCRs bestehen aus einer einzigen Aminosäurekette von variabler Länge, die sieben Transmembrandomänen und demzufolge drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen bildet. Sie lassen sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen in sechs Familien gliedern. Bei Säugetieren finden sich jedoch nur die Familien A, B und C (Abbildung 1). Die Rezeptoren der Familie A sind dem Rhodopsin und dem  $\beta_2$ -Adrenorezeptor ähnlich. Sie zeichnen sich durch einige hochkonservierte Aminosäuren aus, wie die DRY-Sequenz in der Helix III und das NPxxY-Motiv in der Helix VII. Die Rezeptoren der Familie B zeigen Ähnlichkeiten mit dem Glukagonrezeptor. Charakteristisch für die Familie B sind ein langer N-Terminus und konservierte Cysteine, die wahrscheinlich ein Netzwerk aus Disulfidbrücken bilden. Vertreter der Familie C sind die Glutamaterezeptoren und die

Calciumrezeptoren. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch eine kurze dritte intrazelluläre Schleife und einen langen N-Terminus aus.



**Abbildung 1: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Gether et al., 2000)**

Familie-A-Rezeptoren (links) sind gekennzeichnet durch einige hochkonservierte Aminosäuren sowie die DRY-Sequenz und das NPxxY-Motiv. Zusätzlich findet sich oft ein palmitoyliertes Cystein im C-Terminus. Familie-B-Rezeptoren (Mitte) zeichnen sich durch einen langen N-Terminus und zahlreiche Cysteine aus, die wahrscheinlich Disulfidbrücken untereinander ausbilden. Familie-C-Rezeptoren (rechts) besitzen eine kurze dritte intrazelluläre Schleife und einen langen N-Terminus.

Es gibt neben der Einteilung in die Familie A, B und C auch neuere Systeme um die humanen GPCRs zu klassifizieren. Das Fredriksson-System unterteilt die GPCRs, basierend auf phylogenetischen Untersuchungen, in fünf Gruppen: Die Glutamat-Gruppe, die Rhodopsin-Gruppe, die Adhäsionsgruppe, die Frizzled/Taste2-Gruppe und die Secretin-Gruppe (Fredriksson et al., 2003).

Die Bindung eines Liganden an den GPCR führt über eine Stabilisierung der aktiven Konformation des Rezeptors zur Aktivierung und verschiebt das Gleichgewicht zwischen inaktivem und aktiven Zustand. Handelt es sich um einen Agonisten, so verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung aktiver Zustand. Inverse Agonisten hingegen verschieben das Gleichgewicht in Richtung inaktivem Zustand. GPCRs, die sich auch in Abwesenheit eines Agonisten in einem aktivem Zustand befinden, bezeichnet man als konstitutiv aktiv. Eine konstitutiv aktive Rhodopsin Mutante wird in Verbindung mit der Erkrankung Retinopathia pigmentosa gebracht (Robinson et al., 1992). Führt die Bindung eines Liganden an den GPCR zu unterschiedlicher

Aktivierung von Signalwegen bezeichnet man das als funktionelle Selektivität oder *biased agonism* (Andresen et al., 2011).

## B.2 G-Proteine

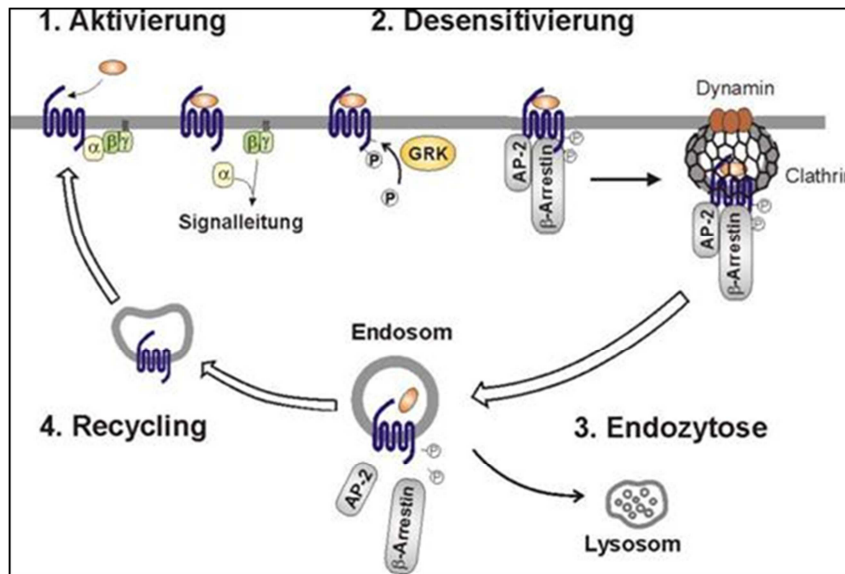
Eine wesentliche Gemeinsamkeit von GPCRs besteht darin, dass es nach der Bindung eines Agonisten zu einer Rekrutierung von heterotrimeren Guaninnucleotid-bindenden Proteinen (G-Proteine) kommt. Deren Aktivierung führt dann zur Signaltransduktion in die Zelle. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen im inaktiven Zustand aus der GDP-beladenen  $\alpha$ -Untereinheit (39-52 kDa), einer  $\beta$ -Untereinheit (35-36 kDa) und einer  $\gamma$ -Untereinheit (7-10 kDa). Von der  $\alpha$ -Untereinheit konnten mehr als 20 verschiedene Formen identifiziert werden (Wess et al., 1998), die sich aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Klassen  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha q/11}$  und  $G_{\alpha 12/13}$  einteilen lassen.

Die Aktivierung von G-Proteinen erfolgt in der Regel durch einen Austauschfaktor GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*). GPCRs werden nach Aktivierung zu einem GEF für die entsprechenden G-Proteine. Dies führt bei der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Protein zu einem Austausch des gebundenen GDP für GTP. Die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert vom Rezeptor und von seiner  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit können nun mit verschiedenen Effektorproteinen interagieren und direkt oder indirekt verschiedene Signalwege beeinflussen, darunter z.B. die Aktivierung bzw. Inhibierung von Adenylatcyclasen, die Aktivierung von Phospholipasen oder die Regulierung von Kaliumkanälen und Calciumkanälen (Hamm et al., 1998). Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, welche das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und die  $\alpha$ -Untereinheit in ihren inaktiven Ausgangszustand versetzt. Dies führt zur Bindung der  $\alpha$ -Untereinheit mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Das so regenerierte G-Protein steht anschließend wieder für eine erneute Aktivierung durch einen GPCR zur Verfügung. Sogenannte GAPs (*GTPase-activating proteins*) können als eigenständige Proteine oder als Domänen größerer Proteinkomplexe die intrinsische GTPase Aktivität stimulieren und somit beschleunigend in den Prozess der Signalabschaltung eingreifen.

### B.3 Desensibilisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Unter der Desensibilisierung versteht man das Abschalten der Signaltransduktion nach der Aktivierung eines Rezeptors (Abbildung 2). Dies ist eine Voraussetzung für eine schnelle Adaptation an neue extrazelluläre Bedingungen. Für die Desensibilisierung spielt den gängigen Modellen zufolge die Phosphorylierung des Rezeptors eine wesentliche Rolle (Sibley et al., 1987). Es gibt unterschiedliche Kinasetypen, welche in die Regulation von GPCRs involviert sind. Zum einen die *second-messenger* Kinasen, wie die Proteinkinase A und C, zum anderen die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK). Die *second-messenger* Kinasen können nach ihrer Aktivierung einen Rezeptor phosphorylieren, unabhängig davon, ob der Rezeptor von einem Agonisten besetzt ist oder nicht. Die Proteinkinase A wird durch cAMP aktiviert, die Proteinkinase C durch Calciumerhöhung und Diacylglycerol. Die Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A und C bezeichnet man als heterologe oder nicht agonistenspezifische Desensibilisierung, wenn sie durch andere Rezeptoren aktiviert werden (Lefkowitz et al., 1998). Im Gegensatz dazu, phosphorylieren die GRKs GPCRs fast ausschließlich nur, wenn der Rezeptor noch an den Agonisten gebunden hat.

Die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten vor allem im C-Terminus eines GPCR durch GRKs führt nach den aktuellen Vorstellungen (Lefkowitz et al., 1998) zur Bindung von  $\beta$ -Arrestinen, welche sterisch die weitere Signaltransduktion der G-Proteine verhindert (Pitcher et al., 1998) und so die schnelle Desensibilisierung des Rezeptors bewirkt (Wilden et al., 1986). Die  $\beta$ -Arrestine vermitteln außerdem die Internalisierung des GPCR durch clathrinbeschichtete Vesikel und Caveolae (Ferguson et al., 1996; Lamb et al., 2001). Außerdem sind bei der Internalisierung Dynamin, Adaptorprotein-2 und Phosphoinositide mitbeteiligt (Laporte et al., 2002; Krupnick et al., 1998; Chini et al., 2004). Anschließend kommt es zur Degradation oder zum Recycling des Rezeptors. Bei der Degradation des Rezeptors soll unter anderem seine Ubiquitinierung eine wesentliche Rolle spielen (Marchese et al., 2003).



**Abbildung 2: Modell der Desensibilisierung von GPCRs (Dissertation Mokros, 2004)**

Der Agonist bindet an den Rezeptor. Dies führt zur Aktivierung (1) und zur Kopplung an das G-Protein. Anschließend kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors vor allem durch GRKs. Die Bindung von  $\beta$ -Arrestin führt zur Verdrängung des G-Protein und damit zur Desensibilisierung des Rezeptors (2). Durch die Interaktion mit Clathrin, Adaptorprotein-2 (AP-2) und Dynamin kommt es zur Endozytose (3) des Rezeptors. Nun kommt es entweder zur Degradation des Rezeptors in Lysosomen oder zu seinem Recycling (4).

#### B.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs)

Die Familie der GRKs umfasst sieben Serin/Threonin Proteinkinasen, welche spezifisch liganden-stimulierte GPCRs phosphorylieren. Diese sieben GRKs werden aufgrund ihrer homologen Sequenzen in drei Subfamilien unterteilt (Reiter et al., 2006). Die Rhodopsinkinasen (GRK-1 und GRK-7), die  $\beta$ -adrenergen Rezeptorkinasen (GRK-2 und GRK-3) und die GRK-4 Kinasen (GRK-4, GRK-5, GRK-6).

Die GRK-1 und GRK-7 werden in den retinalen Zapfen und Stäbchen exprimiert. Geringe Mengen an GRK-1 findet sich noch in der Epiphyse (Lorenz et al., 1991). Die GRK-2,3,4,5 und GRK-6 werden ubiquitär exprimiert. Die GRK-4 lässt sich vor allem im Hoden aber auch im Kleinhirn und in den Nieren nachweisen (Sallese et al., 1997). Die GRK-6 spielt vor allem für die Zellen des Immunsystems eine Rolle.

GRK-2 und GRK-3 werden zwar ubiquitär exprimiert, unterscheiden sich jedoch deutlich in der Expressionsmenge. So soll in den meisten Zellen nur ca. 10-20



Prozent an GRK-3 im Vergleich mit der GRK-2 exprimiert werden (Benovic et al., 1991).

Alle GRKs besitzen eine stark konservierte zentrale katalytische Domäne, flankierend eine N-terminale Domäne (ca. 185 AS) und eine C-terminale Domäne (ca. 105-230 AS) (Abbildung 3). Die katalytische Domäne besteht aus ca. 280 Aminosäuren mit einem zentralen Lysin, welches das ATP bindet. Eine Mutation dieses Lysins zu Arginin führt zu einer Kinase-inaktiven Mutante (Kong et al., 1994). Im Gegensatz zur stark konservierten katalytischen Domäne, unterscheiden sich die GRKs deutlich im N-Terminus und vor allem im C-Terminus. Die aminoterminal Region partizipiert wahrscheinlich bei der Erkennung der GPCRs und ist auch verantwortlich für die Zellmembranverankerung. Diese Domäne besitzt eine Bindungsstelle für  $\text{PIP}_2$  und enthält die RH Domäne (*regulator of G-Protein signaling homology*). Am unterschiedlichsten sind die carboxyterminalen Regionen hinsichtlich Länge, Konservierung und posttranslationalen Modifikationen. Die Rhodopsinkinasen GRK-1 und GRK-7 weisen ein CAAX-Motiv auf, welches posttranslational modifiziert werden kann (Gibbs et al., 1991). Hier wird die GRK-1 farnesyliert, die GRK-7 hingegen wird geranylgeranyliert (Inglese et al., 1992). Die GRK-2 und die GRK-3 besitzen für die Interaktion mit der Zellmembran eine PH Domäne (*pleckstrin homology*). Die C-terminalen Abschnitte der GRK-4 und GRK-6 zeigen posttranslational eine Palmitoylierung von Cysteinresten. Für die GRK-5 sind bisher keine posttranslationalen Modifikationen beschrieben. Hier findet eine Interaktion zwischen einer polybasischen Aminosequenz im C-Terminus mit der Plasmamembran statt (Pronin et al., 1998). Mit Ausnahme der GRK-2 und GRK-3 sind alle GRKs dauerhaft membranassoziiert.

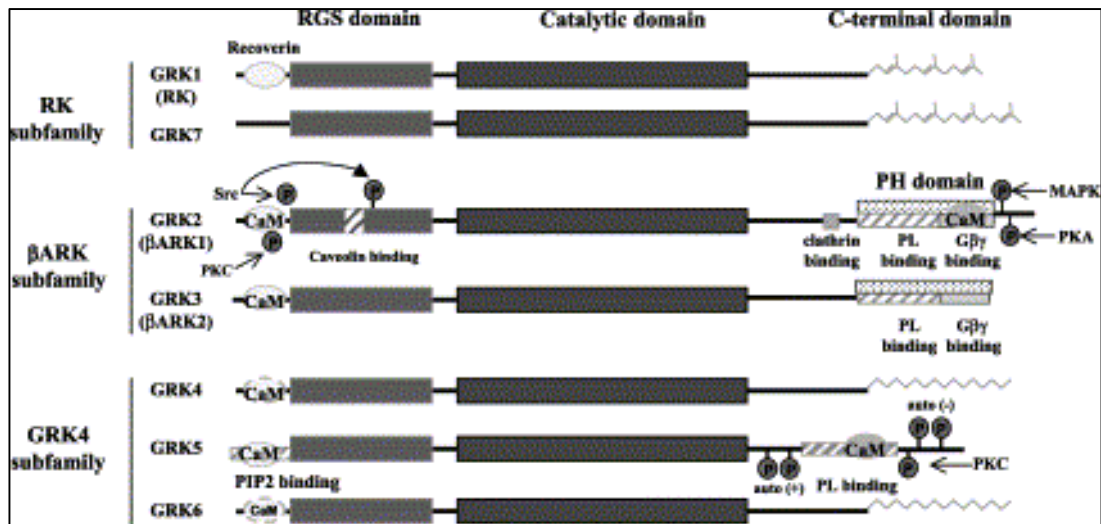
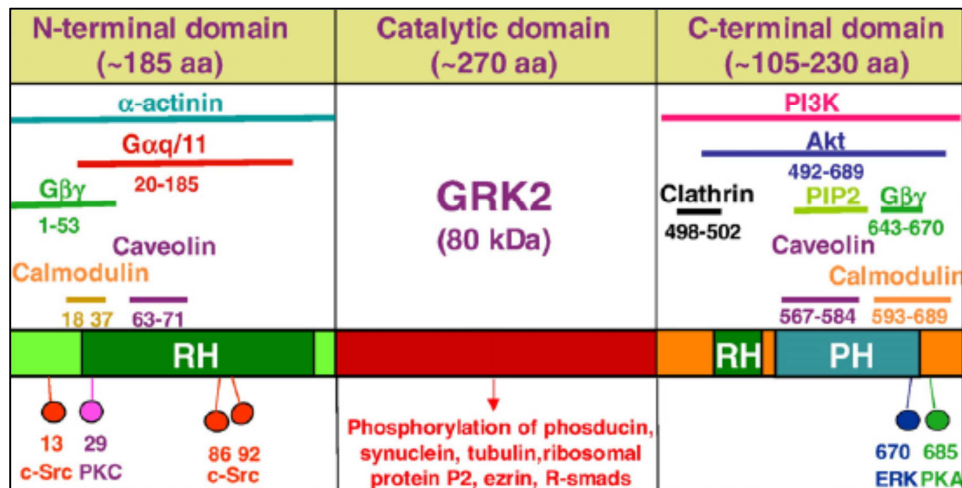


Abbildung 3: Übersicht über die Struktur der GRKs (Penela et al., 2003)

Die GRK-2 und die GRK-3 (Abbildung 4) verfügen über eine RH Domäne im Bereich des N-Terminus. Diese weist eine starke Homologie zu den RGS (*regulator of G-Protein signaling*) Proteinen auf. Diese Proteine sind in der Lage die GTPase Aktivität der  $G_{\alpha}$  Untereinheit zu erhöhen und damit das Signal zu beenden. Über diese RH Domäne ist die GRK-2 und die GRK-3 in der Lage spezifisch mit der G-Proteinuntereinheit  $G_{\alpha q/11}$  zu interagieren und so die Phospholipase C- $\beta$  Aktivität zu inhibieren (Carman et al., 1999). Die GRK-2 und die GRK-3 können über diese RH Domäne an  $G_{\alpha q/11}$ , jedoch nicht an  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha o}$  oder  $G_{\alpha 12/13}$ , binden. Diese Interaktion könnte ein entscheidender Vorgang für die phosphorylierungs-unabhängige Desensibilisierung verschiedener GPCRs sein. Die GRK-Mutationen R106A, D110A, M114A verhindern eine Bindung von GRK-2/-3 an  $G_{\alpha q/11}$  (Sterne-Marr et al., 2003).

Eine weitere Besonderheit der GRK-2 und der GRK-3 (Abbildung 4) ist die PH Domäne (*pleckstrin homology*) im C-terminalen Bereich zwischen AS 648 bis AS 665 (Pitcher et al., 1995). Über diese Domäne erfolgt die Bindung an Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ) und an die  $G_{\beta\gamma}$  Untereinheiten (Koch et al., 1993; Touhara et al., 1995). Durch die Interaktion der PH Domäne mit  $PIP_2$  und  $G_{\beta\gamma}$  erfolgt die Translokation von GRK-2 und GRK-3 an die Plasmamembran (Pitcher et al., 1998). Die GRK-2 und GRK-3 sind ansonsten, im Gegensatz zu den anderen GRKs, cytosolische Proteine. Es gibt Hinweise darauf, dass auch im N-terminalen

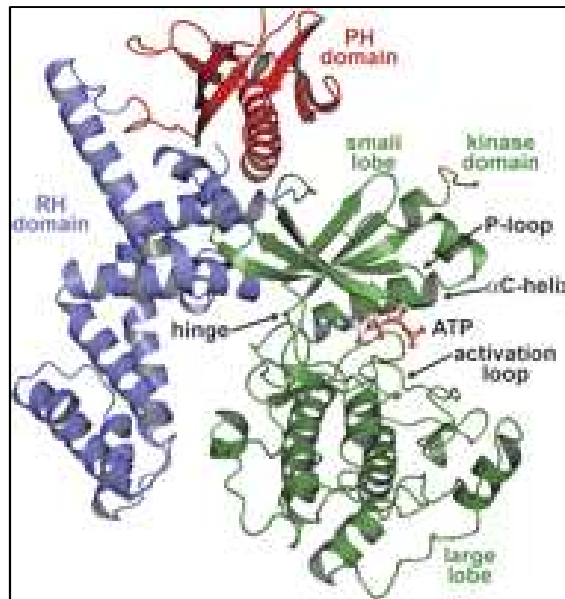
Bereich der GRK-2 eine Bindung an  $G_{\beta\gamma}$  Untereinheiten erfolgen kann (Eichmann et al., 2003). Es ist ungeklärt welche Bindung bevorzugt wird. Eine Punktmutation R587Q in der PH Domäne der GRK-2 bzw. GRK-3 führt zu einem spezifischen Verlust der Fähigkeit an freie  $G_{\beta\gamma}$  G-Proteinuntereinheiten zu binden (Carman et al., 2000).



**Abbildung 4: Die verschiedenen Domänen und Interaktionsstellen der GRK-2 (Ribas et al., 2007)**

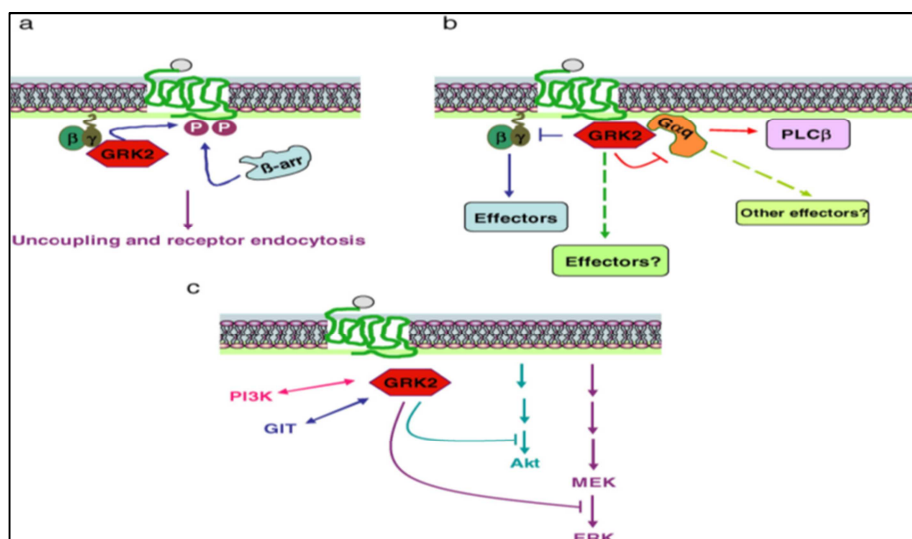
RH Domäne (*regulator of G-Protein signaling homology domain*); PH Domäne (*pleckstrin homology domain*). Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Domänen und Interaktionsstellen finden sich im Text.

Im Jahr 2003 veröffentlichte die Gruppe um Tesmer erstmalig eine Kristallstruktur für die GRK-2 (Abbildung 5) im inaktiven Zustand (Lodowski et al., 2003).



**Abbildung 5: Struktur der GRK-2 (Thal et al., 2011)**

Die Phosphorylierung eines GPCRs durch GRKs gehört zur allgemein akzeptierten Modellvorstellung, wonach die Bindung von  $\beta$ -Arrestinen an die phosphorylierten Rezeptorsequenzen zur Desensibilisierung und zur anschließenden clathrin-vermittelten Internalisierung des Rezeptors führt. Darüberhinaus können die GRKs aber auch mit den G-Protein Untereinheiten  $G_{\alpha q/11}$  und  $G_{\beta\gamma}$  sowie mit Clathrin, GIT, MEK und PI3K interagieren und entsprechende Signalwege regulieren (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Die Funktion der GRKs am Beispiel der GRK-2 (Ribas et al., 2007)**

Die Abbildung (a) zeigt die Internalisierung des Rezeptors. Die Abbildungen (b) und (c) zeigen verschiedene Interaktionspartner und Beeinflussung von Signalwegen durch die GRK-2.

GRKs sind an zahlreichen pathologischen Veränderungen beteiligt. (Gurevich et al., 2011). So kommt es bei der Herzinsuffizienz zu einer Hochregulierung der GRK-2 (Ungerer et al., 1993, 1994). Bei der arteriellen Hypertonie ist die GRK-2 Aktivität in Lymphozyten erhöht (Park et al., 2004). Verminderte GRK-2 und GRK-5 Spiegel wurden in einem Morbus Alzheimer Mausmodell gefunden (Suo et al., 2004). Bei Depression hingegen kommt es zu einer Zunahme von GRK-2. Im Tiermodell konnte durch Überexpression der GRK-6, die bei der Therapie des Morbus Parkinson auftretenden Dyskinesien, gemildert werden (Ahmed et al., 2010). Ziel der pharmakologischen Forschung ist es, spezifische GRK-2 Inhibitoren zu entwickeln (Thal et al., 2011).

Es gibt bereits für alle GRKs ein Maus *knockout* Modell mit Ausnahme der GRK-7, welche nicht in der Maus exprimiert wird. Die GRK-1 *knockout* Maus zeigt eine lichtabhängige Retinadegradation (Chen et al., 1999). Der homozygote GRK-2 *knockout* ist embryonal lethal. Diese Mäuse zeigen ein „thin myocardium syndrome“, hier kommt es lediglich zur Ausbildung einer einzelligen Schicht eines embryonalen Herzwebes (Jaber et al., 1996). Der heterozygote *knockout* ist hingegen überlebensfähig, zeigt aber eine verstärkte kardiale Erregbarkeit (Rockman et al., 1998). Trotz der hohen Sequenzhomologie und der meist gemeinsamen Expression, zeigt der GRK-3 *knockout* keine kardialen Auffälligkeiten. Der GRK-3 *knockout* reagiert verstärkt auf cholinerge Reize, beispielsweise im Bereich der Atemwege (Walker et al., 1999). Außerdem kommt es zu einem Verlust der Sensibilisierung auf Geruchsstoffe (Peppel et al., 1997). Für die GRK-4 *knockout* Maus ist kein auffälliger Phänotyp beschrieben (Gainetdinov et al., 2000). Die GRK-5 *knockout* Maus zeigt zentrale cholinerge Symptome (Gainetdinov et al., 1999). Der GRK-6 *knockout* weist Veränderungen in der Chemotaxis bei Lymphozyten (Fong et al., 2002) und Neutrophilen auf (Kavelaars et al., 2003).

Es gibt jedoch auch einige Veröffentlichungen über eine phosphorylierungs-unabhängige Desensibilisierung von GPCRs. Darunter der  $\alpha_{1b}$ -adrenerge Rezeptor (Diviani et al., 1996), der metabotrope Glutamat Rezeptor 5 (Ribeiro et al., 2009), der muskarinische Acetylcholinrezeptor M1 (Willets et al., 2004), der Parathormonrezeptor (Dicker et al., 1999), der Histaminrezeptor H2 (Fernandez et al., 2011) und der Melanocortin-4-Rezeptor (Shinyama et al., 2003).

## B.5 Arrestinfamilie

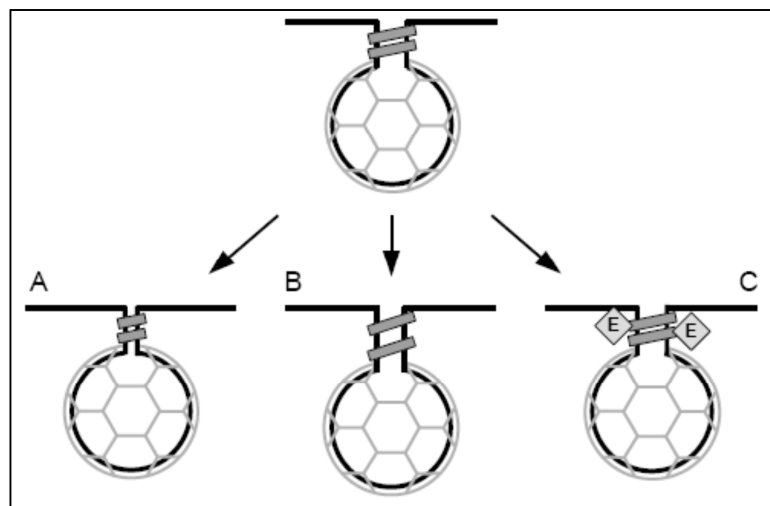
Die Arrestinfamilie wird in Arrestin-1, Arrestin-2 ( $\beta$ -Arrestin-1), Arrestin-3 ( $\beta$ -Arrestin-2) und Arrestin-4 eingeteilt.  $\beta$ -Arrestin-1 und  $\beta$ -Arrestin-2 werden ubiquitär exprimiert (Reiter et al., 2006). Arrestin-1 und 4 werden hingegen nur in den Stäbchen und Zapfen gebildet. Die GPCRs werden aufgrund ihrer Bindung mit  $\beta$ -Arrestin in zwei Klassen eingeteilt. Die GPCRs der Klasse A binden  $\beta$ -Arrestin-2 transient mit einer höheren Affinität als  $\beta$ -Arrestin-1 und es kommt nach der Internalisierung zu einem raschen Recycling des Rezeptors. Die GPCRs der Klasse B binden hochaffin an beide  $\beta$ -Arrestine. Möglicherweise gibt es eine weitere Arrestin Klasse C (Simaan et al., 2005). Die  $\beta$ -Arrestine sind wesentlich an der Desensibilisierung und Internalisierung von GPCRs beteiligt. Die Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den phosphorylierten GPCR verhindert sterisch die weitere Bindung des G-Protein. Darüberhinaus können  $\beta$ -Arrestine als Adaptorproteine für andere Effektorproteine, darunter MAPK, c-Src und Akt, agieren (Lefkowitz et al., 2005). Die Aminosäure R169 bei  $\beta$ -Arrestin-1 bzw. die Aminosäure R170 bei  $\beta$ -Arrestin-2 hat die Funktion eines Phosphorylierungssensor. Dessen Entfernung führt dazu, dass der aktivierte  $\beta_2$ -Adrenorezeptor phosphorylierungs-unabhängig gebunden und internalisiert wird (Kovoor et al., 1999).

## B.6 Funktion der GTPase Dynamin

Dynamin (70-100kDa) gehört zu den GTP-bindenden Proteine, zu denen u.a. auch die  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, die Ras-homologen GTPasen und die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese gehören. Dynamin ist u.a. an der Vesikelabschnürung, am Erhalt der Mitochondrienmorphologie und an der Abwehr von viralen Antigenen beteiligt (Mc Niven et al., 2000).

Die GTPase Dynamin lässt sich in drei Isoformen einteilen. Dynamin-1 wird in Neuronen und neuroendokrinen Zellen, Dynamin-2 ubiquitär und Dynamin-3 überwiegend in Hoden, Herz und Lunge exprimiert. Dynamin wurde bei clathrin-umhüllten Vesikeln, bei Caveolae und außerdem beim Transport von Endosomen zum Golgi-Apparat gefunden. Der N-Terminus besitzt eine hochkonservierte GTP-

hydrolysierende Domäne (ca. 300 AS), welche mit der GTPase-Effektor Domäne (ca. 120 AS) im C-Terminus interagiert. Die Bindung an die Plasmamembran erfolgt über eine PH Domäne (Hinshaw et al., 2000). Dynamin besitzt die Fähigkeit sich zu Ringen und Spiralen zusammenzulagern und in Anwesenheit von Liposomen helikale Röhren zu bilden (Hinshaw et al., 1995; Tuma et al., 1994). Der genaue Mechanismus, der zur Abschnürung der Vesikel führt, ist noch nicht geklärt (Abbildung 7). Ein Modell beruht auf einem Zusammenziehen der Dynaminspirale am Vesikelhals (Sweitzer et al., 1998), ein anderes Modell beschreibt, dass sich die Spirale durch die GTP-Hydrolyse in die Länge zieht (Sever et al., 2000). Eine weitere Annahme ist, dass Dynamin auch eine regulatorische Funktion hat. (Damke et al., 2001; Sever et al., 2000).



**Abbildung 7: Modell zur Funktion von Dynamin (Sever et al., 2000)**

Die Abschnürung der Vesikel erfolgt entweder über eine Verengung der Helix (A), durch eine Streckung der Helix (B) oder durch Bindung von Effektorproteinen (C).

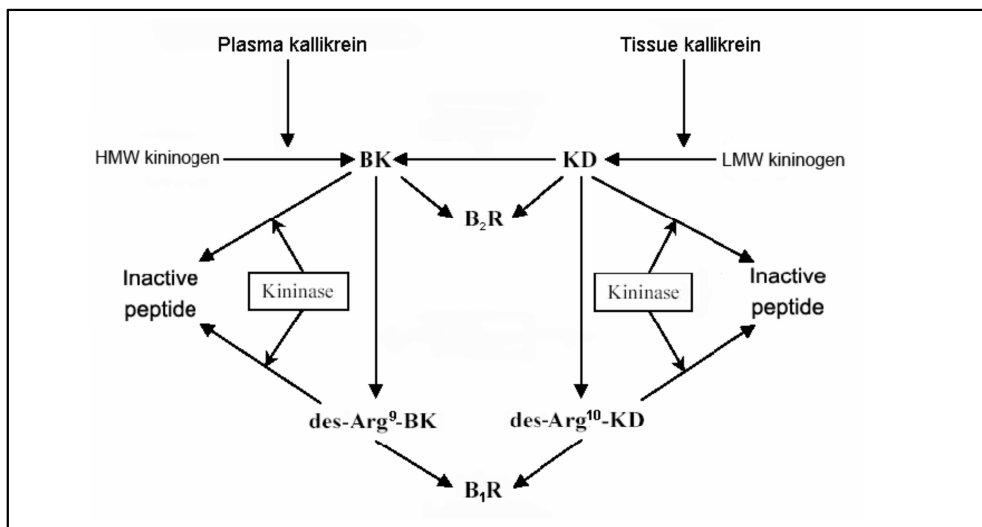
## B.7 Kallikrein-Kinin System

Zu den Kininen zählt das Bradykinin (BK; Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) und das Kallidin (KD; Lys-BK). Carboxypeptidasen führen zu einer Abspaltung des C-terminalen Arginin von BK und KD und bilden des-Arg<sup>9</sup>-BK und des-Arg<sup>10</sup>-KD. BK wird durch limitierte Proteolyse mittels Plasmakallikrein aus hochmolekularem Kininogen freigesetzt. KD hingegen wird aus hochmolekularem und niedermolekularem Kininogen durch Gewebekallikrein gebildet. BK kann außerdem

durch die Abspaltung des N-terminalen Lysins aus KD generiert werden (Abbildung 8). Kinine führen unter anderem über die Freisetzung von Mediatoren zur Vasodilatation, Thrombozytenaggregationshemmung und Fibrinolyse. Außerdem spielen Kinine eine Rolle bei der reaktiven Neovaskularisierung nach ischämischen Ereignissen (Stone et al., 2009).

Kininasen inaktivieren vollständig die Kinine durch Spaltung. Pharmakologisch bedeutsam ist die Kininase ACE (*Angiotensin converting enzyme*). Dieses Enzym generiert Angiotensin II aus seiner Vorstufe Angiotensin I. Angiotensin II bindet an die Angiotensinrezeptoren AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> und führt zur Vasokonstriktion und zur Verminderung der Aldosteron Freisetzung aus der Nebennierenrinde. ACE-Hemmer können dieses Enzym hemmen und werden als Antihypertensivum therapeutisch sehr erfolgreich eingesetzt. ACE-Inhibitoren werden darüberhinaus bei Postinfarktpatienten eingesetzt um das *remodeling* am Herzen zu bremsen. Diese Wirkung wird vor allem über Kinine vermittelt, da ACE-Hemmer zu einem verminderten Abbau von Kininen führen. Ebenso ist die renoprotektive Wirkung der ACE-Hemmer überwiegend ein Effekt der Kinine (Alhenc-Gelas et al. 2011). ACE-Hemmer führen zu einem verminderten Abbau von Kininen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Kininproduktion gering. Es gibt daher Überlegungen, ob eine direkte Aktivierung des B<sub>2</sub>R ein höheres therapeutisches Potential besitzt als die ACE-Hemmer (Alhenc-Gelas et al. 2011). Zur Zeit gibt es keinen oral verfügbaren B<sub>2</sub>R Agonisten. Eine Nebenwirkung der ACE-Inhibitoren ist der Reizhusten, der in 3-20% der behandelten Patienten auftritt (Israili et al., 1992). Außerdem kommt es in seltenen Fällen zu Angioödementwicklung.





**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Kallikrein-Kinin System (Dissertation Kalatskaya, 2005)**

Bradykinin (BK), Kallidin (KD), hochmolekulares Kininogen (HMW), niedermolekularem Kininogen (LMW)

## B.8 Kinine

Bradykinin konnte im Urin, Speichel, Schweiß, Fäces und Blut, sowie im Herz, Gefäßsystem, Niere, Leber, Haut, Darm, Pankreas, Speicheldrüsen, Reproduktionsorgane, Lunge und Nebennieren nachgewiesen werden (Campbell et al., 1993; Hibino et al., 1994; Patel et al., 1999; Schremmer-Danninger et al., 1999; Madeddu et al., 2001; Meneton et al., 2001). Kallidin wurde im Urin, Herz und Gefäßsystem gefunden (Campbell et al., 1999; Duncan et al., 2000).

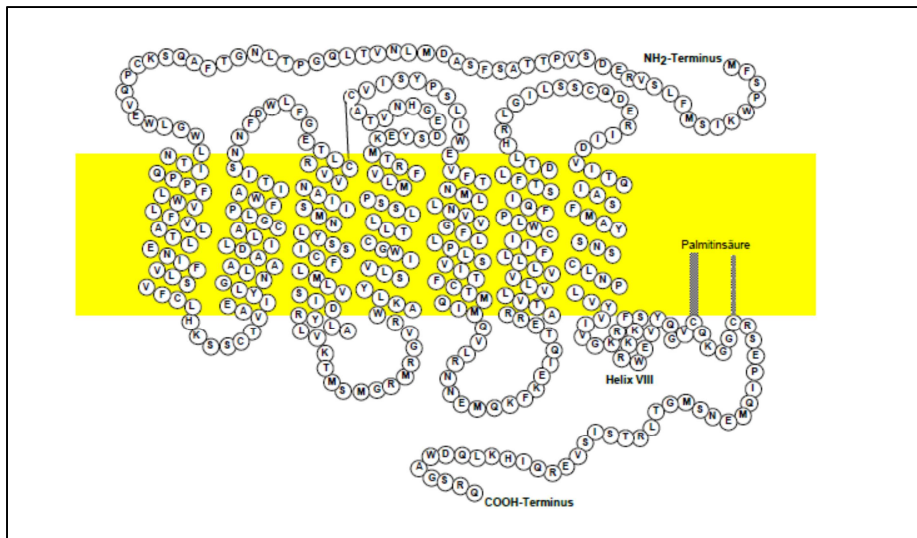
Bradykinin wird im Organismus als Antwort auf Inflammation gebildet. Es führt zu einer erhöhten Permeabilität und zur Vasodilatation und ist somit für die Entstehung von Ödemen mitverantwortlich. Zusätzlich ist Bradykinin über die C-Fasern an der Schmerzvermittlung beteiligt (Leeb-Lundberg et al., 2005). Es konnte für Bradykinin ein protektiver Effekt auf die Nierenperfusion nach einem ischämischen Ereignis gezeigt werden (Kakoki et al., 2007).

## B.9 B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> Bradykininrezeptoren

Die beiden Bradykininrezeptoren gehören zu der Klasse A der GPCRs. Bradykinin und Kallidin binden hochaffin selektiv an den B<sub>2</sub> Bradykininrezeptor (B<sub>2</sub>R) (Abbildung 9). Die Carboxypeptidase-produkte des-Arg<sup>9</sup>-BK und des-Arg<sup>10</sup>-KD hingegen selektiv an den B<sub>1</sub> Bradykininrezeptor (B<sub>1</sub>R). Der B<sub>2</sub>R wird konstitutiv ubiquitär exprimiert. Im Gegensatz dazu wird der B<sub>1</sub>R außerhalb des zentralen Nervensystems nur exprimiert wenn es zu einer Inflammation oder einem ähnlichen Reizes kommt. Internalisierung (Austin et al., 1997) und Phosphorylierung (Blaukat et al., 1997; Pizard et al., 1999) des Rezeptors nach Stimulation durch einen Liganden konnte bisher nur für den B<sub>2</sub>R gezeigt werden.

In zahlreichen Studien wurden B<sub>2</sub>R Antagonisten eingesetzt um einen möglichen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Asthma bronchiale (Akbari et al., 1996), allergischer Rhinitis (Turner et al., 2001), Pankreatitis (Asano et al., 1997), Osteoarthritis (Bond et al., 1997), Hirnödemen (Marmarou et al., 1999), Alzheimer (Prediger et al., 2008) und Angioödem (Cugno et al., 2003) zu untersuchen.

Zur Zeit wird der hoch spezifische B<sub>2</sub>R Antagonist Icatibant therapeutisch zur Behandlung des hereditären Angioödems eingesetzt (Bork et al., 2007; Bernstein et al., 2008). Beim hereditären Angioödem handelt es sich um eine autosomal-dominante Erkrankung mit einem Mangel an C1 Esterase-Inhibitor. Die reduzierte Aktivität führt zu einem erhöhten Bradykininspiegel im Plasma. Die Symptome eines akuten Anfalls sind subkutane und submuköse Ödeme, die den oberen Atemtrakt, Gesicht, Extremitäten, Genitalien und den Gastrointestinaltrakt betreffen. Ödeme im Pharynx und Larynx können lebensbedrohlich werden. Die bisherige Therapie mit Tranexamsäure ist nicht sehr effektiv und die intravenöse Gabe von C1 Esteraseinhibitoren ist nur in wenigen Ländern zugelassen. Der Antagonist Icatibant bindet hochselektiv an den B<sub>2</sub>R. In zwei Phase-3 Studien konnte eine Verbesserung der Symptome im Vergleich zu Placebo und im Vergleich zu Tranexamsäure gezeigt werden (Cicardi et al., 2010).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des B<sub>2</sub>R (Dissertation Wirth, 2011)**

Der B<sub>2</sub>R besteht aus 391 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 41kDa; abgebildet sind die sieben Transmembrandomänen, die drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen, sowie die cytosolische Helix VIII.

## B.10 Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R

### B.10.1 MAPK Signalweg

GPCRs können den MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinnase) Signalweg über G<sub>ai</sub> und G<sub>aq/11</sub> aktivieren. Über das G-Protein G<sub>ai</sub> erfolgt die Aktivierung der MAPK Kaskade über eine G<sub>βγ</sub> abhängige Route via PI3Kγ, Src und Ras. Über das G-Protein G<sub>aq/11</sub> erfolgt die Stimulation via Phospholipase C-β (PLC) und es kommt zur Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat, Diacylglycerol und gefolgt von einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch die Freisetzung von Diacylglycerol und die Erhöhung des Calciumspiegels wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Diese wiederum ist an der Aktivierung der Kinase RAF beteiligt.

Für den B<sub>2</sub>R konnte gezeigt werden, dass beide G-Proteine G<sub>ai</sub> und G<sub>aq/11</sub> für die Erzeugung des ERK1/2 (*e*xtracellular-*s*ignal *r*egulated *k*inase) Signals, eine Komponente des MAPK Signalweges, notwendig sind (Blaukat et al., 2000; Leschner et al., 2011). Diese Aktivierung ist jedoch unabhängig von den G-Proteinuntereinheiten G<sub>βγ</sub>, der PI3K Aktivität und generell unabhängig von Tyrosinkinasen. Der B<sub>2</sub>R aktiviert via G<sub>aq/11</sub> und PKC direkt die Kinase Raf. Für eine

effektive ERK1/2 Signaltransduktion ist jedoch auch die Aktivierung des Signalweges Ras-Raf via  $G_{\alpha i}$  notwendig (Blaukat et al., 2000).

Die Aktivierung des ERK1/2 Signalweg kann bei GPCRs durch die Kopplung an G-Proteine und bzw. oder über die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestinen (Reiter et al., 2006) geschehen. Die Aktivierung über das G-Protein erfolgt im Allgemeinen schnell und transient und das phosphorylierte ERK1/2 ist im Nucleus lokalisiert. Gegensätzlich dazu verhält sich der  $\beta$ -Arrestin-aktivierte ERK1/2 Signalweg. Dessen Aktivierung dauert länger und das phosphorylierte ERK1/2 bleibt im Cytosol lokalisiert. Beim  $\beta$ -Adrenorezeptor sind die GRK-5 und GRK-6 für den  $\beta$ -Arrestin-abhängigen ERK1/2 Signalweg wichtig. Die GRK-2 und GRK-3 hingegen inhibieren das ERK1/2 Signal (Kim et al., 2005; Ren et al., 2005; Reiter et al., 2006).

### **B.10.2 Arachidonsäure Signalweg nach Aktivierung des B<sub>2</sub>R**

Es wurden verschiedene Signalwege für die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) beschrieben. Die aktivierte Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysiert die Esterbindung von Membranphospholipiden und setzt AA frei (Chand et al., 1987). Ein weiterer Weg führt indirekt über die Aktivierung der Phospholipase C, welche die Phosphodiesterbindung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat hydrolysiert. Dadurch entstehen 1,2-Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-Triphosphat. Aus 1,2-Diacylglycerol wird durch die Mono- und Diacylglycerollipase AA freigesetzt (Okazaki et al., 1981). Zusätzlich können über einen intrazellulären Anstieg von  $Ca^{2+}$  die Phospholipase A<sub>2</sub> und die Phospholipase C aktiviert werden (Smith et al., 1992).

Die entstandene Arachidonsäure wird über die Cyclooxygenase oder über die Lipxygenase metabolisiert. Durch die Cyclooxygenase entstehen Prostaglandin G<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Aus dem Prostaglandin H<sub>2</sub> entsteht Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und das Thromboxan A<sub>2</sub>. Letzteres ist für die Aktivierung der Thrombozytenaggregation und Kontraktion der glatten Muskulatur von entscheidender Bedeutung. Funktionell antagonistisch verhält sich Prostazyklin. Durch die Aktivität der Lipxygenasen entsteht aus AA auch die Gruppe der Leukotriene, die an Entzündungsreaktionen und bei der Immunantwort beteiligt sind

## B.11 Desensibilisierung und Internalisierung des B<sub>2</sub>R

Für die Desensibilisierung des B<sub>2</sub>R gibt es die allgemein für GPCR angenommene Modellvorstellung, vorwiegend basierend auf Forschungsergebnissen des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors. Angewandt auf den B<sub>2</sub>R kann die Signalterminierung dabei sowohl über die G-Proteinaktivierung mit ihrer Freisetzung von G <sub>$\beta\gamma$</sub>  Untereinheiten und der Rekrutierung von GRKs als auch über  $\beta$ -Arrestine vermittelte Internalisierung erfolgen.

Klassischerweise führt die Bindung eines Liganden an den B<sub>2</sub>R zur Stabilisierung einer bestimmten Konformation und anschließend zur Kopplung und Aktivierung der entsprechenden heterotrimeren G-Proteine. Der Agonisten-gebundene B<sub>2</sub>R wird anschließend durch GRKs phosphoryliert, die im Falle der GRK-2/-3 über die Bindung ihrer PH-Domänen an die freigesetzten G <sub>$\beta\gamma$</sub>  G-Proteinuntereinheiten herangeholt werden. Die Phosphorylierung führt zur Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestinen, welche sterisch das G-Protein Signal inhibieren und die Internalisierung des B<sub>2</sub>R einleiten. Sowohl die GRKs als auch die  $\beta$ -Arrestine sind ihrerseits in der Lage direkt mit verschiedenen cytosolischen Proteine zu interagieren und Signalwege zu regulieren. Über diese Modellvorstellung hinaus ist allerdings noch nicht geklärt, inwieweit die unterschiedlichen Signalwege des B<sub>2</sub>R durch einen Liganden gleichzeitig aktiviert oder unabhängig voneinander reguliert werden können. Eine solche funktionale Selektivität oder *biased agonism* ist beispielsweise für die selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERM) oder für den  $\beta$ -Blocker Carvedilol beschrieben (Andresen et al., 2011).

Für den B<sub>2</sub>R konnte in humanen Fibroblasten und in HEK293 Zellen eine basale Phosphorylierung von S348 nachgewiesen werden. Nach Aktivierung des Rezeptors zeigte sich eine zusätzliche Phosphorylierung der Serine an Position 339 und 346, sowie vermutlich Threoninen an Position 342 und 345 (Blaukat et al., 2001).

Für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R ist der C-Terminus wichtig (Faussner et al., 1998; Pizard et al., 1999; Prado et al., 1997). Bei einem systematischen Alanin-Screening in allen drei intrazellulären Schleifen des B<sub>2</sub>R wurde kein signifikanter Effekt dieser Mutationen auf die Internalisierung des Rezeptors gefunden (Faussner et al., 2009). Bezüglich der hochkonservierten DRY-Sequenz konnte jedoch keine Aussage gemacht werden, da diese Mutante (DRY→AAA) nicht an der Oberfläche der Zellen exprimiert wurde. Für den B<sub>2</sub>R zeigte sich, dass  $\beta$ -Arrestin-2 im Gegensatz zu  $\beta$ -

Arrestin-1 phosphorylierungs-unabhängig über die Helix 8 den Rezeptor internalisiert (Feierler et al., 2011).

Die genauen molekularen Interaktionen zwischen den verschiedenen GRKs und dem B<sub>2</sub>R für die Internalisierung sind bisher noch nicht ausreichend geklärt. Insbesondere fehlt detailliertes Wissen über die Funktion der einzelnen GRK Domänen und deren Rolle für die Internalisierung und Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R.

## C FRAGESTELLUNG UND EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISE

Wie in der Einleitung aufgezeigt hat der B<sub>2</sub> Bradykininrezeptor (B<sub>2</sub>R) hat eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen eines Entzündungsgeschehen und stellt somit prinzipiell einen guten therapeutischen Ansatzpunkt dar. Für die Entwicklung entsprechender Medikamente wäre ein detailliertes Verständnis über Desensibilierung, Internalisierung und Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R von großer Hilfe. Insbesondere die Aufklärung über die verschiedenen Interaktionen zwischen den G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und dem B<sub>2</sub>R ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Bisher beschränkte sich die Rolle der GRKs bei der Regulation der Aktivitäten des B<sub>2</sub>R ausschließlich auf die Beschreibung ihrer Funktion bei der Phosphorylierung von C-terminalen Resten des B<sub>2</sub>R. Diese sollen der Rekrutierung von Arrestinen und damit der Rezeptorinternalisierung dienen. Über diese Modellvorstellung hinaus gibt es nur unzureichende Kenntnisse über die genauen Regulation der Signalaktivität des B<sub>2</sub>R durch GRKs. Insbesondere über die Bedeutung der anderen nicht für die Kinaseaktivität verantwortlichen Domänen der GRKs für den B<sub>2</sub>R ist bisher wenig bekannt. Darüberhinaus ist noch ungeklärt, inwieweit die verschiedenen Signalwege beim B<sub>2</sub>R unabhängig voneinander im Sinne eines *biased agonism* durch Liganden reguliert werden können. Solche Kenntnisse wäre besonders für die Wirksamkeit zukünftiger Medikamente von großer Bedeutung.

Vor diesem Hintergrund war es daher Ziel dieser Doktorarbeit die Rolle der regulatorischen Proteine GRK-2, GRK-3 und der GTPase Dynamin-1 im Hinblick auf die Signaltransduktion und Internalisierung des B<sub>2</sub>R in der Zellkultur mit HEK293 Zellen zu bestimmen.

Insbesondere sollten Bedeutung und Funktion der verschiedenen Domänen (Kinasedomäne, G-Proteinbindungsdomänen) von GRK-2, GRK-3 und Dynamin-1

- a) bei der Internalisierung des B<sub>2</sub>R
- b) bei der Aktivierung des ERK1/2 (MAPK) Signalweg durch diesen Rezeptor untersucht werden.

## D MATERIAL UND METHODEN

### D.1 Material

#### D.1.1 Geräte

Analysenwaage, A 120 S	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage, 3716MP	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage Precisa 92SM-202A	Sartorius, Göttingen
ß-Counter Liquid Scintillation Analyzer Mod. 2300TR	Packard, Meriden, USA
CAPP-ELISA Waschanlage	Dynex, Berlin
Elektrophoresekammer Minisubcell GT	Biorad, München
ELISA Reader DigiScan 900	Asys Hitech Eugendorf, Österreich
Fluoreszenz Mikroskop Olympus IX-70	Olympus, Tokyo, Japan
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Herasafe Typ HS18/2	Heraeus Instruments, München
Inkubator Typ B5060 EC-CO <sub>2</sub>	Heraeus Sepatech, München
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Tokyo, Japan
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen
PCR Thermo Cycler Primus Typ 25	MWG Biotech, Ebersberg
pH Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Power Supply EPS 301	Amersham-Pharmacia-Biotech Buckinghamshire, UK
Paramix II	Julabo, Seelbach
Snap i.d. Protein Detection System	Millipore, Schwalbach
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
X-Cell SureLock Electrophoresis	Invitrogen, Karlsruhe
X-Cell Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Sepatech, München
Zentrifuge Megafuge 10R	Heraeus Sepatech, München
Zeiss LSM 410 konfokales Spektralmikroskop	Carl Zeiss, Thornwood, USA



### D.1.2 Chemikalien und Materialien

Agarose MP	Boehringer, Ingelheim
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Arachidonic Acid [5,6,8,9,11,12,14,15- <sup>3</sup> H]	PerkinElmer Life Sciences, Boston
[2,3-Prolyl-3,4- <sup>3</sup> H]-Bradykinin	PerkinElmer Life Sciences, Boston
Bacto Agar	BD Bioscience, San José, USA
Bacto Hefeextrakt	BD Bioscience, San José, USA
Bacto Trypton	BD Bioscience, San José, USA
Blasticidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe
Bradykinin	Bachem, Heidelberg
BSA	Sigma, Taufkirchen
BSA	NewEngland BioLabs, Frankfurt
Chemilumineszenz Reagenz Plus	PerkinElmer Life Sciences, Boston
Complete Lysis-M	Roche Mannheim
DNA ladder 1kb Plus	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (1×)	PAA, Pasching, Österreich
DMEM Medium	PAA, Pasching, Österreich
DMSO	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Pasching, Österreich
FuGENE HD Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Herculase DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Hygromycin B	PAA, Pasching, Österreich
HyperFilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, UK
Liquid Scintillation	Zinnser Analytic, Frankfurt
Micro BSA Protein Assay Reagenz	Pierce, Rockford, USA

Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran 0.45 µm	BioRad, München
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standard	BioRad, München
Pertussis Toxin	Sigma, Taufkirchen
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma, Taufkirchen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	NewEngland BioLabs, Frankfurt
Röntgenfilm	Fuji, Tokyo, Japan
Serologische Pipetten	TPP, Trasadingen, Schweiz
StrataClone PCR Cloning Kit	Stratagene, La Jolla, USA
T4-DNA Ligase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden,
Tetracyclin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (1×)	PAA, Pasching, Österreich
Whatman Filterpapier	Whatman, Ammerbuch
Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

### D.1.3 Primer

BGH AS	GGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG
CMV SE	GTACATGACCTTATGGGACTTTCC
GRK 2 K220R AS	GCTTTTTGTCCAGGC <b>ACCT</b> CATGGCGTACATCTTGC
GRK 2 K220R SE	GCAAGATGTACGCCATG <b>AGGT</b> GCCTGGACAAAAAGC
GRK 3 K220R AS	CCTCTTCTTATCTAAGCAT <b>CTC</b> ATTGCATACATTTTTTCC
GRK 3 K220R SE	GGAAAAATGTATGCAATG <b>AGAT</b> GCTTAGATAAGAAGAGG
GRK 2 R106A AS	CGAAGATCTC <b>CGCG</b> CTGCGGGCC
GRK 2 R106A SE	GGCCCGCAGC <b>GCGG</b> GAGATCTTCG
GRK 3 R106A AS	GGCATCATAAATTTGT <b>GCA</b> CTTCTGCAAAGGCGG
GRK 3 R106A SE	CCGCCTTTGCAGAAGT <b>GCAC</b> AAATTTATGATGCC
GRK 2 R587Q AS	CCCCGCCACTCGAG <b>TTG</b> GTTGGGG
GRK 2 R587Q SE	CCCCAAC <b>CAACT</b> CGAGTGGCGGGG
GRK 3 R587Q AS	CCTCTCCATTCAAG <b>TTG</b> ATTTGGAAAGAGG
GRK 3 R587Q SE	CCTCTTTCCAAAT <b>CAACT</b> TGAATGGAGAGG
Dyn1 AS	CTCATTAGAGGTCGAAGGGGGGCCTGG
Dyn1 SE	TGCGTTAATACACAGAATTCTG
Dyn1 HindIII SE	AATTA <b>AAGCTT</b> ATGGGCAACCGCGGC
Dyn1 BamHI AS	AATT <b>GGATCC</b> TTAGAGGTCGAAGGGGGG

**Tabelle 1: Übersicht über die eingesetzten Primer.**

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die eingefügten Punktmutationen sind fett gedruckt. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen gedruckt.

### D.1.4 Vektoren

CMV promoter: bases 232-958

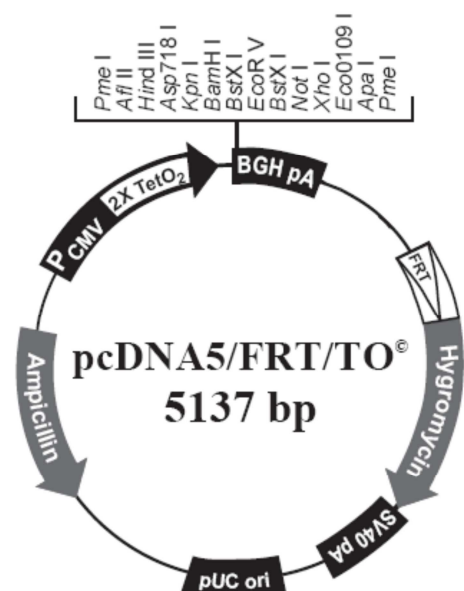
TATA box: bases 804-810

Tetracycline operator (2X TetO<sub>2</sub>) sequences:  
bases 820-859

CMV forward priming site: bases 769-789

Multiple cloning site: bases 968-1077

BGH reverse priming site: bases 1089-1106



BGH polyadenylation signal: bases 1095-1319

FRT site: bases 1603-1650

Hygromycin resistance gene (no ATG):

bases 1658-2678

SV40 early polyadenylation signal: bases 2810-2940

pUC origin: bases 3323-3996 (complementary strand)

*bla* promoter: bases 5002-5100 (complementary strand)

Ampicillin (*bla*) resistance gene:

bases 4141-5001 (complementary strand)

#### Abbildung 10: Schematische Darstellung des pcDNA5/FRT/TO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieser Vektor dient für die stabile Expression eines Gens in HEK293 Zellen. Der Vektor besitzt einen CMV/ TetO<sub>2</sub>-Promoter für eine hohe und Tetrazyklin-regulierte Expression des gewünschten Gens. Eine integrierte FRT Sequenz ermöglicht den Einbau in Säugetierzellen durch DNA Rekombination, vermittelt durch die Flp-Rekombinase pOG44.

CMV-Promoter: Basen 234-821

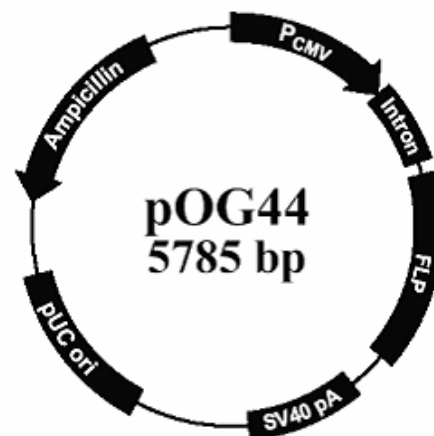
Synthetisches Intron: Basen 871-1175

FLP-Gen: Basen 1202-2473

SV40 early Polyadenylations-Signal: Basen 2597-2732

pUC-Ursprung: Basen 3327-3993

Ampicillin Resistenzgen: Basen 4138-4998



#### Abbildung 11: Schematische Darstellung des pOG44 Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieser Vektor enthält das Gen für die Flp-Rekombinase. Diese Rekombinase erkennt die FRT (*Flp Rekombinase Target*) Stellen und vermittelt die sequenzspezifische DNA Rekombination.

### D.1.5 Bakterienstamm

*E. coli* Top 10 (Invitrogen)

Lab. strain # 1557

Genotype: F-mcrA  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi 80/lacZ\Delta M15$   $\Delta lac$  X74 *deoR* A1 *araD139*

$\Delta(ara-leu)7697$  *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

### D.1.6 Säugetierzelllinie

Flp-In T-REx™-293

Invitrogen, Karlsruhe

Zelltyp: Human Embryonic Kidney 293

### D.1.7 Antikörper

Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)

mouse monoclonal

Cell Signaling, Frankfurt

Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) mouse

monoclonal

Cell Signaling, Frankfurt

Anti-Dynamin I/II rabbit polyclonal

Cell Signaling, Frankfurt

Anti-GRK 2 rabbit polyclonal

Santa Cruz Biotechnology,  
Heidelberg

Anti-GRK 3 rabbit polyclonal

Santa Cruz Biotechnology,  
Heidelberg

Anti-Rabbit-HRP

DAKO Glostrup, Dänemark

Anti-Mouse-HRP

NewEngland BioLabs, Frankfurt

### D.1.8 Puffer

B<sub>2</sub>-Puffer

40mM PIPES, 109mM NaCl, 5mM KCl, 0,1% Glucose,  
0,05% BSA, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Bacitracin,  
0,8mM 1,10-Phenanthrolin, 100µM Captopril, pH 7,2

Laufpuffer

NuPAGE (Invitrogen) MOPS SDS Running Buffer (20x)  
50mM MOPS, 50mM Tris base, 0,1% SDS, 1mM EDTA  
pH 7,7

Ladungspuffer	30% Glycerol, 0,25% Bromophenol blau, 0,25% Xylencyanol FF, 0,25% Orange G
Probenpuffer	NuPAGE (Invitrogen) LDS Sample Buffer (4x) 106mM Tris HCl, 141mM Tris base, 2% LDS, 10% Glycerol 0,51mM EDTA, 0,22 mM SERVA® Blue G250, 0,175mM Phenolrot, pH 8,5
TAE-Puffer	40mM Tris, 20mM Acetat, 2mM EDTA, pH 8
TBST-Puffer	50mM Tris-base, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20
Transferpuffer	NuPAGE (Invitrogen) MOPS TransferBuffer (20x) 25mM Biscine, 25mM Bis-Tris, 1mM EDTA, Methanol (1:100) pH 7,2

### D.1.9 Lösungen

SOC Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefextrakt, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 10 mM KCl pH 7.0
LB Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl 20g/l Agar

Alle anderen Reagenzien können bei den Firmen Merck, Sigma oder Roth erworben werden.

### D.1.10 Computerprogramme

- 4peaks 1.7.2
- Endnote X4
- Graph Pad Prism 5
- McVector 7.2.3
- Microsoft Office 2010

## D.2 Methoden

### D.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### D.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt um DNA Fragmente zu vervielfältigen und um Punktmutationen einzufügen. Die eingesetzten Primer (Oligonucleotide) wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Folgende Kriterien für die Herstellung der Primer wurden beachtet. Die Länge soll zwischen 25 und 30 Nucleotiden liegen um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten. Der Anteil an Guanin (G) und Cytosin (C) soll zwischen 40% und 60% liegen. Die Schmelztemperatur ( $T_M$ ) soll mehr als 50°C betragen und kann mit folgender Formel abgeschätzt werden:  $T_M = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ . Unter (A+T) versteht man die Summe aus den Basen Adenin (A) und Thymin (T). Analog dazu ist (G+C) die Summe aus den Basen Guanin (G) und Cytosin (C). Für das Einfügen von Punktmutationen sollte die Fehlpaarungsstelle möglichst in der Mitte liegen.

Für die Mutagenese wurde die thermostabile Herculase® II DNA Polymerase von der Firma Stratagene verwendet. Es handelt sich um eine PFU-DNA Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Archaeobakterium *pyrococcus furiosus*. Diese Polymerase verfügt über eine Korrekturlesefunktion (*proof reading*) und über eine Domäne mit einer hohen Affinität zu doppelsträngiger DNA. Dadurch wird erreicht, dass die Polymerase vorzeitig vom eingesetzten DNA-Template abdissoziiert. Die

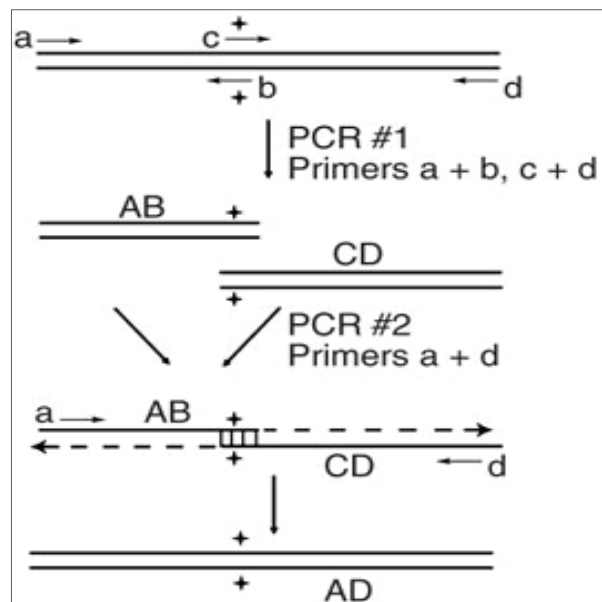
Elongationszeit beträgt bei der Herculase® Polymerase 30 Sekunden für 1000 Basenpaare. Gut geeignet ist die Herculase® für GC-reiche DNA-Templates.

Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

1.	98°C 3 min	Denaturierung	
2.	98°C 30 sec	Denaturierung	
3.	53°C 30 sec	Anlagerung der Primer	
4.	72°C 30 sec / 1000bp	Elongation	Zyklus 35x
5.	72°C 5 min	Elongation	

#### D.2.1.2 Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

Für die Mutagenese werden die flankierenden Antisense Primer BGH und Sense Primer CMV (Abbildung 12) verwendet. Zusätzlich benötigt man jeweils einen Antisense Primer und einen Sense Primer, welche die gewünschte Punktmutation enthalten.



**Abbildung 12: Methode der *site-directed mutagenesis* (Heckman et al., 2007)**

Die flankierenden Sense Primer und Antisense Primer sind mit den Buchstaben (a) und (d) gekennzeichnet. Der Sense Primer (c) und der Antisense Primer (d) enthalten die gewünschte Punktmutation.



Das Ziel war das Einfügen von gezielten Punktmutationen in den Gensequenzen der GRK-2 und GRK-3. Mit der Hilfe der PCR Methode wurden auf Genebene Nucleotide ausgetauscht um auf Ebene der Aminosäuren folgende Mutationen zu erreichen: R106A, K220R und R587Q. Als Template stand die codierende GRK-2 DNA (2070bp) und die GRK-3 DNA (2067bp) bereits zur Verfügung. Diese Gene befanden sich bereits jeweils in dem pcDNA5/FRT/TO Vektor. Dieser Vektor besitzt einen CMV/TetO<sub>2</sub>-Promoter für eine hohe und Tetrazyklin-regulierte Expression des gewünschten Gens. Eine integrierte FRT Sequenz ermöglicht den Einbau in Säugetierzellen durch DNA Rekombination, vermittelt durch die Flp-Rekombinase pOG44. Außerdem befindet sich auf dem Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin und Hygromycin. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI für die GRK-2 bzw. BamHI und XhoI für die GRK-3 wurden diese Gensequenzen in den Polylinker des Vektors eingebaut. Flankierend der GRK-Sequenz befinden sich im Vektor der Sense-Primer CMV und der Antisense-Primer BGH.

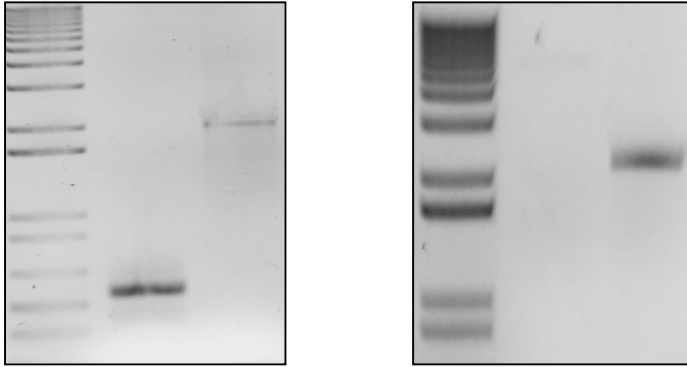
Für das Einfügen einer Punktmutation wurden jeweils ein Sense-(SE) und ein Antisense-(AS) Primer synthetisiert, der die gewünschte Punktmutation enthielt. In einer ersten PCR-Reaktion wurde der flankierende Sense-Primer CMV und der AS-Primer mit der entsprechenden Punktmutation eingesetzt (Abbildung 13 links). Analog dazu wurde der flankierende Antisense-Primer BGH und der SE-Primer eingesetzt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die beiden PCR-Produkte aus der ersten PCR-Reaktion zu gleichen Verhältnissen eingesetzt und mit den beiden flankierenden Primer CMV und BGH amplifiziert (Abbildung 13 rechts).

Komponente	Stock	Volumen
DNA Template	100ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Herculase® II Puffer	5x	10 $\mu$ l
dNTP Mix	100mM	0,5 $\mu$ l
Dimethylsulfoxid (DMSO)		4 $\mu$ l
Primer CMV bzw. BGH	10 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
Primer AS(+Mut) bzw SE(+Mut)	10 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
Herculase® II DNA Polymerase		1 $\mu$ l
Aqua steril, destilliert		31 $\mu$ l
<i>Reaktionsvolumen</i>		<i>50<math>\mu</math>l</i>

Tabelle 2: PCR Reaktion #1 und #2

Komponente	Stock	Volumen
PCR Produkt # 1	50ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
PCR Produkt #2	50ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Herculase® II Puffer	5x	10 $\mu$ l
dNTP Mix	100mM	0,5 $\mu$ l
Dimethylsulfoxid (DMSO)		4 $\mu$ l
Primer BGH	10 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
Primer CMV	10 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
Herculase® II DNA Polymerase		1 $\mu$ l
Aqua steril, destilliert		30 $\mu$ l
<i>Reaktionsvolumen</i>		<i>50<math>\mu</math>l</i>

Tabelle 3: Final PCR



**Abbildung 13: Mutagenese am Beispiel der GRK-2 R106A**

Linkes Bild zeigt die PCR Reaktionen #1 und #2 mit dem wtGRK Template und den beiden Primer CMV/AS (+R106A) in der 1. Spur und dem Primer BGH/SE(+R106A) in der 2. Spur. Das rechte Bild zeigt die finale PCR Reaktion aus den beiden PCR Produkten (linkes Bild) als Template. Als Primer wurden CMV und BGH eingesetzt.

### D.2.1.3 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in einprozentigen Agarosegelen. Diese Gele wurden durch Suspendieren von Agarose in TAE-Puffer und anschließendem Erhitzen im Mikrowellenofen hergestellt. Nach Abkühlen dieser Lösung auf 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1µg/ml zugegeben. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen den Basen kann die DNA mittels eines UV-Transilluminator (302nm) sichtbar gemacht werden. Die UV-Strahlung wurde so kurz wie möglich eingesetzt, um Schäden an der DNA zu vermeiden. Die DNA-Proben wurden mit 5-fach konzentriertem Ladepuffer versehen, in die Geltaschen aufgetragen und elektrophoretisch (5-7 V/cm; 30 Minuten) in TAE Puffer aufgetrennt. Die Größe der DNA Fragmente wurde anhand eines mitgeführten DNA Standard (1 Kb Plus *DNA ladder*) bestimmt.

### D.2.1.4 Elution von DNA aus dem Agarosegel

Nach Auftrennung der Fragmente durch die Elektrophorese, wurde die Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick® Gelextraktion Kit von der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Elution erfolgte nach den Angaben des

Herstellers. Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen, mit der 3-fachen Menge des Solubilisierungspuffer versetzt und bei 50°C gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100%-Isopropanol und die Überführung auf die mitgelieferten Silikamembransäulen. Die Säulen wurden für 1 Minute in einer Eppendorffzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Adsorption von Nukleinsäuren an die Membran erfordert einen pH <7,5 und eine hohe Konzentration an chaotropen Salzen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Durch Waschen mit einem Ethanol-haltigen Puffer wurden die Salze entfernt. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt entfernte die Reste an Puffer. Die Elution der DNA erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen mit 10µl sterilem destillierten Wasser. Der pH des Wassers sollte zwischen 7 und 8,5 liegen, da hier die Elutionseffizienz am höchsten ist. Die eluierte DNA wurde bei -20°C gelagert um eine Degradation zu verhindern.

#### **D.2.1.5 Bestimmung der DNA Konzentration**

Die DNA Konzentration wurde photometrisch basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei 260nm bestimmt. Der Reinheitsgrad der Probe wurde durch die Absorption (A) bei 260nm und 280nm überprüft:  $A_{260nm} / A_{280nm}$  sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, falls keine Proteinkontamination vorliegt. Für die Konzentrationsmessung wurde das NanoDrop® Spektralphotometer verwendet, welches 1µl-Proben messen kann und ohne die Verwendung von Probenbehälter auskommt.

#### **D.2.1.6 Restriktion und Ligation von DNA Fragmente**

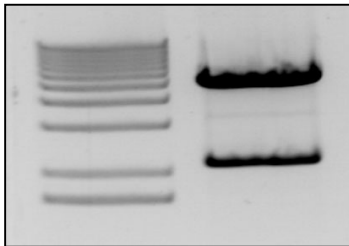
Die Restriktion von DNA diente dem Ausschneiden gewünschter DNA Fragmente (Vektor, Insert). Mit Hilfe von Restriktionsenzymen und entsprechender Pufferlösungen wurde die Restriktion durchgeführt (Tabelle 4: Restriktionsansatz. Die Reaktionen wurden auf Eis angesetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die so gewonnenen DNA Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und eluiert (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Komponente	Stock	Volumen
DNA		1 $\mu$ g
Restriktionsenzym	20U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Restriktionsenzym	20U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
BSA	10mg/ml	1 $\mu$ l
Puffer	10x	2 $\mu$ l
Aqua steril, destilliert		14 $\mu$ l
<i>Reaktionsvolumen</i>		<i>20 <math>\mu</math>l</i>

**Tabelle 4: Restriktionsansatz**

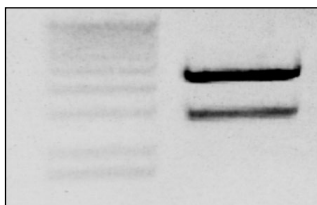
Anmerkung:

1 Unit ist die Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1  $\mu$ g  $\lambda$ -Phagen-DNA (48.000bp) in 1 Stunde bei optimalen Reaktionsbedingungen komplett zu verdauen.



**Abbildung 14: Restriktionsverdau am Beispiel der GRK-2 R106A**

Das GRK Insert wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI in den Vektor pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) ligiert. Die obere Band stellt den Vektor (5137bp) und die untere Bande das GRK Insert (2070bp) dar. Analoges Vorgehen bei GRK-2 R578Q, GRK-2 K220R, GRK-3 R106A, GRK-3 R587Q, GRK-3 K220R.



**Abbildung 15: Restriktionsverdau am Beispiel der wtDynamamin-1**

Das Dynamamin Insert wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI in den Vektor pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) ligiert. Die obere Band stellt den Vektor (5137 bp) und die untere Bande das Dynamamin Insert dar. Analoges Vorgehen bei Dynamamin-1 K44A.

Die Ligation von Insert und Vektor erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1 gemäß der Formel:  $m(\text{Insert}) = 3 \times m(\text{Vektor}) \times kb(\text{Insert}) / kb(\text{Vektor})$ .

In einem 10 µl Reaktionsansatz wurde die berechnete Menge an Insert und Vektor mit 1 µl T4-Ligase (1U/µl) und 1 µl Ligasepuffer (10x) versetzt. Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend bei 16°C für 1 Stunde inkubiert.

#### **D.2.1.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli-Stämme**

Die chemisch kompetenten One Shot® Top10 E.coli-Stämme wurden von der Firma Invitrogen bezogen. 2 µl vom Ligationsansatz wurden mit 25 µl E.coli vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen „Hitzeschock“ für 30 Sekunden bei 42°C und eine darauffolgende Inkubation für 2 Minuten auf Eis. Nach der Zugabe von 250 µl SOC Medium wurden die Bakterien bei 37°C für 1 Stunde im Thermomixer geschüttelt. Die Hälfte (125 µl) eines Ansatzes wurde mit einem sterilen Drygalskispatel auf Ampicillin-haltige (50 µl/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **D.2.1.8 Kolonie-PCR**

Diese Methode diente dazu, im Anschluss an die Transformation, E.coli Kolonien zu testen, ob sie das gewünschte Plasmid tatsächlich aufgenommen haben. Der PCR Reaktionsmix wurde gemäß Tabelle 5 mit geeigneten Primern angesetzt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil einer Kolonie gepickt und im Reaktionsansatz resuspendiert. In der Regel wurden 6 Kolonien untersucht. Die Analyse der PCR erfolgte mit der Agarosegelelektrophorese.

Komponente	Stock	Volumen
PCR Puffer	10x	1,5µl
Taq DNA Polymerase	5 U / µl	0,15µl
Primer forward	10µM	0,75µl
Primer reverse	10µM	0,75µl
DMSO	5x	3µl
dNTP Mix	10mM	1,2µl
Aqua steril, destilliert		7,65µl
<i>Reaktionsvolumen</i>		<i>15µl</i>

Tabelle 5: Kolonie PCR

Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

1.	98°C 3 min	Denaturierung	
2.	98°C 30 sec	Denaturierung	
3.	53°C 30 sec	Anlagerung der Primer	
4.	72°C 60 sec / 1000bp	Elongation	Zyklus 25x
5.	72°C 5 min	Elongation	

#### D.2.1.9 Kultivierung von E.coli Stämmen

Das Wachstumsmedium LB (Luria Bertani) wurde 20 Minuten bei einem Druck von  $1,2 \times 10^5$  Pa bei 121°C in einem Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen des Mediums auf unter 50°C erfolgte die Zugabe von Ampicillin (50µl/ml). Dieses Antibiotikum diente zur Selektionierung der transformierten E.coli Bakterien. Für die Herstellung von soliden Kultivierungsplatten wurde dem LB Medium vor dem Autoklavieren Agar (15g/L) hinzugefügt.

#### **D.2.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli**

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit der Hilfe des QIAprep® Miniprep Kit von der Firma Qiagen basierend auf einem modifiziertem Protokoll von Birnboim und Doly, (1979). Kolonien, die das gesuchte Plasmid enthalten, wurden für 12 Stunden in 6ml ampicillinhaltigem (50µg/ml) LB Medium bei 37°C und 240 U/min inkubiert. Das gewonnene Pellet wurde in Anwesenheit von RNase A resuspendiert (Puffer 1) und unter alkalischen Bedingungen (Puffer 2: NaOH/SDS) lysiert. SDS löst die Zellmembran an einigen Stellen auf und führt zur Freisetzung der Plasmide. Durch die Neutralisation (Puffer 3) und Hochsalz-Bedingungen kommt es zur Präzipitation von Zelldebris und SDS, die kleinere Plasmid-DNA bleibt in Lösung. Um die Bestandteile zu trennen erfolgt ein Zentrifugationsschritt. Der Überstand wird auf die Silikamembransäulen aufgetragen. Die Adsorption der DNA erfolgt durch Hochsalzbedingungen. Die Salze wurden anschließend mittels Waschpuffer entfernt. Unter Niedrigsalzbedingungen wurde die DNA in 50µl sterilem destilliertem Wasser (pH 8) eluiert und bei -20°C gelagert.

#### **D.2.1.11 DNA Sequenzierung**

Die Kontrolle der Sequenzen erfolgte durch DNA-Sequenzierung mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (Sanger et al., 1977) durch die Firma Medigenomix. Für die Auswertung wurde das Programm 4Peaks® (Version 1.7.2) von der Firma Mek & Tosy und MacVector® (Version 7.2.3) von der Firma Accelrys verwendet.

### **D.2.2 Zellbiologische Methoden**

#### **D.2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen**

*Human Embryonic Kidney* (HEK) 293 Zellen (Graham, 1977) wachsen als Monolayer semi-adhärenent bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM).



Dieses Medium enthält 4,5g/l Glucose und L-Glutamin. Zusätzlich wurde 10% fötales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin (P) und 1% Streptomycin (S) hinzugefügt. Unter optimalen Bedingungen teilen sich die HEK 293 Zellen innerhalb von 24 Stunden. Die Zellen wurden in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80% durch folgende Methode weiterkultiviert. Das verbrauchte Medium wurde mit einer sterilen Glaspasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS (ohne Calcium, ohne Magnesium) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500µl EDTA-Trypsin Lösung um die adhärenen Zellen von der Oberfläche abzulösen. Die Trypsinierung wurde nach 2 Minuten durch die Resuspension der Zellen in DMEM (10%FCS, 1% P/S) Medium beendet. Wo notwendig wurde das Trypsin durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt entfernt um zu verhindern, dass Trypsin aus dem fötalem Kälberserum Bradykinin freisetzt. Für Experimente, bei denen mehrere Waschschrte der Kavitäten erfolgte, wurden die Platten vorher 2 Stunden mit 0,01% Poly-D-Lysin Hydrobromid (M>300000) beschichtet. Dadurch wird eine verbesserte Zelladhärenz erreicht. Für Versuche wurden die Zellen auf Zellplatten ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert.

#### **D.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen**

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert, in 5ml Medium resuspendiert und unter sterilen Bedingungen für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMSO-haltigem (Endkonzentration 7%) DMEM Medium (10% FCS, 1% P/S) resuspendiert und möglichst zügig in Kryoeinfriereröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden bei -80°C gelagert. Um die Zellen auftauen wurden die Zellen in 5ml DMEM (10% FCS, 1% P/S) Medium überführt und für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5ml frischem DMEM (10% FCS, 1% P/S) Medium resuspendiert und in eine 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

### D.2.2.3 Das Flp – In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup> Expressionssystem

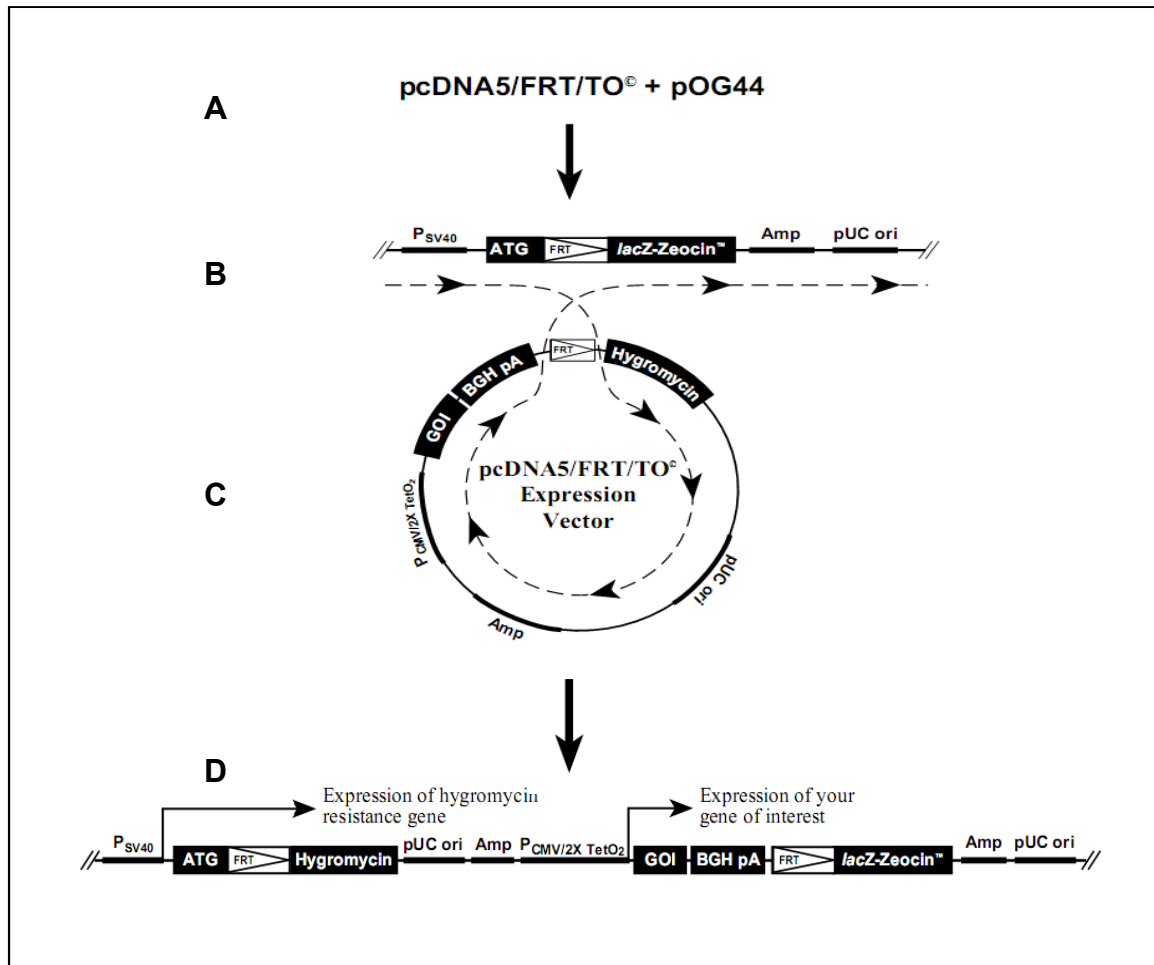
Die Etablierung von stabil exprimierten GRK-Mutanten erfolgte mit dem Flp-In<sup>TM</sup>-T-REx<sup>TM</sup> System der Firma Invitrogen (Abbildung 16). Dies ermöglicht die Integration des gewünschten Gens an eine vordefinierte Stelle im Genom.

Bei der Ausgangszelllinie Flp-In<sup>TM</sup>-T-REx<sup>TM</sup> HEK 293 (HFTR) wurde die Erkennungssequenz FRT (FLP Recombinase Target) für die Flp-Rekombinase stabil in das Genom integriert. Ein weiterer Bestandteil des Flp-In<sup>TM</sup>-T-REx<sup>TM</sup> System ist der pOG44 Vektor, welcher die Flp-Rekombinase exprimiert.

Die GRK Gensequenz wurde in den Vektor pcDNA5/FRT/TO kloniert, welcher eine FRT-Sequenz besitzt und eine Hygromycin-Resistenz trägt. Dieser Vektor enthält zudem zwei *Tet Operator* (TetO<sub>2</sub>) Sequenzen. Über eine Blasticidin Resistenz vermittelt, exprimiert die HFTR-Zelllinie den *Tet Repressor* (TR), welcher die Transkription von TetO<sub>2</sub> blockiert. Durch Zugabe von 5µg/ml Tetracyclin (Tet) kann die Blockade durch den TR wieder aufgehoben werden. Dieses System ermöglicht somit eine Regulation der Expression des gewünschten Gen (Abbildung 17).

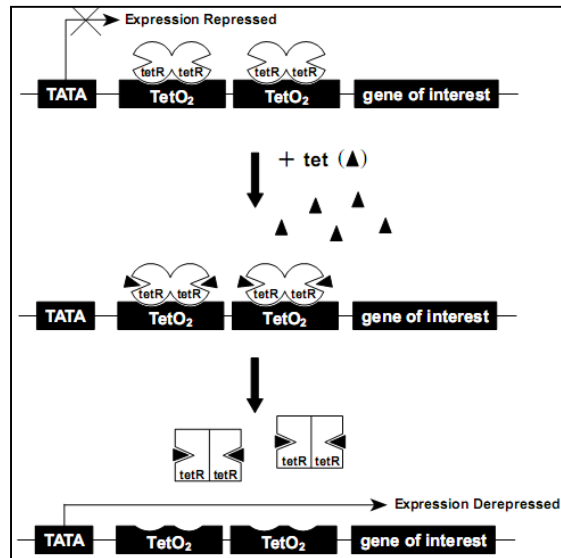
Der pcDNA5/FRT/TO Vektor mit der gewünschten Gensequenz wurde stabil zusammen mit dem pOG44 Vektor (transient) in die HFTR Zelllinie transfiziert.

In den Zellen, die beide Vektoren aufgenommen haben, erkennt die transient exprimierte Flp-Rekombinase die FRT Sequenz sowohl im Genom als auch auf dem Plasmid. Dies führt zu einem DNA-Doppelstrang-Austausch. Durch diese homologe Rekombination entstehen Zellklone, welche die verschiedenen GRK-Sequenzen isogen d.h. am selben Genlocus stabil exprimieren und resistent gegen das Antibiotikum Hygromycin sind.



**Abbildung 16: Das Flp-In™ T-REx™-System**

Der pcDNA5/FRT/TO Vektor (A) mit der gewünschten Sequenz wurde mit dem pOG44 Vektor (A) stabil in die HFTR Zelllinie (B) transfiziert. Der pOG44 Vektor exprimiert die Flp-Rekombinase. Die HFTR-Zelllinie (B) verfügt über die Erkennungssequenz FRT für die Flp-Rekombinase. In den Zellen, die beide Vektoren aufgenommen haben, erkennt die Flp-Rekombinase die FRT Sequenz sowohl im Genom als auch auf dem Plasmid. Dies führt zu einem DNA-Doppelstrang-Austausch (B+C). Durch diese homologe Rekombination entstehen Zellen (D), welche die gewünschte Sequenz stabil exprimieren.



**Abbildung 17: Das TetO<sub>2</sub>-System**

Die HFTR-Zelllinie exprimiert den Tetrazyklin Repressor (tetR), welcher die Transkription von TetO<sub>2</sub> blockiert. Durch Zugabe von 5µg/ml Tetrazyklin (tet ▲) kann die Blockade durch den tetR wieder aufgehoben werden.

## D.2.2.4 Transfektion von HEK 293 Zellen

### D.2.2.4.1 Stabile Transfektion

In einer 96-Kavitäten-Platte wurde 100µl DMEM Medium vorlegt und mit 0,4µg pcDNA5/FRT/TO Vektor, welcher das gewünschte Gen enthält, und mit 1,6µg pOG44 Vektor versetzt. Anschließend wurde 5µl Fugene HD (Roche) Transfektionsreagenz hinzugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde vollständig für eine Kavität einer 12-Kavitäten-Platte verwendet. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen trypsiniert und in 10ml DMEM (10% FCS, 1% P/S) Medium resuspendiert und auf eine Zellkulturschale (10 cm<sup>2</sup>) überführt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 50% wurden die Zellen mit 50µl Hygromycin B (50mg/ml) versetzt und selektioniert. Nach 4 Tagen wurden die abgestorbenen Zellen und das Medium abgesaugt und die Zellen mit neuem Medium versehen. Innerhalb von 10 Tagen konnten Zellkolonien mit einer

Pipettenspitze abgekratzt und in eine 6-Kavitäten-Platte überführt und kultiviert werden.

#### **D.2.2.4.2 Transiente Transfektion**

Für die transiente Transfektion wurden 2µg Vektor und 5µl Fugene HD (Roche) Transfektionsreagenz in 100µl DMEM Medium angesetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vom Transfektionsansatz wurden pro Kavität folgende Volumenmengen verwendet. Für die 96-Kavitäten-Platte wurden 5µl / Kavität, für die 24-Kavitäten-Platte wurden 25µl / Kavität und für die 12-Kavitäten-Platte wurden 50µl / Kavität verwendet. Nach 5 Stunden wurde das Medium gewechselt.

### **D.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **D.2.3.1 Lyse der Zellen**

Das Zellmedium wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 175µl Lysepuffer (Lysis-M, Roche), welcher einen Protease Inhibitor Cocktail enthält, versehen und 5 Minuten bei 4°C inkubiert. In einer Eppendorfszentrifuge wurden bei maximaler Geschwindigkeit die Zelltrümmer von den Proteinen getrennt. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt.

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

Zunächst müssen die Proteine denaturiert und reduziert werden. Durch die Auflösung der Tertiärstruktur können sequenzspezifische Antikörper diese Proteine detektieren. Die Proben wurden mit dem NuPAGE® LDS Probenpuffer (Invitrogen) versehen. Diese Methode wurde erstmals von Laemmli 1970 beschrieben. Der Puffer enthält das anionische Detergenz Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), welches sich an Proteine anlagert und zur Denaturierung führt. Ein weiterer Effekt ist, dass durch die

Anlagerung von SDS alle Proteine negativ geladen werden und die Auftrennung im elektrischen Feld durch das Molekulargewicht bestimmt wird. Die Reduzierung von Disulfidbrücken erfolgt durch die Zugabe Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 200mM. Die Proben wurden bei 96°C für 6 Minuten erhitzt, gemischt und anschließend auf ein NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) aufgetragen. Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid (Bis). Die Polymerisierung wird durch Hinzufügen von Ammoniumpersulfat und TEMED erreicht. Als Marker wurden 8µl *Precision Plus* Protein Standard von der Firma Biorad verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Kammer bei 200 Volt und 80mA für eine Stunde im NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer von der Firma Invitrogen.

#### **D.2.3.3 Proteintransfer (Western-Blot)**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (0,45µm). Für den Transfer wurde das Blot-Modul von der Firma Invitrogen verwendet. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Anode – Schwamm (2x) – Filterpapier – Nitrocellulosemembran – Gel – Filterpapier – Schwamm (2x) – Kathode. Der Western-Blot wurde in NuPAGE® MOPS Transfer Puffer und Methanol (1:100) bei 40 Volt und 150mA 1 Stunde durchgeführt.

#### **D.2.3.4 Nachweis von Proteinen mit Antikörper**

Für den Nachweis bestimmter Proteine mittels Antikörper wurde das Snap i.d. Protein Detektionssystem von der Firma Millipore verwendet. Dieses System verkürzt das Blockieren, die Waschschritte sowie die Inkubationszeiten der Antikörper durch das Anlegen eines Vakuums erheblich. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran mit 0,5 % Milchpulver, gelöst in TBST Puffer, blockiert. Dieser Schritt dient dazu um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren. Anschließend wurde der Primär-Antikörper in TBST Puffer für 10 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST Puffer wurde der mit *horse-radish-peroxidase* (HRP) markierte

Sekundär-Antikörper für 10 Minuten inkubiert und der Waschschrift wiederholt. Die Membran wurde im Anschluss daran für 5 Minuten in der *Western Lightning* Chemilumineszenz Lösung (PerkinElmer) inkubiert und auf dem Autoradiographiefilm Hyperfilm ECL (Amersham) entwickelt.

Antikörper	Ursprung	Verdünnung
GRK 2	Rabbit polyclonal IgG	1:1000
GRK 3	Rabbit polyclonal IgG	1:1000
Dynamin I / II	Rabbit polyclonal IgG	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Mouse monoclonal	1:5000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Mouse monoclonal	1:5000
Anti-mouse HRP	Horse	1:2000
Anti-rabbit- HRP	Goat	1:2000

**Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

#### D.2.3.5 Internalisierung von [<sup>3</sup>H]-Bradykinin

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden ausplattiert und gegebenenfalls transient mit dem B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel kombiniert mit der Induktion durch Tetracyclinzugabe (1:1000). Nach weiteren 12-16 Stunden Kultivierung wurde die Internalisierung mit 10nM [<sup>3</sup>H]-BK durchgeführt. Das [<sup>3</sup>H]-BK wurde im B<sub>2</sub>-Puffer angesetzt. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und mit der [<sup>3</sup>H]-BK-Lösung (96-Kavität: 100µl / 24-Kavität: 150µl) für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Die Rezeptor-vermittelte Internalisierung von [<sup>3</sup>H]-BK erfolgte bei 37°C im Wasserbad für 10 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 200µl Dissoziationspuffer (0,2M Essigsäure, 0,5M NaCl, pH 2,7) für 10 Minuten inkubiert und vollständig in Szintillationsgefäße überführt. Der Dissoziationspuffer dient dazu um das an der Oberfläche der Zellen gebundene, nicht internalisierte, [<sup>3</sup>H]-BK abzulösen. Als nächster Schritt wurden die Zellen 10 Minuten mit 200µl 0,3M NaOH lysiert und quantitativ in Szintillationsgefäße überführt. Durch die NaOH werden die Zellen lysiert und der internalisierte Anteil an [<sup>3</sup>H]-BK kann erfasst werden. Abschließend werden die Szintillationsgefäße mit 0,8ml Szintillatorflüssigkeit

versehen, gemischt und im  $\beta$ -Counter vermessen. Unspezifische Bindung von [ $^3\text{H}$ ]-BK wurde durch die Zugabe von  $5\mu\text{M}$  unmarkierten Bradykinin bestimmt. Unter der Annahme, dass unter diesen Bedingungen alle Rezeptoren aufgrund des hohen Überschusses fast ausschließlich von unmarkierten Bradykinin besetzt werden, ist noch erfasste [ $^3\text{H}$ ]-Radioaktivität unabhängig vom  $\text{B}_2\text{R}$  und somit als unspezifisch zu werten. Dieser Wert wurde von der Gesamtbindung abgezogen. Die Internalisierung wurde prozentual zur Gesamtbindung ausgedrückt.

#### **D.2.3.6 Messung der Freisetzung von Arachidonsäure**

Diese Methode basiert auf dem Protokoll von Ricupero (1993). Die zu untersuchenden Zelllinien wurden auf 24-Kavitäten Zellkulturplatten ausplattiert. Konditioniertes DMEM Medium (10%FCS, 1% P/S) wurde nach 48 Stunden Kultivierung von HEK 293 Zellen gewonnen und steril filtriert. Dieses konditionierte Medium wurde mit [ $^3\text{H}$ ]-Arachidonsäure ( $0,5\mu\text{Ci/ Kavität}$ ) versetzt und auf die ausplattierten Zellen ( $500\mu\text{l/ Kavität}$ ) gegeben und diese 18 Stunden im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ ) weiter inkubiert. Für die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurde BSA verwendet, welches frei von Fettsäuren und Globulinen ist. Nach Waschen mit  $37^\circ\text{C}$  warmem DMEM Medium ( $2\text{mg/ml}$  BSA) wurden die Zellen 1 Stunde in DMEM Medium ( $2\text{mg/ml}$  BSA) im Brutschrank inkubiert. Bei Zugabe von Pertussistoxin wurde diese Inkubationszeit auf 4 Stunden erhöht. Nach einem Waschschrift mit  $37^\circ\text{C}$  warmem DMEM Medium ( $2\text{mg/ml}$  BSA) wurden die Zellen 20 Minuten mit  $1\mu\text{M}$  Bradykinin stimuliert. Anschließend wurden  $200\mu\text{l}$  je Kavität in Szintillationsgefäße überführt und mit  $0,8\text{ml}$  Szintillationsflüssigkeit versetzt und vermessen.

#### **D.2.3.7 Phospho-ERK1/2 Assay**

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden auf 24-Kavitäten Zellkulturplatten ausplattiert. Anschließend erfolgte eine transiente Transfektion mit dem  $\text{B}_2\text{Rwt}$ . Nach 5 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die weitere Kultivierung erfolgte in DMEM Medium mit 0,5% FCS. Der reduzierte FCS-Gehalt soll einen Stimulus auf den



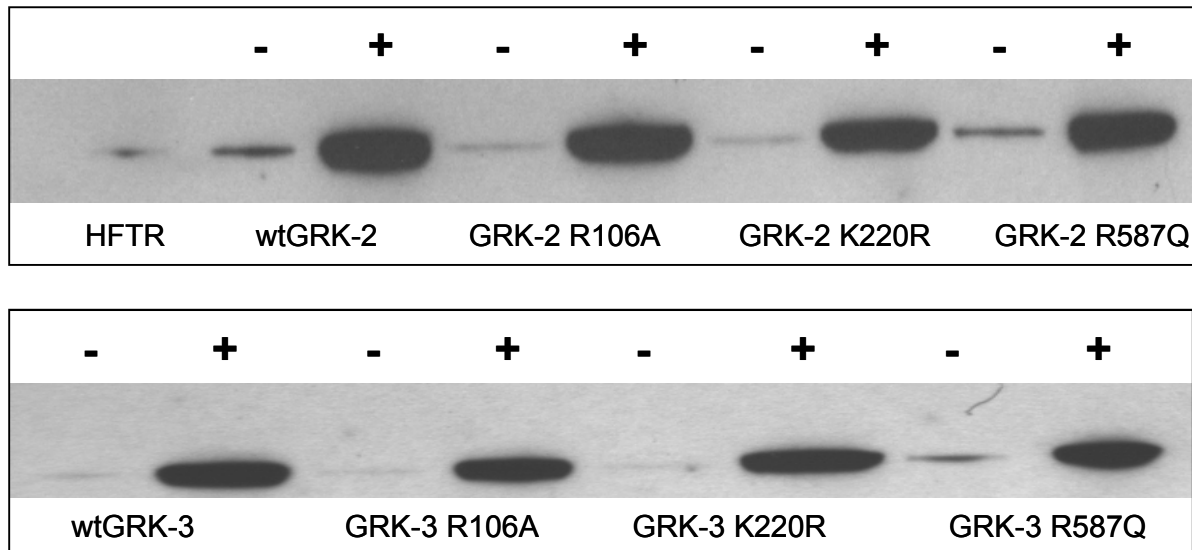
Rezeptor verhindern. Die Induktion der Zelllinien erfolgte mit Tetracyclin (1:1000). 12-16 Stunden später wurden die Zellen 3x mit PBS bei 4°C gewaschen und 30 Minuten bei 4°C mit 1µM Bradykinin inkubiert. Bradykinin wurde im B<sub>2</sub>-Puffer angesetzt. Die Stimulation erfolgte für 10 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS bei 4°C gewaschen und in 300µl Lysepuffer (Roche), welcher Protease Inhibitoren beinhaltet, lysiert. Das Lysat wurde bei 4°C in einer Eppendorffzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). Nach der Durchführung der Gelelektrophorese und Transfer mittels Western-Blot (D.2.3.3) wurde die Nitrocellulose-Membran mit 0,5% Milchpulver in TBST-Puffer 1 Stunde bei 4°C blockiert. Der monoklonale Mausantikörper Phospho-ERK1/2 (1:2000) bzw. ERK1/2 (1:2000) wurde mit 0,5% Milchpulver in TBST-Puffer 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach den entsprechenden Waschschritten (3x10 Minuten mit TBST-Puffer) und der einstündigen Inkubation mit dem Anti-Mausantikörper (1:5000, HRP-markiert) erfolgte die Entwicklung mit der Western Lightning Chemilumineszenz Lösung (PerkinElmer) auf dem Autoradiografiefilm Hyperfilm ECL (Amersham).

## E ERGEBNISSE

### E.1 Regulierbare Expression der GRK Mutanten

Um die Interaktionen zwischen GRKs und dem B<sub>2</sub>R-Wildtyp (B<sub>2</sub>Rwt) genauer zu untersuchen wurden die Punktmutationen R106A, K220R und R587Q mittels gezielter Mutagenese (D.2.1.2) in die wtGRK-2 und wtGRK-3 eingefügt. Die molekularbiologischen Techniken sind im Methodenteil (D.2.1) detailliert beschrieben. Alle GRK Mutanten wurden vollständig sequenziert und mittels Flp-In<sup>TM</sup>-T-REx<sup>TM</sup> Expressionssystem (D.2.2.3) stabil in HEK293 Zellen transfiziert. Dieses System ermöglicht die Herstellung stabiler isogener Klone. Das bedeutet, dass die Plasmide mit den entsprechenden Genen an demselben Ort im Genom eingebaut werden. Daraus ergibt sich, dass die Expression eines Proteins in jedem selektionierten Klon identisch ist, bzw. dass Unterschiede bei der Expression verschiedener Konstrukte in erster Linie von diesen selbst abhängen (Turn-over, Transport, etc.) und nicht durch unterschiedliche Einbaupositionen im Genom bedingt sein können. Dies bedeutet eine wesentliche Erleichterung für die Vergleichbarkeit und Interpretation der Experimente. Die Expression der Konstrukte ist bei Verwendung eines entsprechenden Vektors (pcDNA5/FRT/TO) und entsprechender Zellen (Flp-In<sup>TM</sup>-T-REx<sup>TM</sup> HEK293) prinzipiell durch Tetrazyklin induzierbar. Die Zellklone wurden nach entsprechender Kultivierung und Selektion im Western-Blot auf ihre Expression und Regulierbarkeit durch Tetrazyklin getestet (Abbildung 18). Als Kontrolle diente das endogene Level der entsprechenden GRKs der Ausgangszelllinie HEK293. Ein Vergleich zwischen den nicht transfizierten HEK293 Zellen mit den nicht induziertem GRK Mutanten zeigt die geringe Durchlässigkeit (*leakiness*) des Systems, so dass nicht induzierte Zellen weitgehend mit nicht transfizierten Zellen gleichgesetzt werden können. Im Western-Blot zeigte sich die Induzierbarkeit der Genexpression für alle GRK Mutanten. Für die weiteren Versuchsreihen wurde sowohl vor als auch nach dem Experiment stets die Genexpression und Induzierbarkeit überprüft.



**Abbildung 18: Regulierbare Expression der GRK Mutanten (75kDa) im Western-Blot**

HEK293-Zellen wurden mithilfe des Flp-In<sup>TM</sup>-T-REx<sup>TM</sup> System mit den GRK Vektoren stabil transfiziert. Die Zelllinien wurden im Western-Blot mit anti-GRK-2 bzw. anti-GRK-3 *rabbit polyclonal* Antikörper auf die Regulierbarkeit der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+) getestet.

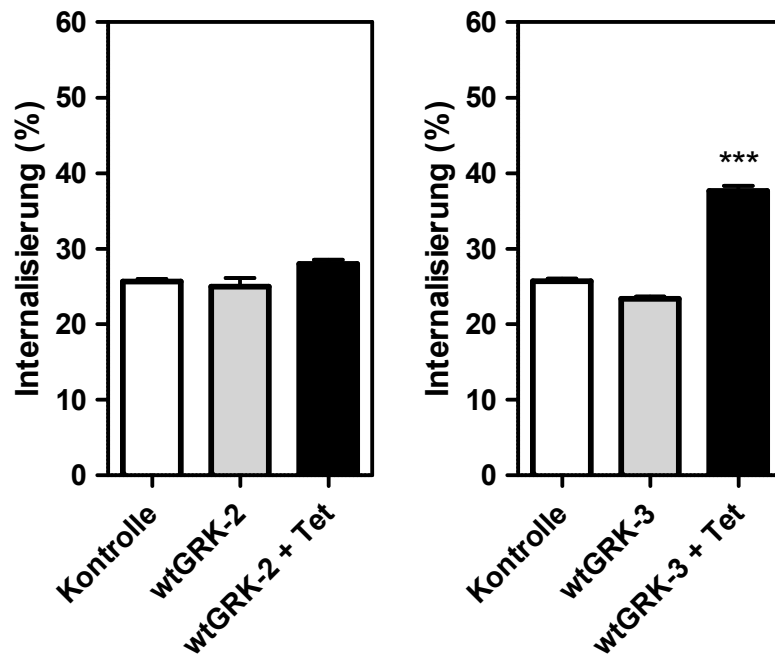
## E.2 Einfluss der GRK-2 und GRK-3 auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt

Stimulation des B<sub>2</sub>R mit Bradykinin (BK) führt zur Liganden-induzierten Rezeptor-Endozytose (Internalisierung). Durch Translokation gelangt der Rezeptor mit seinem Liganden von der Zelloberfläche in den Intrazellulärraum. Die radioaktive Markierung des BKs ermöglicht uns, seinen Weg zu verfolgen. Dies beruht auf der Annahme, dass die Endozytose abgeschlossen ist, bevor der Rezeptor-Ligand Komplex dissoziiert.

Die hergestellten Zelllinien (E.1) wurden transient mit dem B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach Erreichen der Gleichgewichtseinstellung der Bindung bei 4°C mit 10nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin, wurde die Internalisierung für 10 Minuten bei 37°C gemessen. Unspezifische Bindung wurden mit 10nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin und 5µM unmarkiertem Bradykinin bestimmt. Unter der Annahme, dass der B<sub>2</sub>R aufgrund der hohen Konzentration mit unmarkierten Bradykinin besetzt ist, ist noch vorhandende Radioaktivität nicht rezeptorgebunden und damit unspezifisch. Dieser unspezifische Wert wurde entsprechend von der Bindung in Abwesenheit des unmarkierten Bradykinins abgezogen um die spezifische [<sup>3</sup>H]-BK Bindung zu erhalten. Das an der

Zelloberfläche gebundene radioaktivmarkierte BK kann mit Hilfe von Essigsäure/Natriumchlorid gelöst werden. Der internalisierte Anteil kann durch Lyse der Zellen mit Natronlauge bestimmt werden. Die Gesamtbindung ist die Summe aus oberflächengebundenem (Essigsäure-resistenten) und internalisierten [ $^3\text{H}$ ]-Bradykinin. Die Internalisierung wurde in allen folgenden Experimenten prozentual zur Gesamtbindung ausgedrückt. Die Konzentration an Bradykinin ist entscheidend für die Internalisierungsrate. Die Internalisierungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Anzahl der mit Bradykinin besetzten Rezeptoren (Faussner et al., 2003). Bei 1nM [ $^3\text{H}$ ]-Bradykinin ist die Internalisierungsrate maximal (ungefähr 80-90% nach 10 Minuten), da auch bei Überexpression des Rezeptors nur wenige mit [ $^3\text{H}$ ]-Bradykinin besetzt sind. Bei höheren [ $^3\text{H}$ ]-Bradykininkonzentrationen können so viele Rezeptoren mit [ $^3\text{H}$ ]-Bradykinin besetzt werden, dass die Internalisierungsmaschinerie der Zelle überfordert ist und die Internalisierungsrate relativ langsam ist. Für die folgenden Experimente wurde 10nM [ $^3\text{H}$ ]-Bradykinin eingesetzt, sodass eine oder mehrere Komponenten der Internalisierungsmaschinerie limitierend werden. Durch Überexpression können so möglicherweise limitierende Komponenten identifiziert werden.

Durch systematische Analyse der Überexpression der GRK-2 bis GRK-6 konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass nur die GRK-2 und GRK-3 einen verstärkten Einfluss auf die Desensibilisierung des ERK1/2 Signal nach B<sub>2</sub>Rwt Stimulation hatten (Dissertation Wirth, 2011). Basierend auf diesen Vorarbeiten beschränkte sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung der GRK-2 und GRK-3. Es zeigte sich bei Überexpression der GRK-3 eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Steigerung der Internalisierungsrate des transient exprimierten B<sub>2</sub>R. Die Internalisierungsrate konnte durch Überexpression der GRK-2 nur geringfügig gesteigert werden. Als Kontrolle dienten in allen durchgeführten Internalisierungsversuchen B<sub>2</sub>Rwt transfizierte HEK293-Zellen, bzw. Zellen bei denen die Expression der entsprechenden GRKs nicht induziert wurde (Abbildung 19).



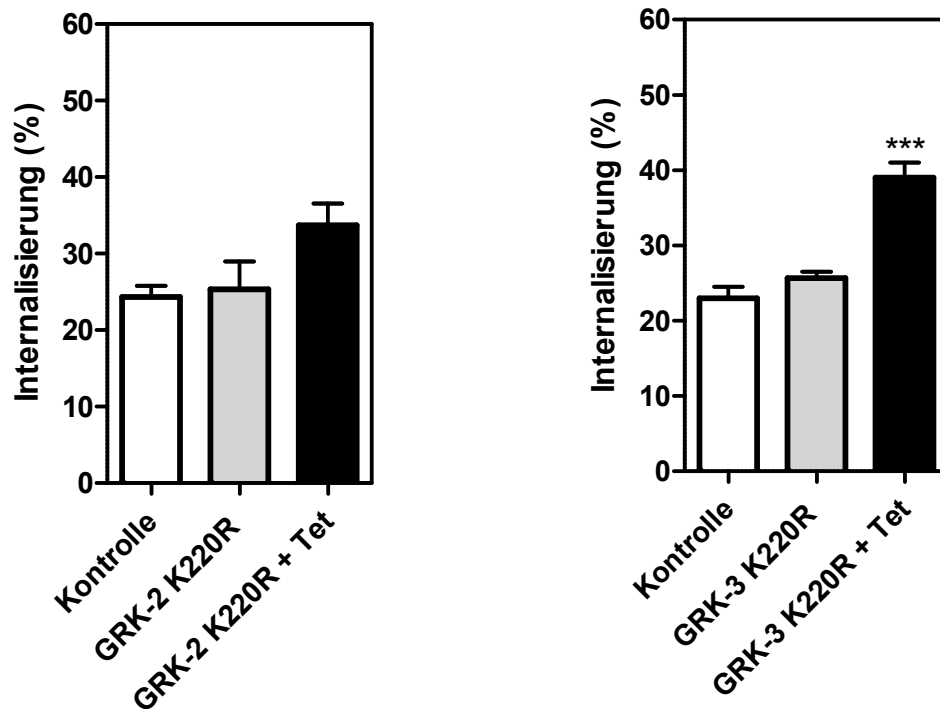
**Abbildung 19: Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt bei Überexpression der wtGRK-2 bzw. wtGRK-3**

HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von wtGRK-2 bzw. wtGRK-3 wurden transient mit B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung der Internalisierung nach 10 Minuten Stimulation mit 10nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM der Dreifachwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls multiple comparison test. (p-Wert: \*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,001).

### E.3 Einfluss der Kinase-inaktiven GRK-2 K220R und GRK-3 K220R auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass vor allem die GRK-3 eine wesentliche limitierende Rolle bei der Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt spielt, wurde in den folgenden Experimenten die Bedeutung der Kinaseaktivität der GRK-3, aber auch der GRK-2 für die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt untersucht. Durch gezielte Punktmutationen wurden die Kinase-inaktiven Mutanten GRK-2 K220R und GRK-3 K220R erzeugt. Diese Mutanten wurden erstmals 1994 von Kong et al. beschrieben. Im Internalisierungsexperiment zeigte sich, dass auch bei Überexpression der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R eine signifikante Steigerung (p<0,001) der Internalisierungsrate zu messen war. Bei der GRK-2 Mutante K220R ließ sich zwar ein ähnlicher Trend beobachten, der aber nicht signifikant wurde (Abbildung 20). Es

zeigte sich kein Unterschied zwischen der wtGRK-3 und der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R bei der Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt. Trotz fehlender Kinaseaktivität können daher GRK-3 und wahrscheinlich auch die GRK-2 die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt beschleunigen.



**Abbildung 20: Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt bei Überexpression von kinase-defizienten Mutanten (K220R) der GRK-2 bzw. GRK-3**

HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von GRK-2 K220R bzw. GRK-3 K220R wurden transient mit B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung der Internalisierung nach 10 Minuten Stimulation mit 10nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM der Dreifachwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls multiple comparison test. (p-Wert: \*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,001).

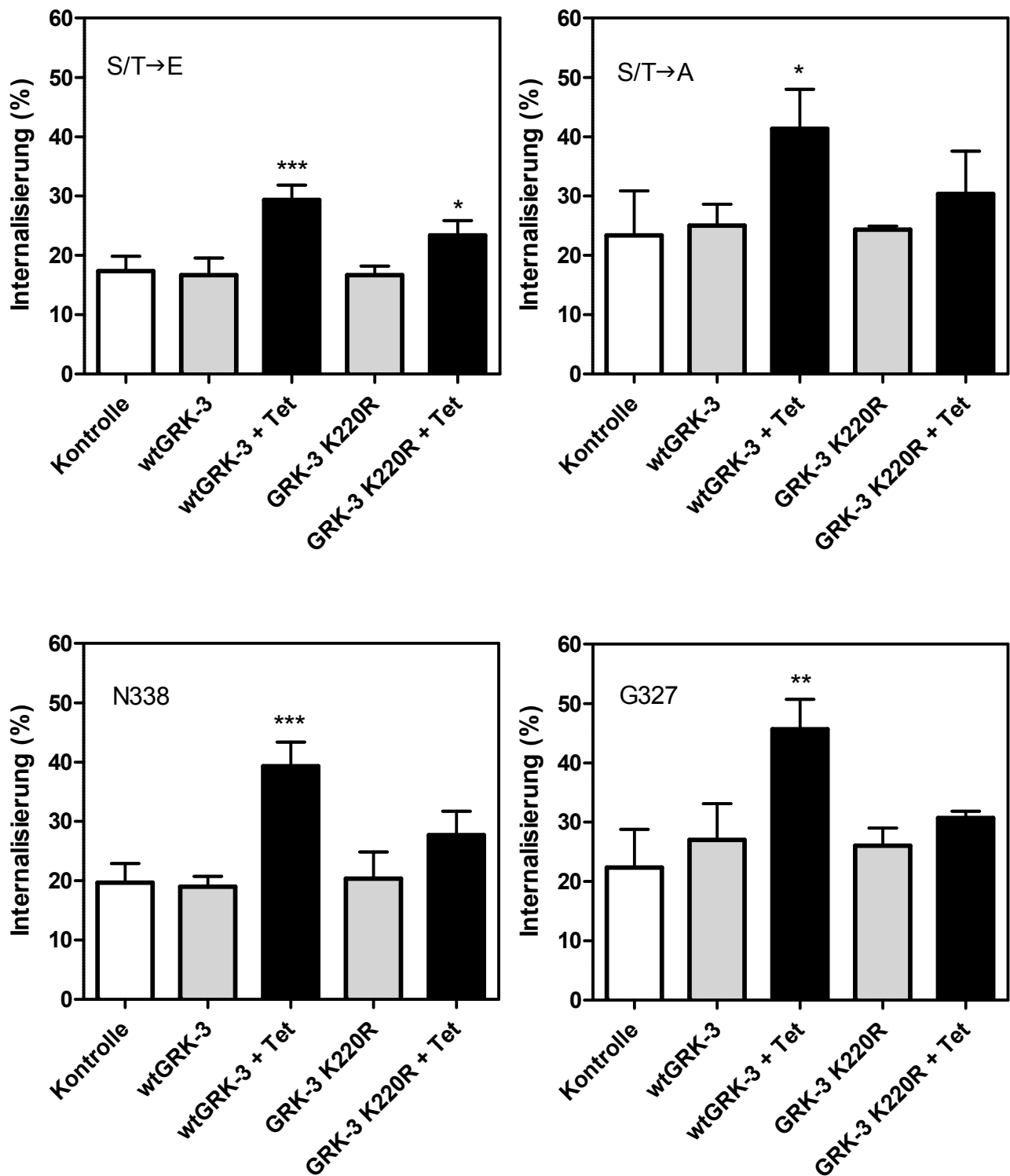
#### **E.4 Einfluss der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R auf die Internalisierung ausgewählter B<sub>2</sub>R Mutanten**

Wie oben gezeigt ist für die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt die GRK-3 von besonderer Bedeutung, wobei die Kinaseaktivität dafür nicht notwendig ist. In den folgenden Versuchen wurden verschiedene B<sub>2</sub>R Mutanten verwendet (Abbildung 21). Bei der Mutante S/T→E wurden alle fünf potentiellen Phosphorylierungsstellen, also die

Serine 339, 346 und 348 und die Threonine 342 und 345 gegen Glutaminsäuren ausgetauscht. Glutaminsäure ist eine negativ geladene Aminosäure und imitiert damit in gewisser Weise eine Phosphorylierung der ursprünglichen Stelle, auch wenn natürlich die negative Ladung nur ungefähr halb so stark ist. Es zeigte sich sowohl bei der Überexpression der wtGRK-3 als auch bei der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R eine signifikante Steigerung der Internalisierungsrate der Rezeptormutante S/T→E. Bei der Mutante S/T→A wurden alle Serine und Threonine gegen Alanine ausgetauscht. Dies führt dazu, dass der Rezeptor an sich keine Phosphorylierungsstellen mehr aufweist. Jedoch konnte auch hier bei der wtGRK-3 ein signifikanter steigender Einfluss auf die Internalisierung gezeigt werden. Bei der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R hingegen ist lediglich ein Trend zu erkennen. Zusätzlich wurden diese Experimente mit zwei B<sub>2</sub>R Mutanten durchgeführt, die einen verkürzten C-Terminus (N338\*) bzw. keinen C-Terminus mehr haben (G327\*) und daher auch keine Phosphorylierungsstellen aufweisen. Aber auch hier zeigte sich bei Überexpression der wtGRK-3 eine signifikante Steigerung der Internalisierungsrate. Die Kinase-inaktive GRK-3 Mutante K220R weist bestenfalls noch nur einen Trend in diese Richtung auf (Abbildung 22).



Abbildung 21: Der C-Terminus des B<sub>2</sub>R und der B<sub>2</sub>R Mutanten S/T→A; S/T→E; N338\*; G327\* (modifiziert nach Wirth, 2011)



**Abbildung 22: Internalisierung der B<sub>2</sub>R Mutanten nach Überexpression mit wtGRK-3 und GRK-3 K220R**

HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von wtGRK-3 bzw. GRK-3 K220R wurden transient mit B<sub>2</sub>R Mutanten (S/T→E;S/T→A;N338\*;G327\*) transifiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung der Internalisierung nach 10 Minuten Stimulation mit 10nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM der Dreifachwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way



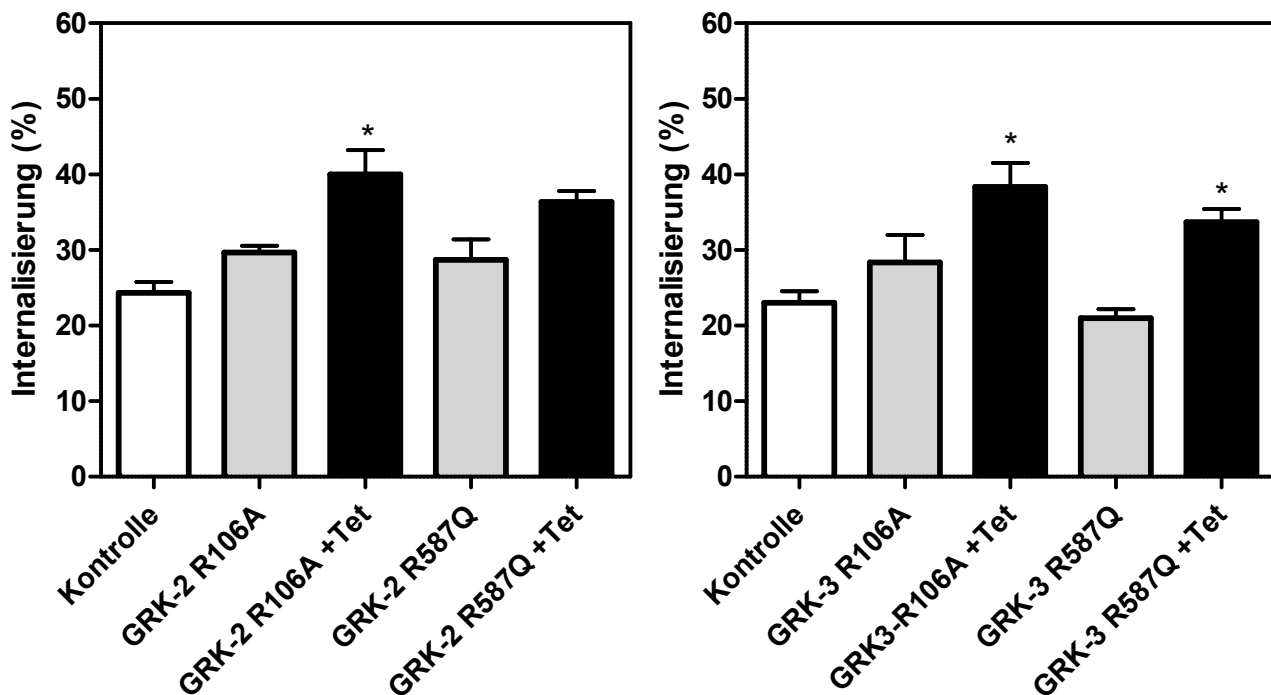
ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls multiple comparison test. (p-Wert: \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass nur beim B<sub>2</sub>Rwt oder bei einer Mutation der Phosphorylierungsstellen zu einem eine Phosphorylierungs-imitierenden Glutamat eine Steigerung der Internalisierungsrate durch die GRK-3 unabhängig von deren Kinaseaktivität ist. Für alle anderen Fälle, d. h. Mutation der Serine/Threonine zu Alaninen oder ihrer Abwesenheit wegen Verkürzung des C-Terminus ist eine GRK-3 Kinaseaktivität zur signifikanten Steigerung der Internalisierungsrate unerlässlich.

### **E.5 Einfluss der GRK-2 und GRK-3 Mutanten R106A und R587Q auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt**

GRK-2 und GRK-3 sind in der Lage über ihre RH Domäne mit der G-Proteinuntereinheit G<sub>αq/11</sub> zu interagieren. Um zu bestimmen inwieweit diese Funktion von GRK-2/-3 einen Einfluss auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt hat, wurden die GRK-2/-3 Mutanten R106A hergestellt. Diese sind im Gegensatz zu den wtGRKs nicht mehr in der Lage die G-Proteinuntereinheit G<sub>αq</sub> zu binden (Luo et al., 2008). Hier zeigte sich, dass sowohl GRK-2 R106A als auch GRK-3 R106A ähnlich wie die wtGRK-2/-3 die Internalisierungsrate des B<sub>2</sub>Rwt signifikant steigern konnten ( $p<0,05$ ). Neben der RH Domäne verfügen die GRK-2 und die GRK-3 auch über eine PH (*pleckstrin homology*) Domäne, welche mit den freien G-Proteinuntereinheiten G<sub>βγ</sub> interagieren kann. Nach gängigen Modellvorstellungen werden GRK-2/-3 auf diese Weise durch die nach einer G-Protein-Aktivierung in der Umgebung des stimulierten Rezeptors vorhandenen freien G<sub>βγ</sub> G-Proteinuntereinheiten rekrutiert. Um den Einfluss dieser Interaktion auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt zu untersuchen, wurde die GRK-Mutante R587Q generiert, da diese Mutation die Fähigkeit der GRK eliminiert an G<sub>βγ</sub> zu binden (Carman et al., 2000). Auch diese GRK Mutanten konnten die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt steigern, jedoch wurde diese Steigerung nur für die GRK-3 Mutante R587Q signifikant ( $p<0,05$ ). Dennoch ist auch bei der GRK-2 Mutante R587Q eine Tendenz zur Steigerung der Internalisierung zu erkennen (Abbildung 23). Folglich ist die Rekrutierung der GRK-2/-3 über freigesetzte

$G_{\beta\gamma}$  G-Proteinuntereinheiten nicht unbedingt für die Internalisierung des  $B_2$ Rwt notwendig.



**Abbildung 23: Internalisierung des  $B_2$ Rwt bei Expression mit GRK-2 bzw. GRK-3 R106A und R587Q**

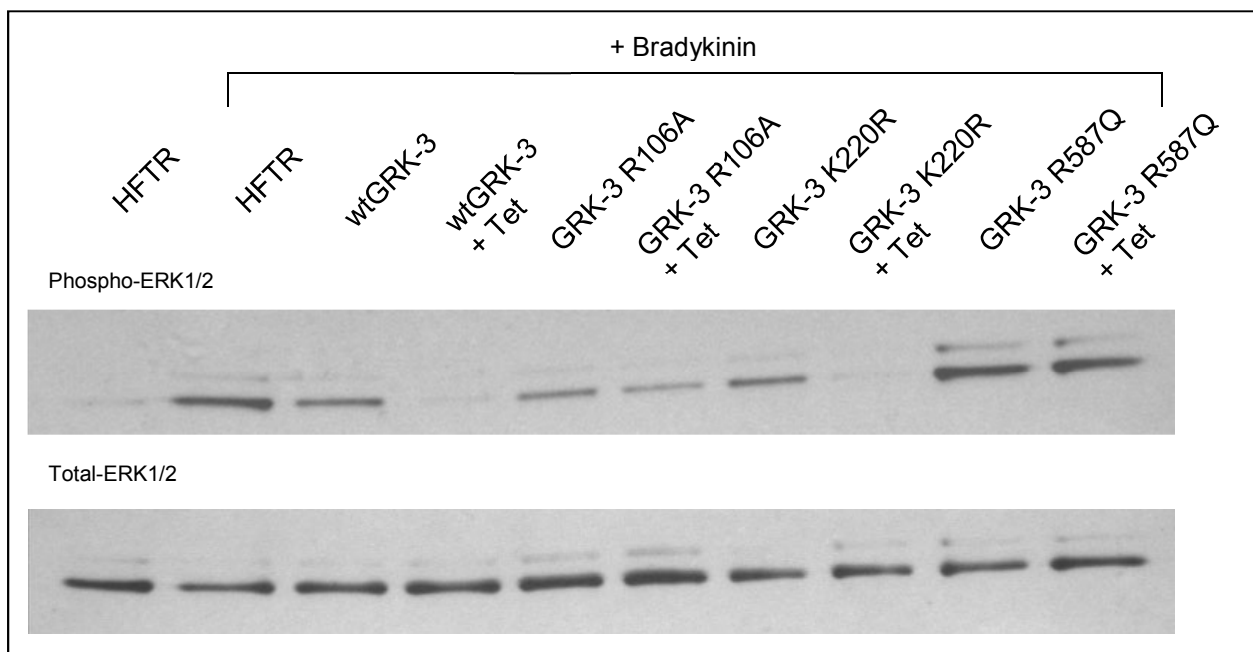
HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von GRK-2 bzw. GRK-3 R106A und R587Q wurden transient mit  $B_2$ Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung der Internalisierung nach 10 Minuten Stimulation mit 10nM [ $^3$ H]-Bradykinin. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Dreifachwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls multiple comparison test. (p-Wert: \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ).

## E.6 Einfluss von wtGRK-3 und GRK-3 Mutanten R106A, K220R und R687Q auf das Phospho-ERK1/2 und Total-ERK1/2 Signal

Im folgenden Experiment sollte die Abhängigkeit des durch den  $B_2$ Rwt aktivierbaren ERK1/2 Signalwegs sowohl von der Kinaseaktivität der GRK-3 als auch von ihrer Interaktion mit den G-Proteinuntereinheiten  $G_{\alpha q/11}$  bzw.  $G_{\beta\gamma}$  geklärt werden. Hierfür wurden HEK293 Zellen verwendet, welche stabil die wtGRK-3 bzw. die GRK-Mutanten R106A, R587Q und K220R exprimieren. Diese Zelllinien wurden transient mit dem  $B_2$ Rwt transfiziert und anschließend 10 Minuten mit 1 $\mu$ M Bradykinin stimuliert. Mit den entsprechenden Antikörpern konnte das Phospho-ERK1/2 und das

Total-ERK1/2 Signal im Western-Blot dargestellt werden. HEK293 Zellen, welche transient mit dem B<sub>2</sub>Rwt transfiziert wurden, zeigen nach Stimulation mit Bradykinin ein deutliches Phospho-ERK1/2 Signal. Bei Überexpression der wtGRK-3 und Expression der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante K220R zeigte sich eine deutliche Unterdrückung des Phospho-ERK1/2 Signal. Die Expression der GRK-Mutanten R106A und R587Q hingegen konnten das PhosphoERK1/2 Signal nicht inhibieren (Abbildung 24).

Dies zeigt, dass für das Abschalten des ERK1/2 Signals durch die GRK-3, ihre Rekrutierung durch die freigesetzten G<sub>βγ</sub> Untereinheiten und ihre Fähigkeit die aktivierten G<sub>α<sub>q/11</sub></sub> Untereinheiten nach ihrer Freisetzung durch den stimulierten B<sub>2</sub>R zu binden/abzufangen, von entscheidender Bedeutung ist.

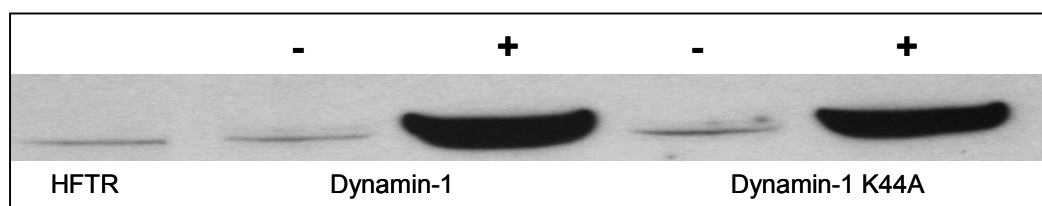


**Abbildung 24: Das ERK1/2 Signal der wtGRK-3 und der GRK-3 Mutanten R106A, K220R, R587Q**

HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von wtGRK-3 und GRK-3 Mutanten (R106A, K220R, R587Q) wurden transient mit B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung des ERK1/2 Signal im Western-Blot nach 10 Minuten Stimulation mit 1µM Bradykinin für 10 Minuten bei 37°C.

## E.7 Regulierbare Expression von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A Mutante

Für die folgenden Experimente wurde sowohl die wtDynamin-1 als auch die dominant-negative Dynamin-1 K44A Sequenz in den pcDNA5/FRT/TO Vektor eingebaut und stabil in die HEK293-Zellen transfiziert. Die Expression sowie die Regulierbarkeit durch Tetrazyklin der entsprechenden Klone wurde im Western-Blot getestet (Abbildung 25). Als Kontrolle diente das endogene Level an Dynamin in nicht transfizierten HEK293 Zellen.



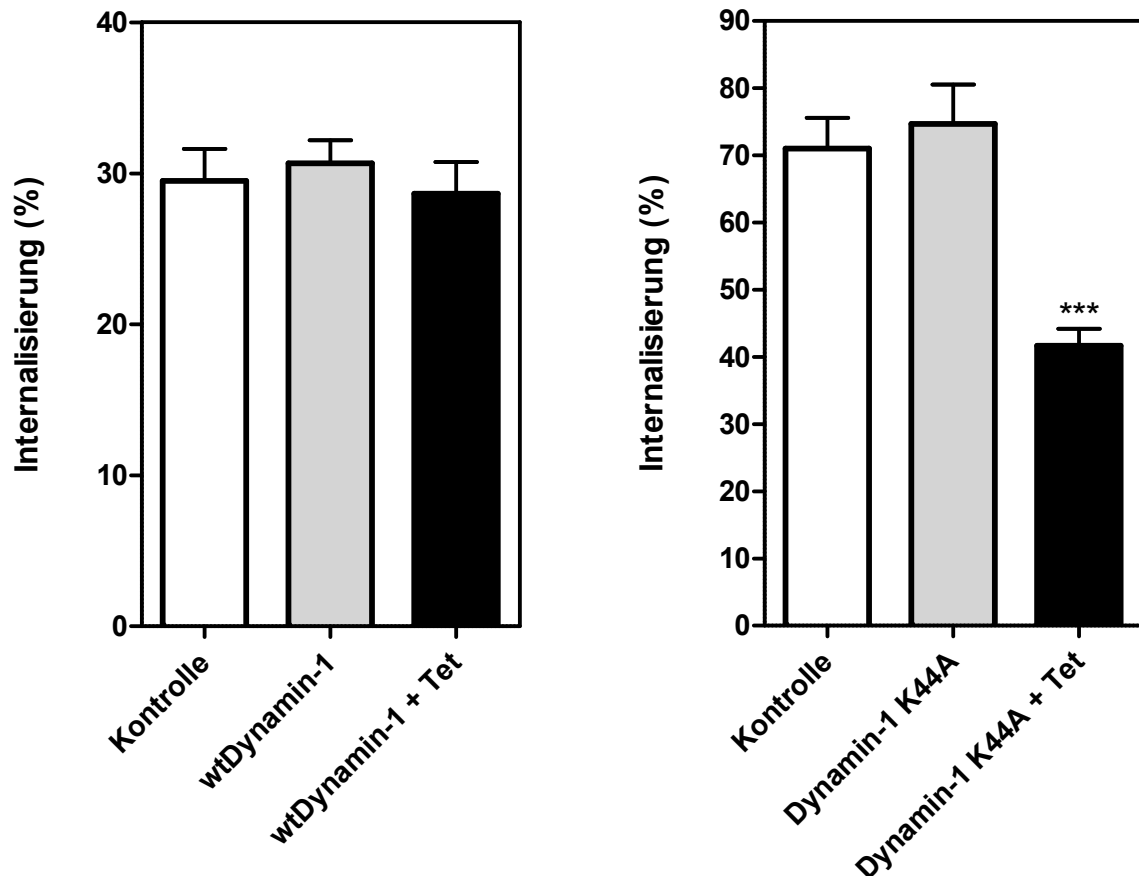
**Abbildung 25: Regulierbare Expression von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A im Western-Blot (83kDa)**

HEK293 Zellen wurden mit dem Dynamin-Vektor stabil transfiziert. Die Zelllinien wurden im Western-Blot mit anti-Dynamin/II *rabbit polyclonal* Antikörper auf die Regulierbarkeit der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+) getestet.

## E.8 Einfluss von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt

Zunächst wurde untersucht, ob eine Überexpression von wtDynamin-1 die Internalisierungsrate des B<sub>2</sub>Rwt steigern kann. Die Experimente wurden mit 10nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin durchgeführt um limitierende Faktoren zu erfassen. Es zeigte sich, dass trotz Überexpression von wtDynamin-1, die Internalisierungsrate nicht erhöht war (Abbildung 26 links). Dies spricht gegen eine limitierende Rolle für Dynamin bei der B<sub>2</sub>R Internalisierung. Für die folgenden Versuche mit der Dynamin-1 K44A Mutante wurde eine 1nM [<sup>3</sup>H]-Bradykinin Konzentration verwendet. Unter diesen Bedingungen sollte keine Komponente *per se* für die Internalisierung limitierend sein und prinzipiell eine maximale Internalisierungsrate möglich sein, da trotz Überexpression des Rezeptors nur ein Teil der Rezeptoren durch [<sup>3</sup>H]-Bradykinin

besetzt werden. Durch die Expression von Dynamin-1 K44A konnte eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Verminderung der Internalisierung gezeigt werden (Abbildung 26 rechts). Die dominant negative Wirkung der Dynamin-1 K44A Mutante auf die B<sub>2</sub>R Internalisierung zeigt, dass Dynamin-1 an der Internalisierung des B<sub>2</sub>R beteiligt ist.

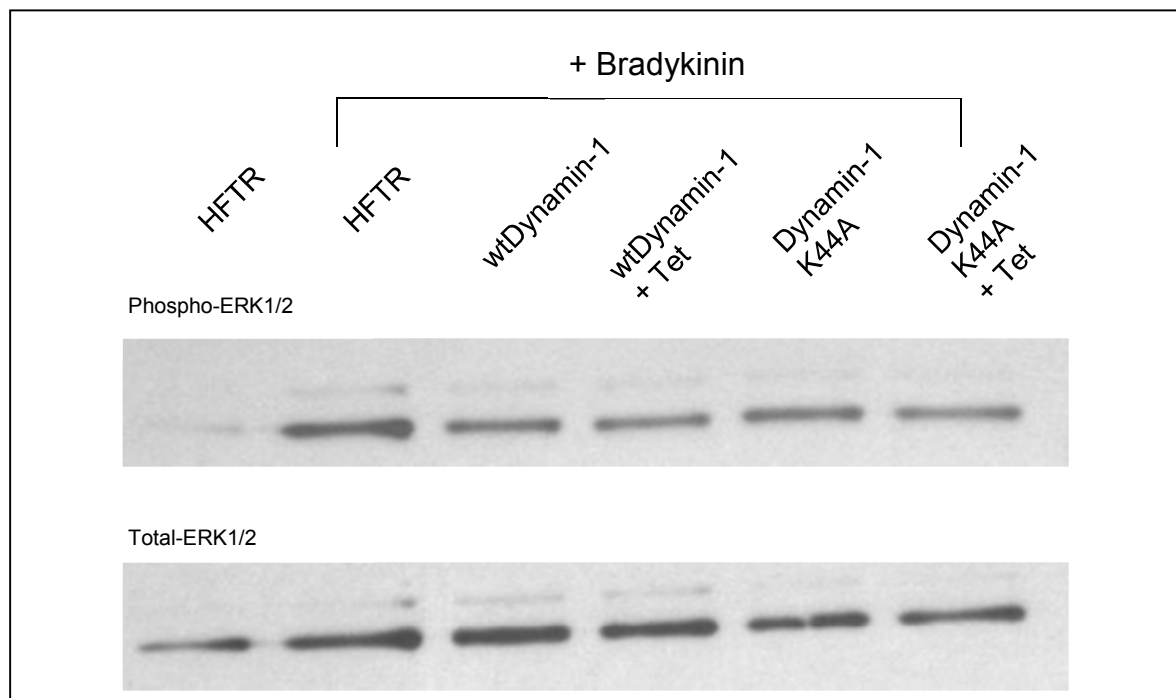


**Abbildung 26: Internalisierung des B<sub>2</sub>Rwt bei Überexpression von wtDynamin-1 (links) und Expression von Dynamin-1 K44A (rechts)**

HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von wtDynamin-1 bzw. Dynamin-1 K44A wurden transient mit B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung der Internalisierung nach 10 Minuten Stimulation mit 10nM (wtDynamin-1) bzw. 1nM (Dynamin-1 K44A) [<sup>3</sup>H]-Bradykinin. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Dreifachwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls multiple comparison test. (p-Wert: \* $< 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ ; \*\*\* $< 0,001$ ).

### E.9 Phospho-ERK1/2 und Total-ERK1/2 Signal von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A

Um den Einfluss von wtDynamin-1 und der dominant-negativen Dynamin-1 Mutante K44A auf den ERK1/2 Signalweg zu untersuchen, wurde mit den entsprechenden Zellen die Phosphorylierung von ERK1/2 bestimmt. Sowohl bei Überexpression von wtDynamin-1 als auch bei Expression der Dynamin-1 Mutante K44A zeigte sich aber kein Einfluss auf das Phospho-ERK1/2 Signal (Abbildung 27). Dynamin-1 spielt daher offensichtlich keine wesentliche Rolle bei der Terminierung des durch B<sub>2</sub>R Stimulation ausgelösten ERK1/2 Signals.

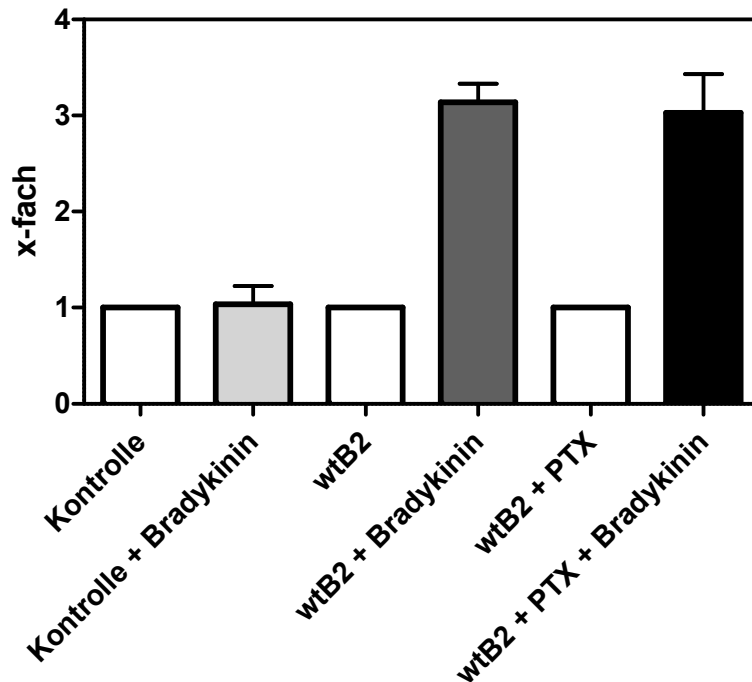


**Abbildung 27: ERK1/2-Signal des B<sub>2</sub>Rwt bei Überexpression von wtDynamin-1 und Expression von Dynamin-1 K44A im Western-Blot**

HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von wtDynamin-1 und Dynamin-1 K44A wurden transient mit mit B<sub>2</sub>Rwt transfiziert. Nach 5 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von Tetrazyklin (+Tet). Kultivierung der Zellen für weitere 12 Stunden. Anschließend Messung des ERK1/2 Signal im Western-Blot nach 10 Minuten Stimulation mit 1µM Bradykinin für 10 Minuten bei 37°C.

### E.10 Bestimmung der Arachidonsäurefreisetzung nach Stimulation des B<sub>2</sub>R

Um die Freisetzung von Arachidonsäure bzw. deren Metabolite zu messen, musste zunächst eine entsprechende Methode etabliert werden. Grundlage war die Methode von Ricupero *et al.* (1993). Die Voraussetzung für diesen Versuch war die Verwendung eines Zellmediums, welches einerseits die Freisetzung von Arachidonsäure nicht induziert, andererseits aber das Überleben der Zellen sicherstellt. Um diesem Aspekt gerecht zu werden, wurde ein konditioniertes Medium verwendet. Dazu wurden HEK293 Zellen 48 Stunden in DMEM Medium (10% FCS) kultiviert und dieses anschließend steril filtriert. In diesem konditionierten Medium wurden HEK293 Zellen, welche den B<sub>2</sub>Rwt stabil und regulierbar exprimieren mit [<sup>3</sup>H]-Arachidonsäure versetzt und 18 Stunden inkubiert. Für die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurde ausschließlich auf 37°C vorgewärmtes DMEM Medium mit BSA (2mg/ml) verwendet, welches frei von Fettsäuren und Globulinen war. Dadurch sollte ein Stimulus auf die Zelle möglichst gering gehalten werden. In dem durchgeführten Experiment zeigte sich bei Stimulation des B<sub>2</sub>Rwt mit Bradykinin (1µM) eine deutlich messbare Freisetzung von Arachidonsäure bzw. deren Metabolite. Diese Freisetzung konnte auch dann gemessen werden, wenn die Zellen vorher zusätzlich 4 Stunden mit dem G<sub>i</sub> Inhibitor Pertussistoxin (100ng/ml) inkubiert wurden (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Arachidonsäurefreisetzung des B<sub>2</sub>Rwt**

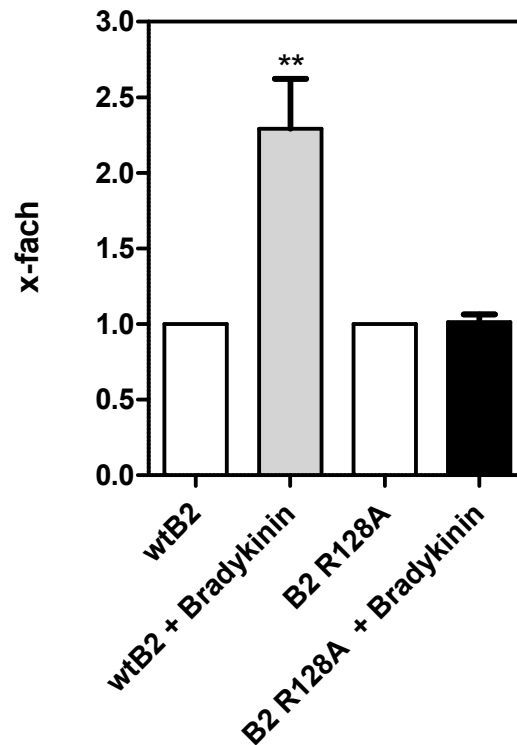
HEK293 Zellen ohne (Kontrolle) und mit stabiler regulierbarer Überexpression von B<sub>2</sub>Rwt wurden in 0,5μCi [<sup>3</sup>H]-Arachidonsäure inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1μM Bradykinin für 20 Minuten. Außerdem wurde die Arachidonsäurefreisetzung bei Zugabe von 100ng/ml Pertussistoxin (PTX) gemessen. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM der Dreifachwerte.

### E.11 Arachidonsäurefreisetzung des B<sub>2</sub>Rwt im Vergleich zur B<sub>2</sub>R Mutante R128A

Die Mutation R128A in der hochkonservierten DRY Sequenz führt beim B<sub>2</sub>R wahrscheinlich zu einem Verlust der Fähigkeit mit den entsprechenden G-Proteinen zu interagieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die B<sub>2</sub>R Mutante R128A zwar internalisiert wird, jedoch nicht mehr in der Lage ist IP<sub>3</sub> freizusetzen oder ERK1/2 Phosphorylierung zu erzeugen. Es stellte sich als Nebenschauplatz dieser Dissertation die Frage, inwieweit der Mechanismus und die Regulation der Freisetzung der Arachidonsäure durch den B<sub>2</sub>R unabhängig von seiner G<sub>αq/11</sub>- und ERK1/2-Aktivierung ist. Im folgenden Experiment wurde daher die Freisetzung von [<sup>3</sup>H]-Arachidonsäure bzw. deren Metabolite gemessen. Dazu wurden HEK293 Zellen verwendet, welche entweder den B<sub>2</sub>Rwt oder die B<sub>2</sub>R Mutante R128A stabil exprimieren. Es zeigte sich bei Überexpression des Wildtyps eine signifikante



Steigerung ( $p < 0,01$ ) der [ $^3\text{H}$ ]-Arachidonsäurefreisetzung nach Stimulation mit  $1\mu\text{M}$  Bradykinin. Bei Expression der Rezeptormutante R128A konnte hingegen nach Bradykininstimulation keine Freisetzung von [ $^3\text{H}$ ]-Arachidonsäure gemessen werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: [ $^3\text{H}$ ]-Arachidonsäurefreisetzung des  $\text{B}_2\text{R}$ wt und der  $\text{B}_2\text{R}$  Mutante R128A**

HEK293 Zellen mit stabiler Überexpression vom  $\text{B}_2\text{R}$ wt und stabiler Expression der  $\text{B}_2\text{R}$  Mutante R128A wurden mit  $0,5\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-Arachidonsäure inkubiert. Die Messung der Arachidonsäure erfolgte nach Stimulation mit  $1\mu\text{M}$  Bradykinin für 20 Minuten. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Dreifachwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls multiple comparison test. (p-Wert: \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Regulation der Arachidonsäurefreisetzung durch den aktivierten  $\text{B}_2\text{R}$  dieselben Mechanismen zugrunde liegen wie der Terminierung des ERK1/2-Signals. Aus diesem Grund wurde auf eine eingehendere Untersuchung der Regulation der Freisetzung mittels der verschiedenen GRK-2/-3 und Dynamin1-Konstrukte verzichtet.

## F DISKUSSION

### F.1 Spezifität der GRK-2 und GRK-3 für den B<sub>2</sub>R

Für die Desensibilisierung von GPCRs gilt eine allgemein akzeptierte Modellvorstellung vorwiegend basierend auf Forschungsergebnissen des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors. Die Signalterminierung kann demnach über die G-Proteinaktivierung mit ihrer Freisetzung von  $G_{\beta\gamma}$  Untereinheiten und der Rekrutierung von GRK-2/-3, durch Phosphorylierung durch die GRK-2/-3 als auch über  $\beta$ -Arrestine-vermittelte Internalisierung erfolgen. Die physiologische Relevanz dieser regulatorischen Mechanismen zeigt sich besonders in der Tatsache, dass zahlreiche Krankheitsbilder eine Fehlregulation auf Ebene der GRKs (Gurevich et al., 2011) aufweisen. Im Tiermodell konnte durch Überexpression der GRK-6 die bei der Therapie des Morbus Parkinson auftretenden Dyskinesien gemildert werden (Ahmed et al., 2010). Bekannt ist auch, dass bei Herzinsuffizienz die GRK-2 pathologisch hochreguliert ist. Es gibt bereits erste Ansätze einen spezifischen GRK-2 Inhibitor zur Behandlung der Herzinsuffizienz zu entwickeln (Thal et al., 2011).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die GRK-2 und die GRK-3 für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R eine wichtige Rolle spielt (Dissertation Wirth, 2011). Aufgrund dieser Vorarbeiten beschränkten sich die Experimente der vorliegenden Arbeit auf GRK-2 und GRK-3. Als besonders wichtig für die B<sub>2</sub>R Internalisierung und Abschaltung des ERK1/2 Signals erwies sich die GRK-3. Ihre Überexpression führt zu einer signifikanten Steigerung der Internalisierung des B<sub>2</sub>R (Abbildung 19), wohingegen Überexpression der GRK-2 lediglich einen Trend zur Steigerung der Internalisierung mit sich bringt. Die ERK1/2 Signal Abschaltung zeigte sich bei der GRK-3 deutlicher als bei der GRK-2. Dies weist daraufhin, dass die GRK-3 in HEK293 Zellen eine dominante Rolle sowohl für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R als auch für den ERK1/2 Signalweg spielt.

Bereits durchgeführte siRNA *knockdown* Experimente zeigen lediglich für die GRK-2, jedoch nicht für die GRK-3, eine signifikante Inhibierung der Internalisierung des B<sub>2</sub>R

(Dissertation Wirth, 2011). Dies lässt sich mit dem unterschiedlichen Expressionsniveau der GRK-2 und GRK-3 erklären. Es besteht zwar eine 85% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, das Expressionslevel der GRK-3 ist jedoch im Vergleich zur GRK-2 mit 10-20% der Gesamt-GRK-2/-3-Menge deutlich niedriger (Benovic et al., 1991). Der siRNA *knockdown* von GRK-3 kann daher wahrscheinlich durch die GRK-2 kompensiert werden, welche der GRK-3 quantitativ überlegen ist. Bei Überexpression der GRK-3 zeigt sich, dass die GRK-3 beim B<sub>2</sub>R deutlich effektiver die Internalisierung beschleunigt als die GRK-2. Es zeigt sich somit eine eindeutige Präferenz des B<sub>2</sub>R für die GRK-3. Physiologisch scheint jedoch die GRK-2 aufgrund des höheren Expressionsniveau in der Zelle die bedeutendere Rolle zu spielen. Trotz der starken Homologie der beiden GRKs weisen die Phänotypen der *knockout* Mäuse drastische Unterschiede auf. Homozygote GRK-2 *knockout* Mäuse sterben am Tag 15 in der Embryonalphase aufgrund eines „thin heart syndrome“ (Jaber et al., 1996). Heterozygote Mäuse weisen kardial eine verstärkte Erregbarkeit auf (Rockman et al., 1997). Im Gegensatz dazu sind die GRK-3 *knockout* Mäuse lebensfähig und zeigen keinen ausgeprägten kardialen Phänotyp. Jedoch besteht eine höhere Ansprechbarkeit auf cholinerge Reize (Walker et al., 1999). Außerdem kommt es zu einem olfaktorischen Verlust der Rezeptordesensibilisierung (Peppel et al., 1997). Interessant ist zudem, dass die Expression der GRKs innerhalb eines Organ unterschiedlich ist. Die GRK-2 überwiegt in den Endothelzellen des Herzen, in den Myozyten hingegen kommt vor allem die GRK-3 vor (Vinge et al., 2001).

Der Unterschied im Phänotyp der beiden *knockout* Mäuse beruht wahrscheinlich darauf, dass die GRK-3 eben nicht in der Lage ist die Funktion der GRK-2 zu kompensieren.

In der Literatur sind unterschiedliche Präferenzen der GPCRs für die GRKs beschrieben. Jedoch zeigt sich in der Zusammenschau der Veröffentlichungen ein deutliches Überwiegen der GRK-2. Es ist anzumerken, dass viele Autoren sich in ihren Experimenten auf die GRK-2 beschränken und ein Vergleich zwischen GRK-2 und GRK-3 oft nicht stattfindet.

Wir belegen erstmalig mit unseren Experimenten den Vorrang der GRK-3 gegenüber der GRK-2 in der Regulation des B<sub>2</sub>R. Es ist bisher ungeklärt, worauf die Präferenz für einen Rezeptors besteht. Hier würde sich das Klonieren von Rezeptor Chimären anbieten. Damit ließe sich feststellen, ob bestimmte Rezeptorregionen, insbesondere

die Helix 8, der unsere Arbeitsgruppe eine Funktion bei der Interaktion mit GRKs zuweisen konnte (Feierler et al., 2011), bevorzugt mit der GRK-2 oder bevorzugt mit der GRK-3 interagiert.

## **F.2 Abhängigkeit der Internalisierung des B<sub>2</sub>R von der Phosphorylierung durch die GRK-2 und GRK-3**

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des B<sub>2</sub>R zur Phosphorylierung von S339, S346 sowie T342 und T345 im C-Terminus führt (Blaukat et al., 2001). Eine wesentliche Aufgabe der GRKs ist die Phosphorylierung des Liganden-gebundenen Rezeptor. Interessanterweise konnte jedoch in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bei B<sub>2</sub>R-Mutanten, bei denen die Phosphorylierungsstellen vollständig mutiert wurden (S/T → A bzw. E) oder ein verkürzter C-Terminus (N338\*) bzw. fehlender C-Terminus (G327\*) vorlag, die Internalisierung bei Überexpression der GRK-2 bzw. der GRK-3 in HEK293 Zellen signifikant gesteigert werden konnte (Dissertation Wirth, 2011). Im Vergleich zum B<sub>2</sub>Rwt zeigte sich allerdings eine deutlich niedrigere Internalisierungsrate. Aufgrund der Steigerung der Internalisierung unabhängig vom Vorhandensein der Phosphorylierungsstellen und vom C-Terminus durch die GRK-2 und die GRK-3, stellte sich die Frage, ob die GRKs ihre Kinasefunktion für diesen Effekt benötigen. Um dem auf den Grund zu gehen, wurden Kinase-inaktive GRK-2 und GRK-3 Mutanten (K220R) kloniert und Internalisierungsexperimente im Vergleich zur wtGRK durchgeführt.

Sowohl die wtGRK-3 als auch die Kinase-inaktive GRK-3 Mutante K220R zeigte eine signifikante Steigerung im Internalisierungsverhalten des B<sub>2</sub>R in HEK293 Zellen (Abbildung 20). Die wtGRK-2 und die GRK-2 Mutante K220R erreichte zwar keine signifikante Steigerung der Internalisierung des B<sub>2</sub>R, jedoch ist ein deutlicher Trend erkennbar. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Internalisierung auch über eine direkte phosphorylierungsunabhängige Interaktion zwischen GRK-3 mit dem B<sub>2</sub>R stattfinden kann. Außerdem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass β-Arrestin-2 phosphorylierungsunabhängig über die Interaktion mit der Helix 8 des B<sub>2</sub>R die Internalisierung vermitteln kann (Feierler et al., 2011).

In einem nächsten Schritt wurde das Internalisierungsverhalten verschiedener B<sub>2</sub>R Mutanten mit der kinase-defizienten GRK-3 Mutante K220R untersucht. Dies soll klären, ob der B<sub>2</sub>R bei mutierten Phosphorylierungsstellen oder verkürztem bzw. fehlendem C-Terminus und zusätzlich fehlender Kinaseaktivität der GRK-3 internalisiert werden kann. Es zeigte sich, dass die Kinase-inaktive GRK-3 Mutante im direkten Vergleich zur wtGRK-3 die Internalisierung der B<sub>2</sub>R Mutanten nicht mehr signifikant steigern kann (Abbildung 22). Jedoch zeigte sich auch bei der Kinase-inaktiven GRK-3 Mutante ein gewisser Trend hin zu einer Steigerung der Internalisierung. Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgendes schlussfolgern: Fehlt entweder der C-Terminus oder die Kinaseaktivität, so ist trotzdem noch eine Steigerung der Internalisierung signifikant möglich. Fehlen jedoch beide Komponenten, so ist eine signifikante Steigerung der Internalisierungsrate nicht mehr möglich.

Wenn der C-Terminus mit seinen Phosphorylierungsstellen als Zielsequenz nicht vorhanden sein muss und auch die Kinaseaktivität der GRK für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R nicht entscheidend ist, stellt sich die Frage nach weiteren wesentlichen Interaktionsstellen zwischen GRK und B<sub>2</sub>R. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die dafür in Frage kommenden intrazellulären Schleifen des B<sub>2</sub>R als Zielsequenz für die GRKs keinen entscheidenden Einfluss auf die Internalisierung des B<sub>2</sub>R haben (Faussner et al., 2009). Eine weitere wichtige Struktur des B<sub>2</sub>R ist die intrazelluläre Helix 8. Diese Domäne scheint für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R wichtiger zu sein als das Vorhandensein des C-Terminus mit seinen Phosphorylierungsstellen (Feierler et al., 2011). Jedoch zeigte sich auch hier, dass bei Überexpression der wtGRK-3 die Internalisierungsrate einer B<sub>2</sub>R Mutante mit defekter Helix 8 (K135P, Mutation von Lys315 zu Helixbrecher Proline) signifikant gesteigert werden konnte. Wurde aber die defekte Helix 8 mit einer Verkürzung des C-Terminus kombiniert (K315P-G327\* Mutante) so konnte eine wtGRK-3 Überexpression die Internalisierung nicht mehr steigern. Für diesen Effekt müssen also entweder eine intakte Helix 8 oder die C-terminalen Phosphorylierungsstellen vorhanden sein. Dies wurde auch durch das Fehlen eines Effekts der kinase-defizienten GRK-3-K220R Mutante auf die Internalisierung der Helix 8 Mutante K315P bestätigt (Feierler et al., 2011).

Die GRKs verfügen unter anderem über ein Clathrin Bindungsmotiv. Clathrin ist an der Einstülpung der Zellmembran und Abschnürung von Vesikeln wesentlich beteiligt. Die Bedeutung des Clathrin Bindungsmotiv wurde für die GRK-2 beim  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor gezeigt (Mangmool et al., 2006). Um diese Domäne für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Mutation im Clathrin Bindungsmotiv der GRK-3 (<sup>498</sup>LLDCD<sup>502</sup> → <sup>498</sup>AAAAA<sup>502</sup>) eingeführt. Es zeigte sich im Vergleich zur wtGRK-3 eine deutliche Reduzierung der Internalisierung des B<sub>2</sub>R (Feierler et al., 2011). Das Clathrin Bindungsmotiv scheint ein essentieller Bestandteil der GRK-3 für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R zu sein. Eine direkte Interaktion zwischen GRK und Clathrin stellt somit einen möglichen Weg dar, den B<sub>2</sub>R phosphorylierungsunabhängig zu internalisieren.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen gibt es bereits Veröffentlichungen über andere GPCRs, welche phosphorylierungsunabhängig reguliert werden können. Für die Internalisierung des metabotropen Glutamat Rezeptor 5 in neuronalen Zellen des Striatums ist die Kinaseaktivität der GRK-2 nicht notwendig (Ribeiro et al., 2009). Das IP<sub>3</sub>-Signal konnte beim muskarinischen Acetylcholinrezeptor (M1) im Hippocampus sowohl durch die GRK-2 als auch die kinase-defiziente GRK-2 K220R Mutante inhibiert werden (Willems et al., 2004). Ebenso verhält es sich beim Parathormonrezeptor in COS-Zellen (Dicker et al., 1999). Der Histaminrezeptor (H2) wird in HEK293 Zellen unabhängig von der Kinasefunktion der GRK-2 desensibilisiert, benötigt jedoch die Phosphorylierung für die Internalisierung (Fernandez et al., 2011). Es zeigen sich zudem Unterschiede in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien. So konnte die Kinase-inaktive GRK-2 Mutante K220R die Internalisierung beim Melanocortin-4-Rezeptor in COS1-Zellen teilweise inhibieren. In HEK293 Zellen hingegen funktionierte die Internalisierung des Rezeptors unabhängig von der Kinaseaktivität (Shinyama et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Fähigkeiten der GRKs weitaus vielfältiger sind als bisher angenommen und sie in der Lage sind mit GPCRs und anderen Proteinen zu interagieren. Je nach Rezeptorkonstrukt und Zelllinie sind sie zudem fähig auch direkt phosphorylierungsunabhängig eine Rezeptor-Internalisierung einzuleiten.

### F.3 Abhängigkeit der Internalisierung des B<sub>2</sub>R von der G-Proteinaktivierung

Neben der Kinasedomäne besitzt die GRK-2 bzw. GRK-3 sowohl eine RH Domäne (*regulator of G-Protein signaling homology domain*) als auch eine PH Domäne (*pleckstrin homology*). Um deren Rolle für die Regulation des B<sub>2</sub>R zu untersuchen, wurden zusätzliche GRK Mutanten erzeugt.

Die GRK-2 bzw. GRK-3 Mutante R106A ist nicht mehr fähig über ihre RH Domäne G<sub>αq/11</sub> zu binden. Beschrieben wurde der Effekt dieser Mutation auf den muskarinischen M3-Rezeptor (Luo et al., 2008). Die Punktmutation R587Q in der PH Domäne der GRK-2 bzw. der GRK-3 hingegen führt zu einem Verlust der Fähigkeit freie G<sub>βγ</sub> Untereinheiten zu binden (Carman et al., 2000).

Die Internalisierung des B<sub>2</sub>R konnte durch die GRK-3 signifikant beschleunigt werden, unabhängig von ihrer Fähigkeit sowohl an G<sub>αq/11</sub> als auch an die freien G<sub>βγ</sub> Untereinheiten binden zu können (Abbildung 23). Die GRK-2 zeigte einen ähnlichen Trend.

Diese Experimente belegen, dass für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R eine G-Protein Aktivierung nicht notwendig ist. Die GRK ist vermutlich in der Lage direkt mit dem B<sub>2</sub>R zu interagieren und benötigt hierfür keine Rekrutierung durch freigesetzte G<sub>βγ</sub> Untereinheiten.

Zusammenfassend kann die Internalisierung des B<sub>2</sub>R sowohl phosphorylierungs-unabhängig als auch unabhängig von einer G-Proteinaktivierung erfolgen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die GRK direkt mit dem B<sub>2</sub>R interagieren kann.

Wir zeigen erstmalig für den B<sub>2</sub>R, dass die Internalisierung über den β-Arrestin Signalweg unabhängig von der G-Proteinaktivierung erfolgen kann. Dies deutet daraufhin, dass die verschiedene Signalwege unabhängig voneinander reguliert werden können.

#### F.4 Abhängigkeit des ERK1/2 Signalweg von der G-Proteinaktivierung und Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R

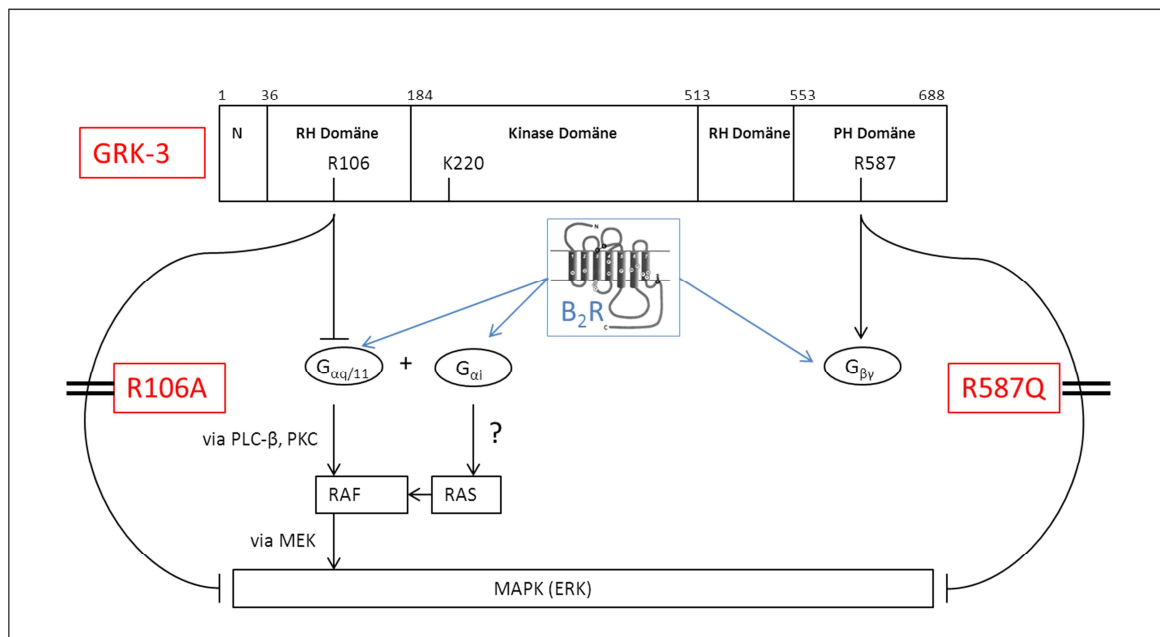
Für den ERK1/2 Signalweg sind beim B<sub>2</sub>R die beiden G<sub>α</sub>-Proteinuntereinheiten G<sub>αq/11</sub> und G<sub>αi</sub> von gleichrangiger Bedeutung (Blaukat et al., 2000). Die Wichtigkeit von G<sub>αq/11</sub> wurde auch in unserer Arbeitsgruppe durch den Einsatz von Bisindolylmaleimide (BIM), einem Proteinkinase C Inhibitor, bestätigt. Es zeigte sich eine Unterdrückung des ERK1/2-Signals (Leschner et al., 2011). Darüberhinaus führte auch die Inhibierung von G<sub>i</sub> mithilfe von Pertussistoxin (PTX) zu diesem Effekt. Dabei ist der Effekt der beiden Substanzen (BIM+PTX) additiv. Dies beweist die Notwendigkeit von G<sub>αq/11</sub> und G<sub>i</sub> für die ERK1/2 Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R.

Eine Überexpression von wtGRK-2 und wtGRK-3 inhibierte den ERK1/2-Signalweg des B<sub>2</sub>R (Dissertation Wirth, 2011). Inwieweit die Kinasefunktion der GRK-3 eine Rolle für die Regulation des ERK1/2 Signalwegs des B<sub>2</sub>R spielt, war bisher noch nicht untersucht worden. Wir zeigen erstmalig, dass die Kinase-inaktive GRK-3 Mutante K220R diese Signaltransduktion ebenso unterbindet wie die wtGRK-3 (Abbildung 24). Der ERK1/2 Signalweg kann daher unabhängig von der Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R durch die GRK-3 terminiert werden. Dies zeigt deutlich, dass die Rekrutierung von Arrestinen über die Phosphorylierung des C-Terminus oder gar die Internalisierung des Rezeptors nicht die entscheidenden Schritte für die kurzfristige Abschaltung des Signals sind. Wichtiger scheint die Fähigkeit der GRK-3 durch Bindung an die freigesetzten Gβγ Untereinheiten in die Nähe des Rezeptors zu gelangen und anschließend die aktivierten G<sub>αq/11</sub> G-Proteinuntereinheiten mit der RH-Domäne abzufangen und zu inaktivieren. Ein solcher Mechanismus wird von den Ergebnissen unserer Experimente mit den GRK-3 Mutanten R106A und R587Q unterstützt, denn die GRK-3 Mutante R106A die die G-Proteinuntereinheit G<sub>αq/11</sub> nicht mehr abfangen kann (Luo et al., 2008), war nicht mehr in der Lage das ERK1/2-Signal des B<sub>2</sub>R zu unterdrücken (Abbildung 24) und dies galt auch für die GRK-3 Mutante R587Q (Abbildung 24), die nicht mehr an freie Gβγ Untereinheiten binden kann (Carman et al., 2000).

Es ist zu berücksichtigen, dass in den Experimenten stets eine Überexpression der GRK-Konstrukte vorlag. Somit lassen sich diese Ergebnisse nur bedingt auf physiologische Bedingungen übertragen.



Unsere Experimente belegen, dass für den ERK1/2 Signalweg des B<sub>2</sub>R die G-Proteinaktivierung entscheidend ist, dieser jedoch unabhängig von der Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R durch die GRK ist. Dies zeigt, dass durch einen Rezeptor induzierte Signalwege unterschiedlich, im Sinne einer funktionalen Selektivität, reguliert werden können.



**Abbildung 30 : Zusammenfassung der Ergebnisse über die ERK1/2 Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R**

Die GRK-3 Mutante R106A ist nicht in der Lage an G<sub>αq/11</sub> zu binden und kann im Gegensatz zur wtGRK-3 den ERK1/2 Signalweg nicht inhibieren. Ebenso verhält sich die GRK-3 Mutante R587Q welche nicht an G<sub>βγ</sub> binden kann. Die Kinaseaktivität der GRK-3 spielt für diesen Signalweg keine Rolle.

## F.5 Zusammenfassung der Signalterminierung des B<sub>2</sub>R durch GRK-2/GRK-3

Das Signal des B<sub>2</sub>R kann über verschiedene Wege terminiert werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R durch die GRK-2/GRK-3 für die Signalterminierung nicht unbedingt notwendig ist. Das Abschalten der G-Protein Signaltransduktion durch die sterische Blockade von Arrestin und die darauffolgende Internalisierung des B<sub>2</sub>R setzt die Phosphorylierung des Rezeptors nicht zwingend voraus. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die GRK-2/GRK-3 direkt mit dem Rezeptor interagieren kann. Außerdem konnten wir in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass β-Arrestin 2 in der Lage ist, phosphorylierungs-

unabhängig mit der Helix 8 des B<sub>2</sub>R zu interagieren und die Internalisierung des Rezeptors zu induzieren (Feierler et al., 2011). Für die langfristige Signalterminierung über den Weg der Internalisierung ist die Interaktion der GRK-2/GRK-3 mit G<sub>βγ</sub> nicht notwendig. Die Internalisierung des B<sub>2</sub>R kann auch unabhängig von der G-Protein Aktivierung stattfinden. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe mit einer B<sub>2</sub>R Mutation R128A bekräftigt (Manuskript eingereicht). Diese Mutation in der hochkonservierten DRY Sequenz führt beim B<sub>2</sub>R zu einem Verlust der Fähigkeit mit der G<sub>α</sub> Proteinuntereinheit zu interagieren (Abbildung 29). Es zeigte sich, dass trotz fehlender G-Proteinaktivierung die Internalisierung noch möglich ist (hier nicht gezeigt).

Nach unseren Ergebnissen ist für die ERK1/2 Signalterminierung das Abfangen von G<sub>αq/11</sub> Untereinheiten durch GRK-2/3 über deren RH-Domänen der entscheidende Weg. Dafür muss GRK-2/GRK-3 jedoch in der Lage sein an die freien G<sub>βγ</sub> Untereinheiten zu binden. Dies ist unabhängig von der Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R. Über die Anzahl der freien G<sub>βγ</sub> Untereinheiten können entsprechend viele GRKs rekrutiert werden und G<sub>αq/11</sub> Untereinheiten abfangen. Somit hat die Anzahl an freien G<sub>βγ</sub> Untereinheiten wahrscheinlich starken Einfluss auf die Signaltransduktion. Daher könnte auch die Aktivierung von G<sub>αi</sub> mittels Freisetzung von G<sub>βγ</sub> Untereinheiten und die Rekrutierung von GRK-2/-3 indirekt Auswirkungen auf das G<sub>αq/11</sub> Signal haben. Dies setzt jedoch voraus, dass GRK2/-3 sowohl an die G<sub>βγ</sub> Untereinheiten von G<sub>αq/11</sub> als auch von G<sub>αi</sub> binden können.

## F.6 Rolle von Dynamin-1 für den Bradykininrezeptor B<sub>2</sub>R

An der Abschnürung der Vesikel im Rahmen der Clathrin- bzw. Caveolae-vermittelten Endocytose ist die GTPase Dynamin wesentlich beteiligt. Die Endocytose ist ein zentraler Vorgang in humanen Zellen. Jedoch ist die genaue molekulare Wirkungsweise von Dynamin bisher noch unzureichend geklärt. Dieses Protein könnte als mögliches pharmakologisches Target genutzt werden um beispielsweise die Endocytose von pathogenen Viren zu verhindern. So ist bereits beschrieben, dass der Dynamin GTPase Inhibitor Dynasore in der Lage ist, den Eintritt von HPV16 in HEK293 Zellen zu blockieren (Abban et al., 2008).

Um festzustellen, ob Dynamin ein limitierender Faktor für die Internalisierung ist, wurde die Internalisierungsrate bei maximalen Verbrauch aller Proteine, welche an der Internalisierung des Rezeptors beteiligt sind, gemessen. Trotz Überexpression von wtDynamin-1 konnte die Internalisierungsrate des B<sub>2</sub>R nicht weiter erhöht werden (Abbildung 26).

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die dominant negative Dynamin-1 Mutante K44A sowohl in COS-7 (Pizard et al., 1999) als auch in HEK393 Zellen (Lamb et al., 2001) die Internalisierung des B<sub>2</sub>R beeinflusst. Neben der Clathrin-vermittelten Internalisierung gibt es den Weg über die Caveolae (Anderson et al., 1998). Es handelt es sich um kleine Membraneinstülpungen welche aus Caveolin Einheiten bestehen. Für den B<sub>2</sub>R ist ein solcher möglicher Weg bereits beschrieben (Haasemann et al., 1998; de Weerd et al., 1997; Lamb et al., 2001).

Die durchgeführten Internalisierungsversuche zeigen eine signifikante Reduzierung der Internalisierungsrate bei Überexpression der dominant-negativen Dynamin-1 Mutante K44A (Abbildung 26). Jedoch kommt die Internalisierung des Rezeptors nicht komplett zum Erliegen. Dies weist auf eine teilweise Dynamin-unabhängige Internalisierung hin.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das endogen exprimierte wtDynamin-1 trotz Überexpression der Dynamin-1 Mutante K44A nicht vollständig verdrängt werden kann. Somit könnte dieser Effekt auf die Expression des endogenen wtDynamin-1 zurückzuführen sein. Hier müssten weitere Untersuchungen mithilfe von siRNA Experimenten stattfinden um einen wtDynamin-1 knock-down zu erzielen. Darüberhinaus muss in Erwägung gezogen werden, dass Unterschiede in der

Affinität zwischen der Dynamin-1 Mutante K44A und endogenem wtDynamin-1 vorhanden sind.

Außerdem gibt es bereits Beispiele in der Literatur, welche eine Dynamin-unabhängige Internalisierung beschreiben. Sowohl der Angiotensinrezeptor AT<sub>1A</sub> (Zhang et al., 1996), der Sekretinrezeptor (Walker et al., 1999) als auch der muskarinische Rezeptor M2 (Vogler et al., 1998) sind in der Lage, unabhängig von Dynamin internalisiert zu werden.

Es ist noch nicht ausreichend geklärt, ob Dynamin-1 mit weiteren Effektorproteinen interagiert und somit möglicherweise Signalwege beeinflusst. Es zeigte sich bei den durchgeführten Untersuchungen, dass sowohl wtDynamin-1 als auch die Dynamin-1 Mutante K44A das ERK1/2 Signal beim B<sub>2</sub>R nicht unterdrücken (Abbildung 27) können. Weitere Experimente müssten durchgeführt werden, um zu klären, ob Dynamin-1 – analog zu den GRKs – nicht nur an der Abschnürung von Vesikeln beteiligt ist, sondern möglicherweise Signalkaskaden reguliert.

## G RESÜMEE UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Rezeptorkinasen GRK-2 und GRK-3 für den humanen B<sub>2</sub>R im Hinblick auf die Internalisierung und ERK1/2 Signaltransduktion untersucht.

Die erzielten Ergebnisse zeigen erstmalig, dass für die Internalisierung des B<sub>2</sub>R eine Phosphorylierung durch die GRK nicht notwendig ist. Die Internalisierung des B<sub>2</sub>R kann außerdem unabhängig von einer G-Proteinaktivierung erfolgen. Die Beendigung der ERK1/2 Signalkaskade ist abhängig von den G-Proteinuntereinheiten G<sub>αq/11</sub> und G<sub>βγ</sub>, jedoch ebenfalls phosphorylierungsunabhängig. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich folgendes Modell über die Regulation des B<sub>2</sub>R beschreiben: Die schnelle Abschaltung des ERK1/2-Signals erfolgt über die Rekrutierung von - vor allem - der GRK-3 durch nach der G-Proteinaktivierung freie G<sub>βγ</sub> Untereinheiten und das Abfangen der aktiven G<sub>αq/11</sub> Untereinheiten durch Bindung an die RH-Domäne der GRK. Die längerfristige Reduzierung des B<sub>2</sub>R Signals erfolgt über die Internalisierung des B<sub>2</sub>R. Diese kann entweder unabhängig von einer G-Proteinaktivierung oder einer Phosphorylierung direkt vermittelt über GRK-2/-3 (und deren Bindung an *clathrin-coated pits*) erfolgen oder indirekt über Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R C-Terminus durch GRK-2/-3 und anschließender Rekrutierung der Internalisierungs-Adapter-Proteine β-Arrestin 1 und 2. β-Arrestin 2 kann auch phosphorylierungsunabhängig über Interaktion mit der Helix 8 des B<sub>2</sub>R den Rezeptor internalisieren. Damit ist die Phosphorylierung des B<sub>2</sub>R nicht unbedingt für seine Internalisierung erforderlich, entscheidet aber möglicherweise über sein weiteres Schicksal bezüglich Recycling oder Degradation.

Die phosphorylierungsabhängige und –unabhängige Rolle der GRKs für die Regulation des B<sub>2</sub>R wurde in dieser Arbeit gezeigt. Eine gezielte Beeinflussung dieser einzelnen Funktionen am B<sub>2</sub>R oder bei den GRKs könnte ein pharmakologisch interessanter Ansatz sein. Der therapeutische Ansatz mittels GRK Inhibitoren wird beispielsweise im Hinblick auf die Behandlung der Herzinsuffizienz bereits verfolgt.

## H LITERATURVERZEICHNIS

1. Abban, C.Y., Bradbury, N.A. & Meneses, P.I. HPV16 and BPV1 infection can be blocked by the dynamin inhibitor dynasore. *Am J Ther* 15, 304-311 (2008).
2. Ahmed, M.R., *et al.* Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2, 28ra28 (2010).
3. Akbary, A.M., Wirth, K.J. & Scholkens, B.A. Efficacy and tolerability of Icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology* 33, 238-242 (1996).
4. Alhenc-Gelas, F., *et al.* Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. *Curr Pharm Des* 17, 2654-2662 (2011).
5. Anderson, R.G. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225 (1998).
6. Andresen, B.T. A pharmacological primer of biased agonism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 11, 92-98 (2011).
7. Asano, M., *et al.* Effects of a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR167344, on different in vivo animal models of inflammation. *Br J Pharmacol* 122, 1436-1440 (1997).
8. Austin, C.E., *et al.* Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J Biol Chem* 272, 11420-11425 (1997).
9. Benovic, J.L. & Gomez, J. Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J Biol Chem* 268, 19521-19527 (1993).
10. Benovic, J.L., *et al.* Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J Biol Chem* 266, 14939-14946 (1991).
11. Bernstein, J.A. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, VIII: current status of emerging therapies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 100, S41-46 (2008).
12. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523 (1979).

13. Blaukat, A., Alla, S.A., Lohse, M.J. & Muller-Esterl, W. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 32366-32374 (1996).
14. Blaukat, A., Barac, A., Cross, M.J., Offermanns, S. & Dikic, I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Mol Cell Biol* 20, 6837-6848 (2000).
15. Blaukat, A. & Muller-Esterl, W. Inhibition of B2 receptor internalization delays its dephosphorylation. *Immunopharmacology* 36, 115-119 (1997).
16. Blaukat, A., *et al.* Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem* 276, 40431-40440 (2001).
17. Blaukat, A., *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase by the bradykinin B2 receptor is independent of receptor phosphorylation and phosphorylation-triggered internalization. *FEBS Lett* 451, 337-341 (1999).
18. Bond, A.P., Lemon, M., Dieppe, P.A. & Bhoola, K.D. Generation of kinins in synovial fluid from patients with arthropathy. *Immunopharmacology* 36, 209-216 (1997).
19. Bork, K., *et al.* Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant). *J Allergy Clin Immunol* 119, 1497-1503 (2007).
20. Campbell, D.J., Kladis, A., Briscoe, T.A. & Zhuo, J. Type 2 bradykinin-receptor antagonism does not modify kinin or angiotensin peptide levels. *Hypertension* 33, 1233-1236 (1999).
21. Campbell, D.J., Kladis, A. & Duncan, A.M. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. *Hypertension* 21, 155-165 (1993).
22. Carman, C.V., *et al.* Mutational analysis of Gbetagamma and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 275, 10443-10452 (2000).
23. Carman, C.V., *et al.* Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274, 34483-34492 (1999).

24. Chand, N., Mahoney, T.P., Jr., Diamantis, W. & Sofia, R.D. Pharmacological modulation of bradykinin-, acetylcholine- and calcium ionophore A23187-induced relaxation of rabbit pulmonary arterial segments. *Eur J Pharmacol* 137, 173-177 (1987).
25. Chen, C.K., *et al.* Abnormal photoresponses and light-induced apoptosis in rods lacking rhodopsin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3718-3722 (1999).
26. Chien, E.Y., *et al.* Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 330, 1091-1095 (2010).
27. Chini, B. & Parenti, M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* 32, 325-338 (2004).
28. Cicardi, M., *et al.* Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 363, 532-541 (2010).
29. Cugno, M., Nussberger, J., Cicardi, M. & Agostoni, A. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol* 3, 311-317 (2003).
30. Damke, H., Binns, D.D., Ueda, H., Schmid, S.L. & Baba, T. Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Mol Biol Cell* 12, 2578-2589 (2001).
31. de Weerd, W.F. & Leeb-Lundberg, L.M. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galpha<sub>i</sub> in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272, 17858-17866 (1997).
32. Dhami, G.K., Anborgh, P.H., Dale, L.B., Sterne-Marr, R. & Ferguson, S.S. Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 277, 25266-25272 (2002).
33. Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K. & Lohse, M.J. Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5476-5481 (1999).
34. Diviani, D., *et al.* Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271, 5049-5058 (1996).



35. Drews, J. Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287, 1960-1964 (2000).
36. Duncan, A.M., *et al.* Kinins in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R897-904 (2000).
37. Eichmann, T., *et al.* The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *J Biol Chem* 278, 8052-8057 (2003).
38. Faussner, A., Proud, D., Towns, M. & Bathon, J.M. Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. *J Biol Chem* 273, 2617-2623 (1998).
39. Faussner, A., *et al.* Alanine screening of the intracellular loops of the human bradykinin B receptor--effects on receptor maintenance, G protein activation and internalization. *FEBS J* 276, 3491-3503 (2009).
40. Feierler, J., *et al.* Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B2 receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem* (2011).
41. Ferguson, S.S., *et al.* Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366 (1996).
42. Fernandez, N., *et al.* Roles of phosphorylation-dependent and -independent mechanisms in the regulation of histamine H2 receptor by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 286, 28697-28706 (2011).
43. Fong, A.M., *et al.* Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7478-7483 (2002).
44. Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G. & Schioth, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272 (2003).
45. Gainetdinov, R.R., *et al.* Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* 24, 1029-1036 (1999).
46. Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Pharmacol Sci* 21, 366-367 (2000).

47. Gehret, A.U. & Hinkle, P.M. Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem J* 428, 235-245 (2010).
48. Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21, 90-113 (2000).
49. Gibbs, J.B. Ras C-terminal processing enzymes--new drug targets? *Cell* 65, 1-4 (1991).
50. Gibson, C., *et al.* Novel small molecule bradykinin B2 receptor antagonists. *J Med Chem* 52, 4370-4379 (2009).
51. Gurevich, E.V., Tesmer, J.J., Mushegian, A. & Gurevich, V.V. G protein-coupled receptor kinases: More than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* (2011).
52. Haasemann, M., Cartaud, J., Muller-Esterl, W. & Dunia, I. Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci* 111 ( Pt 7), 917-928 (1998).
53. Hamm, H.E. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672 (1998).
54. Heckman, K.L. & Pease, L.R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2, 924-932 (2007).
55. Hibino, T., Takemura, T. & Sato, K. Human eccrine sweat contains tissue kallikrein and kininase II. *J Invest Dermatol* 102, 214-220 (1994).
56. Hinshaw, J.E. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 483-519 (2000).
57. Hinshaw, J.E. & Schmid, S.L. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190-192 (1995).
58. Iaccarino, G. & Koch, W.J. Transgenic mice targeting the heart unveil G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets. *Assay Drug Dev Technol* 1, 347-355 (2003).
59. Inglese, J., Koch, W.J., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* 359, 147-150 (1992).
60. Israili, Z.H. & Hall, W.D. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med* 117, 234-242 (1992).

61. Jaakola, V.P., *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211-1217 (2008).
62. Jaber, M., *et al.* Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12974-12979 (1996).
63. Kakoki, M., McGarragh, R.W., Kim, H.S. & Smithies, O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7576-7581 (2007).
64. Kalatskaya. Technische Universität München (2005).
65. Kavelaars, A., *et al.* Increased acute inflammation, leukotriene B4-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J Immunol* 171, 6128-6134 (2003).
66. Kim, J., *et al.* Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1442-1447 (2005).
67. Koch, W.J., Inglese, J., Stone, W.C. & Lefkowitz, R.J. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 268, 8256-8260 (1993).
68. Kong, G., Penn, R. & Benovic, J.L. A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269, 13084-13087 (1994).
69. Koovor, A., Celver, J., Abdryashitov, R.I., Chavkin, C. & Gurevich, V.V. Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* 274, 6831-6834 (1999).
70. Krupnick, J.G. & Benovic, J.L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319 (1998).
71. Lamb, M.E., De Weerd, W.F. & Leeb-Lundberg, L.M. Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem J* 355, 741-750 (2001).
72. Lamb, M.E., Zhang, C., Shea, T., Kyle, D.J. & Leeb-Lundberg, L.M. Human B1 and B2 bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells. *Biochemistry* 41, 14340-14347 (2002).

73. Lander, E.S., *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921 (2001).
74. Laporte, S.A., Miller, W.E., Kim, K.M. & Caron, M.G. beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem* 277, 9247-9254 (2002).
75. Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J. & Zuraw, B.L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57, 27-77 (2005).
76. Lefkowitz, R.J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273, 18677-18680 (1998).
77. Lefkowitz, R.J. & Shenoy, S.K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517 (2005).
78. Leschner, J., *et al.* Fever-like temperature modification differentially affects in vitro signaling of bradykinin B(1) and B(2) receptors. *Biol Chem* 392, 1021-1029 (2011).
79. Liebmann, C. Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol Chem* 382, 49-55 (2001).
80. Lodowski, D.T., *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbeta1gamma2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 936-939 (2003).
81. Lorenz, W., *et al.* The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the beta-adrenergic receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8715-8719 (1991).
82. Luo, J., Busillo, J.M. & Benovic, J.L. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol* 74, 338-347 (2008).
83. Madeddu, P., *et al.* Role of calcitonin gene-related peptide and kinins in post-ischemic intestinal reperfusion. *Peptides* 22, 915-922 (2001).
84. Mangmool, S., *et al.* Clathrin required for phosphorylation and internalization of beta2-adrenergic receptor by G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). *J Biol Chem* 281, 31940-31949 (2006).

85. Marchese, A., Chen, C., Kim, Y.M. & Benovic, J.L. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28, 369-376 (2003).
86. Marmarou, A., *et al.* Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. American Brain Injury Consortium Study Group. *J Neurotrauma* 16, 431-444 (1999).
87. McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. & Yoon, Y. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci* 25, 115-120 (2000).
88. Meneton, P., *et al.* Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2634-2639 (2001).
89. Mokros. Freie Universität Berlin (2004).
90. Moreau, M.E., *et al.* The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99, 6-38 (2005).
91. Nakamura, K., Krupnick, J.G., Benovic, J.L. & Ascoli, M. Signaling and phosphorylation-impaired mutants of the rat follitropin receptor reveal an activation- and phosphorylation-independent but arrestin-dependent pathway for internalization. *J Biol Chem* 273, 24346-24354 (1998).
92. Nobles, K.N., *et al.* Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal* 4, ra51 (2011).
93. Okazaki, T., *et al.* Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera. *J Biol Chem* 256, 7316-7321 (1981).
94. Park, S.J., Choi, D.J. & Kim, C.W. Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to beta-adrenergic receptor kinase-1 (betaARK1) in peripheral lymphocytes. *J Hypertens* 22, 1025-1032 (2004).
95. Patel, S., Robb-Gaspers, L.D., Stellato, K.A., Shon, M. & Thomas, A.P. Coordination of calcium signalling by endothelial-derived nitric oxide in the intact liver. *Nat Cell Biol* 1, 467-471 (1999).
96. Penela, P., *et al.* Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 69, 46-56 (2006).

97. Penela, P., Ribas, C. & Mayor, F., Jr. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15, 973-981 (2003).
98. Peppel, K., *et al.* G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J Biol Chem* 272, 25425-25428 (1997).
99. Pitcher, J.A., Freedman, N.J. & Lefkowitz, R.J. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 653-692 (1998).
100. Pitcher, J.A., Touhara, K., Payne, E.S. & Lefkowitz, R.J. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* 270, 11707-11710 (1995).
101. Pizard, A., Blaukat, A., Muller-Esterl, W., Alhenc-Gelas, F. & Rajerison, R.M. Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem* 274, 12738-12747 (1999).
102. Prado, G.N., Taylor, L. & Polgar, P. Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B2 receptor. *J Biol Chem* 272, 14638-14642 (1997).
103. Prediger, R.D., *et al.* Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151, 631-643 (2008).
104. Pronin, A.N., Carman, C.V. & Benovic, J.L. Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. *J Biol Chem* 273, 31510-31518 (1998).
105. Rasmussen, S.G., *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387 (2007).
106. Rasmussen, S.G., *et al.* Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555 (2011).
107. Regoli, D., Plante, G.E. & Gobeil, F., Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 135, 94-111 (2012).

108. Reiter, E. & Lefkowitz, R.J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17, 159-165 (2006).
109. Ren, X.R., *et al.* Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1448-1453 (2005).
110. Ribas, C., *et al.* The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 913-922 (2007).
111. Ribeiro, F.M., *et al.* Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons. *J Biol Chem* 284, 23444-23453 (2009).
112. Ricupero, D., Taylor, L. & Polgar, P. Interactions of bradykinin, calcium, G-protein and protein kinase in the activation of phospholipase A2 in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Agents Actions* 40, 110-118 (1993).
113. Robinson, P.R., Cohen, G.B., Zhukovsky, E.A. & Oprian, D.D. Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* 9, 719-725 (1992).
114. Rockman, H.A., *et al.* Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J Biol Chem* 273, 18180-18184 (1998).
115. Sallese, M., *et al.* 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 (1997).
116. Sallese, M., Mariggio, S., D'Urbano, E., Iacovelli, L. & De Blasi, A. Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol Pharmacol* 57, 826-831 (2000).
117. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467 (1977).
118. Schremmer-Danninger, E., Hermann, A., Fink, E., Fritz, H. & Roscher, A.A. Identification and occurrence of mRNAs for components of the kallikrein-kinin system in human skin and in skin diseases. *Immunopharmacology* 43, 287-291 (1999).

119. Sever, S., Damke, H. & Schmid, S.L. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 1, 385-392 (2000).
120. Shinyama, H., Masuzaki, H., Fang, H. & Flier, J.S. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology* 144, 1301-1314 (2003).
121. Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell* 48, 913-922 (1987).
122. Simaan, M., Bedard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J.P. & Laporte, S.A. Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal* 17, 1074-1083 (2005).
123. Smith, D.M. & Waite, M. Phosphatidylinositol hydrolysis by phospholipase A2 and C activities in human peripheral blood neutrophils. *J Leukoc Biol* 52, 670-678 (1992).
124. Sterne-Marr, R., *et al.* G protein-coupled receptor Kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J Biol Chem* 278, 6050-6058 (2003).
125. Stone, O.A., *et al.* Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 657-664 (2009).
126. Suo, Z., Wu, M., Citron, B.A., Wong, G.T. & Festoff, B.W. Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation. *J Neurosci* 24, 3444-3452 (2004).
127. Sweitzer, S.M. & Hinshaw, J.E. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029 (1998).
128. Thal, D.M., Yeow, R.Y., Schoenau, C., Huber, J. & Tesmer, J.J. Molecular mechanism of selectivity among G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Mol Pharmacol* 80, 294-303 (2011).
129. Touhara, K., Koch, W.J., Hawes, B.E. & Lefkowitz, R.J. 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 (1995).



130. Tuma, P.L. & Collins, C.A. Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J Biol Chem* 269, 30842-30847 (1994).
131. Turner, P., Dear, J., Scadding, G. & Foreman, J.C. Role of kinins in seasonal allergic rhinitis: icatibant, a bradykinin B2 receptor antagonist, abolishes the hyperresponsiveness and nasal eosinophilia induced by antigen. *J Allergy Clin Immunol* 107, 105-113 (2001).
132. Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J.S., Erdmann, E. & Lohse, M.J. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87, 454-463 (1993).
133. Ungerer, M., *et al.* Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74, 206-213 (1994).
134. Venter, J.C., *et al.* The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351 (2001).
135. Vinge, L.E., *et al.* Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2490-2499 (2001).
136. Violin, J.D. & Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 416-422 (2007).
137. Vogelstein, B. & Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615-619 (1979).
138. Vogler, O., *et al.* Receptor subtype-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration by dynamin. Distinct sequestration of m2 receptors. *J Biol Chem* 273, 12155-12160 (1998).
139. Walker, J.K., Peppel, K., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. & Fisher, J.T. Altered airway and cardiac responses in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 3. *Am J Physiol* 276, R1214-1221 (1999).
140. Walker, J.K., Premont, R.T., Barak, L.S., Caron, M.G. & Shetzline, M.A. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 274, 31515-31523 (1999).
141. Wess, J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 80, 231-264 (1998).

142. Wilden, U., Hall, S.W. & Kuhn, H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1174-1178 (1986).
143. Willets, J.M., Nash, M.S., Challiss, R.A. & Nahorski, S.R. Imaging of muscarinic acetylcholine receptor signaling in hippocampal neurons: evidence for phosphorylation-dependent and -independent regulation by G-protein-coupled receptor kinases. *J Neurosci* 24, 4157-4162 (2004).
144. Wirth. Ludwig-Maximilians-Universität München (2011).
145. Wise, A., Jupe, S.C. & Rees, S. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 43-66 (2004).
146. Wu, B., *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071 (2010).
147. Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Menard, L. & Caron, M.G. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271, 18302-18305 (1996).

## I DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. A. Faussner für die Überlassung dieses Themas. Sein Engagement und seine mitreißende Begeisterung für wissenschaftliches Denken und Arbeiten haben mich sehr geprägt. Die exzellente Betreuung hat entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Frau Professor Dr. M. Jochum danke ich für die Möglichkeit an ihrem Institut zu promovieren.

Herrn Professor Dr. J. Heesemann danke ich für die Organisation des Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ im Rahmen des Programmes „Förderung für Forschung und Lehre“.

Herzlich danke ich Herrn Dr. M. Wirth. Seine Ergebnisse stellten die Grundlage meiner Doktorarbeit dar. Vielen Dank für die Einführung in die Thematik und die praktischen Erklärungen der Methoden im Labor.

Bei Herrn Dr. J. Feierler bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft. Seine Unterstützung im Labor durch wertvolle Ratschläge zu meiner experimentellen Arbeit haben mir sehr weitergeholfen.

Herrn Dr. G. Wennerberg, Frau Dr. M. Karow, Herrn S. Schüssler, Frau C. Seidl und Frau H. Grondinger danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit, eure Geduld und eure Unterstützung. Danke für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei meinen Eltern, Werner und Elisabeth Welte, für Ihre stete Unterstützung weit über diese Arbeit hinaus.

Carina Hoffmann, der wichtigste Mensch in meinem Leben, gebührt mehr als Dank. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft!

## **J CURRICULUM VITAE**

## K PUBLIKATIONEN

*im Zusammenhang mit dieser Dissertationsarbeit*

### Publikationen

1. Jasmin Leschner, Goeran Wennerberg, Jens Feierler, **Benjamin Welte**, Irina Kalatskaya, Gerhard Wolber, and Alexander Faussner (2012). Interruption of the ionic lock in the bradykinin B<sub>2</sub> receptor results in constitutive internalization and turns several antagonists into strong agonists. J. Pharm. Exp. Therp. (Revision eingereicht)
2. Jens Feierler , Markus Wirth, **Benjamin Welte**, Steffen Schüssler, Marianne Jochum, and Alexander Faussner (2011). Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B<sub>2</sub> receptor trafficking and signaling. J. Biol. Chem. 286(50):43282-93. Epub 2011 Oct 20.

### Poster

Keystone Symposia GPCRs (April 7-12, Breckenridge, Colorado, USA).

Feierler, J., Wirth, M., **Welte, B.**, Schuessler, S., Jochum, M., and Faussner, A.

Functional role of helix 8 in the sequestration of the human B<sub>2</sub> bradykinin receptor