

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Christian Weber

**Regulation des Calciumsignals G-Protein-gekoppelter Rezeptoren
durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Matthias Manfred Deininger

aus Haßfurt

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Alexander Faußner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Dietrich
Prof. Dr. Peter Conzen
PD Dr. Tobias Petzold
Prof. Dr. Christine Josenhans

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2021



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Deiningger, Matthias Manfred

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Regulation des Calciumsignals G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Aachen, den 16.07.2021

Ort, Datum

Matthias Deiningger

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung	1
B Summary	3
C Einleitung	5
C.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	5
C.1.1 Bradykininrezeptoren	6
C.1.2 Protease-aktivierte Rezeptoren	7
C.2 Heterotrimere G-Proteine	8
C.2.1 Struktur und Funktion der G-Proteine	8
C.2.2 G-Protein Aktivierung	8
C.2.3 G-Protein Inaktivierung	9
C.3 Second messenger Calcium	10
C.3.1 Bedeutung des intrazellulären Calciumsignals	10
C.3.2 IP ₃ -Calcium-Signalweg	10
C.4 MAPK-Signalweg	11
C.4.1 ERK1/2	11
C.4.2 G α_q -vermittelte ERK1/2 Modulation	11
C.5 Desensitisierung des GPCR-Signalwegs	12
C.6 β-Arrestin 1 und 2	14
C.7 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	14
C.7.1 GRK2-Familie	16
C.7.2 GRK4-Familie	18
C.7.3 Pathophysiologische Bedeutung der GRKs	19
D Fragestellung und experimentelle Vorgehensweise	20
E Material und Methoden	21
E.1 Material	21
E.1.1 Geräte	21
E.1.2 Chemikalien und Materialien	22
E.1.3 Primer	23
E.1.4 Plasmide	24
E.1.4.1 pcDNA5/FRT/TO	24
E.1.4.2 pOG44	24
E.1.5 Bakterienstämme	25
E.1.5.1 JM109 Competent Cells (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)	25

E.1.5.2	XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)	25
E.1.6	Säugetierzellen	25
E.1.7	Proteine	25
E.1.8	Antikörper	25
E.1.9	Restriktionsendonuklease	26
E.1.10	Puffer	26
E.1.11	Lösungen	26
E.1.12	Computerprogramme	26
E.2	Methoden	27
E.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
E.2.1.1	DNA-Amplifikation	27
E.2.1.2	DNA-Punktmutation mittels ortsspezifischer Mutagenese	27
E.2.1.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	30
E.2.1.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	30
E.2.1.5	Photometrische DNA-Quantifizierung	31
E.2.1.6	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten	31
E.2.1.7	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	33
E.2.1.8	Kultivierung von transformierten <i>E. coli</i> -Stämmen	33
E.2.1.9	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien	33
E.2.1.10	DNA Sequenzierung	34
E.2.2	Zellbiologische Methoden	34
E.2.2.1	Kultivierung von HEK-293-Zellen	34
E.2.2.2	Zelladhärenzoptimierung mittels Poly-D-Lysin Hydrobromid	35
E.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von HEK-293-Zellen	35
E.2.2.4	Flp-In T-REx-Expressionssystem	36
E.2.2.5	Transfektion der HEK-293-Zellen mittels Lipofektion	38
E.2.2.5.1	Stabile Transfektion	38
E.2.2.5.2	Transiente Transfektion	39
E.2.2.6	Konzentrationsmessung des <i>second messengers</i> Calcium	39
E.2.2.6.1	FLIPR Calcium 5 Assay Kit	39
E.2.2.6.2	Intrazelluläre Calciummessung der HEK-293-Zellen	41
E.2.2.6.3	Auswertung der Calcium-Messungen	42
E.2.2.7	Quantifizierung der β -Arrestin-Rekrutierung	43
E.2.2.7.1	Funktionsweise des BRET	44
E.2.2.7.2	BRET-Messung der β -Arrestine	44
E.2.2.7.3	BRET-Messung in HEK-293-Zellen	45
E.2.2.7.4	Auswertung der BRET-Messungen	46
E.2.3	Proteinbiochemische Methoden	47
E.2.3.1	Proteinfreisetzung durch Zell-Lyse	47
E.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
E.2.3.2.1	Herstellung eines diskontinuierlichen Gels	47

E.2.3.2.2	Massenabhängige Separation der Proteine	48
E.2.3.3	Proteintransfer mittels Western Blot	48
E.2.3.4	Immunologischer Proteinnachweis	48
E.2.3.5	Durchflusszytometrie	49
E.2.3.6	Messung des p-ERK1/2 nach GPCR-Aktivierung	49
E.2.3.6.1	AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 Assay Kit	49
E.2.3.6.2	p-ERK1/2 Messung der HEK-293-Zellen	50
E.2.4	Statistische Datenanalyse und -auswertung	51
F	Ergebnisse	52
F.1	Einfluss von GRKs auf GPCR induzierte Calciumsignale	52
F.1.1	Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung des GRK-Einflusses	52
F.1.1.1	Herstellung von Kinase-defizienten GRKs	52
F.1.1.2	Überprüfung der Regulierbarkeit der GRK-Expression	54
F.1.2	Bestimmung des Calciumsignals endogener Bradykinin B2 Rezeptoren in Abhängigkeit der GRK-Expression	55
F.1.3	Vergleich des Einflusses einer GRK-Überexpression auf das Calciumsignal endogener und überexprimierter Bradykininrezeptoren	56
F.1.4	Erzeugen von GRK-Mutanten ohne $G\alpha_q$ - oder $G\beta\gamma$ -Bindungsfähigkeit	59
F.1.5	Bedeutung der GRK $G\alpha_q$ - und $G\beta\gamma$ -Bindung für das Calciumsignal der beiden Bradykininrezeptoren	60
F.1.6	Bedeutung der GRK-Domänen für das Calciumsignal endogener Protease-aktivierter Rezeptoren	63
F.2	Bedeutung der GRK2-Domänen für die Regulation des p-ERK1/2-Signals	65
F.3	Bedeutung der GRKs für die β-Arrestin-GPCR-Rekrutierung	66
G	Diskussion	70
G.1	Einfluss von GRKs auf das GPCR-Calciumsignal	70
G.1.1	Etablierung eines Messverfahrens zur Quantifizierung der GRK-Funktion	71
G.1.2	Vergleich des Einflusses der Wildtyp GRKs auf die untersuchten Rezeptoren	73
G.1.3	Bedeutung der Kinaseaktivität für die Funktion der GRKs	73
G.1.3.1	Relevanz für die GRK2-Familie	73
G.1.3.2	Relevanz für die GRK4-Familie	76
G.1.4	Bedeutung der $G\alpha_q$ -Bindungsfähigkeit für die GRK2-Familie	77
G.1.4.1	Regulation der Bradykininrezeptoren	77
G.1.4.2	Regulation der Protease-aktivierten Rezeptoren	79
G.1.5	Bedeutung der $G\beta\gamma$ -Bindungsfähigkeit für die GRK2-Familie	80
G.2	Bedeutung der GRK2-Familie für die p-ERK1/2-Regulation	81
G.3	Bedeutung der GRK-Kinasedomäne für die β-Arrestin-Rezeptorbindung	82

H	Resümee und Ausblick	85
I	Literaturverzeichnis	87
J	Danksagung	96
K	Publikationen	98

Abkürzungsverzeichnis

β_2 -AR	β_2 -adrenerger Rezeptor
7TM	7-Transmembranrezeptor
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASE	<i>Antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B1R	Bradykinin B1 Rezeptor
B2R	Bradykinin B2 Rezeptor
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
BGH	<i>Bovine growth hormone</i> / Rinder-Somatotropin
BK	Bradykinin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Cytomegalie Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTZ-H	Coelenterazin H
DAG	Diacylglycerol
DAK	[Des-Arg ¹⁰]-Kallidin
def	defizient
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat (N = A, T, G, C)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i> / Gelb fluoreszierendes Protein
EL	Extrazelluläre Schleife
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> / Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRT	<i>Flp recombinase target</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnucleotid-Austauschfaktor
G-Protein	<i>Guanine nucleotide-binding protein</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G _q	G-Protein, bestehend aus den Untereinheiten Gα _q und Gβγ
GOI	<i>Gene of interest</i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GRK-HEK-293	HEK-293-Zelle, die eine stabil transfizierte, Tetrazyklin-induzierbare GRK enthält
GTP	Guanosintriphosphat
Gα	G-Protein Untereinheit α
Gβγ	G-Protein Untereinheit β und γ
H8	Helix 8
HA	Hämagglutinin
HBSS	<i>Hank's Balanced salt solution</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney cell</i> / Menschliche embryonale Nierenzellen
HEK-293-Zelle	HEK-293-Zelle, die das Flp-In T-REx-Expressionssystem enthält
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL	Intrazelluläre Schleife
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
Nb35	<i>Nanobody 35</i>
Net-BRET	Netto BRET-Ergebnis
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i> / Kernlokalisierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PDE	Phosphodiesterase
PH	Pleckstrin Homologie Domäne
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C β
PLC γ	Phospholipase C γ
PPi	Pyrophosphat
P/S	Penicillin / Streptomycin
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RGS	<i>Regulator of G protein signaling</i>
RH	<i>Regulator of G protein signaling homology domain</i>
RLuc	Renilla Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	<i>Sense</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline buffer</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolettstrahlung
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

Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) ist ein zentraler Mechanismus des interzellulären Informationstransfers. Die Aktivierung einiger GPCRs führt $G\alpha_q$ -vermittelt unter anderem zur intrazellulären Freisetzung des *second messengers* Calcium und zur Aktivierung von ERK1/2. Diese Signalkaskaden setzen sich fort, bis eine Rezeptorinaktivierung erfolgt. Demnach ist die Signalinaktivierung von entscheidender Bedeutung für die zelluläre Integrität und Funktion. G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) gelten als wichtige Regulatoren des GPCR-vermittelten Signals. Insgesamt wurden fünf nicht-visuelle GRKs (GRK2-6) identifiziert, die jeweils aus drei Domänen bestehen. Allen GRKs gemein ist die Funktion aktivierte Rezeptoren zu phosphorylieren und dadurch die Rezeptorbindung von β -Arrestinen zu initialisieren. GRK2 und GRK3 können überdies die aktivierten G-Proteine $G\alpha_q$ respektive $G\beta\gamma$ binden und dadurch zum Prozess der Signalinaktivierung beitragen.

Ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden GRK-Regulationsmechanismen fehlt bisher. Dieses ist jedoch unabdingbare Grundlage, um die Bedeutung einer GRK-Dysregulation für Krankheiten abzuschätzen, potenzielle pharmakologische Zielstrukturen zu identifizieren und die Frage zu beantworten, wie die nur fünf GRKs mit hunderten Rezeptoren regulierend interagieren und welche GRK-Domänen dabei wichtig sind.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es daher, die funktionelle Bedeutung der einzelnen GRK-Domänen für die Rezeptorsignalregulation zu quantifizieren und für ausgewählte GPCRs zu vergleichen. Hierzu wurden vier $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren, die Bradykinin B1 und B2 Rezeptoren sowie die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 (PAR1 und PAR2) ausgewählt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Calciumfreisetzung nach Rezeptoraktivierung in Abhängigkeit von überexprimierten GRKs gemessen. Im zweiten Teil wurde die Bedeutung der GRKs für nachgeordnete Signalregulatoren wie β -Arrestine und p-ERK1/2 exemplarisch an den Bradykininrezeptoren untersucht.

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde im ersten Teil mittels Fluoreszenzmessungen in HEK-293-Zellen bestimmt. Die untersuchten GRKs wurden zur Abgrenzung gegen endogene Effekte überexprimiert. Dies ließ Rückschlüsse auf den Einfluss dieser GRKs respektive der GRK-Mutanten für die Rezeptorsignalinaktivierung zu. GRK-Mutanten wurden eingesetzt, um selektiv die Relevanz einzelner GRK-Domänen beurteilen zu können.

GRK2 und 3 zeigten für die Bradykininrezeptoren eine Kinase-unabhängige, für die Protease-aktivierten Rezeptoren jedoch eine Kinase-abhängige Regulation des

Calciumsignals. Für GRK4-6 konnte bei allen untersuchten Rezeptoren eine funktionelle Abhängigkeit von der GRK-Kinasefunktion nachgewiesen werden. Die $G\alpha_q$ -Bindung an die N-terminale Domäne von GRK2 und 3 war bei beiden Bradykininrezeptoren funktionell essentiell, bei PAR1 von Bedeutung und bei PAR2 ohne Effekt für die GRK-Calciumsignalregulation. Bei allen vier Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die $G\beta\gamma$ -Bindung an die C-terminale GRK-Domäne elementar für die GRK-Funktion ist.

In Zusammenschau mit anderen Veröffentlichungen unterstützen diese Daten das Modell, dass GRK2 und GRK3 durch Bindung freier $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an den aktivierten Rezeptor rekrutiert werden und sodann in Abhängigkeit vom aktivierten Rezeptor entweder die GRK-Kinase oder die $G\alpha_q$ -Bindungsfähigkeit funktionell wichtiger ist. Untersuchungen in dieser Arbeit mittels GRK-Doppelmutanten, mit nur einer verbleibenden funktionsfähigen Domäne, wiesen überdies auf synergistische Mechanismen der beiden letztgenannten GRK-Domänen hin, welche sich unter anderem durch Intra-GRK-Interaktionen erklären ließen. Starke Unterschiede bezüglich der Regulation durch GRK4-6 zwischen den Rezeptorpaaren weisen außerdem darauf hin, dass GRK-Affinitätsunterschiede für verschiedene GPCRs existieren.

Die Messungen des zweiten Teils, welche den Einfluss der GRK2-Familie auf p-ERK1/2 nach Rezeptoraktivierung quantifizierten, wurden mittels Immun-Sandwich-Assay durchgeführt. Die Resultate bestätigten überwiegend die Relevanz der GRK-Domänen, wie bereits für Calcium beschrieben. Die Bedeutung der GRK-Überexpression für die β -Arrestin-Rezeptorrekrutierung wurde mittels Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, entgegen einer erwarteten Rezeptor-Arrestin-Bindungssteigerung, für GRK2-5 keinerlei oder geringe Veränderungen und für GRK6 eine Kinase-abhängige BRET-Signalreduktion.

Insgesamt belegen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Bedeutung der GRKs und ihrer Funktionsdomänen für die Rezeptorregulation des Calciumsignals neben der GRK-Familie primär durch die jeweiligen aktivierten Rezeptoren beeinflusst wird. Die Ergebnisse des zweiten Abschnitts illustrieren, dass die Regulation nachrangiger, zellulärer Proteine durch GRKs bisher unzureichend verstanden ist. Es müssen weitere Untersuchungen folgen, bevor zukünftig eine zielgerichtete Therapie, beispielsweise durch spezifische Beeinflussung der GRK-GPCR-Regulation eines ausgewählten Rezeptors, unter Abwägung der Risiken und Nebenwirkungen erfolgen kann.

B Summary

Signal transduction via G protein-coupled receptors (GPCR) is a central mechanism of intercellular information transfer. The activation of some GPCRs results, inter alia, in a $G\alpha_q$ mediated intracellular release of second messenger calcium and activation of ERK1/2. These signal cascades continue until the receptor is deactivated. Thus, signal inactivation is crucial to preserve cellular integrity, function and prevent cellular dysregulation or damage. G protein-coupled receptor kinases (GRKs) are classified as important regulators of the GPCR-mediated signalling. A total of five non-visual GRKs (GRK2-6) were identified, each consisting of three domains. Common to all GRKs is the function of phosphorylating activated receptors and thus initialising the receptor binding of β -arrestins. GRK2 and 3 may additionally bind activated G-proteins $G\alpha_q$ and $G\beta\gamma$ and thus contribute to signal inactivation.

Nevertheless, a deeper understanding of the underlying mechanisms of receptor regulation via GRKs is still missing. This, however, is fundamental for understanding the relevance of the GRK dysregulation in diseases and subsequently identifying potential pharmacological target structures. It should also help answering the question of how only five non-visual GRKs take part in the regulation process of hundreds of receptors and which GRK domains are relevant in this process.

The aim of this doctoral thesis is to quantify the functional relevance of different GRK domains for receptor signal regulation and to compare their impact for different GPCRs. The four $G\alpha_q$ -mediated receptors bradykinin B1 and B2 receptors and protease-activated receptors 1 and 2 (PAR1 and PAR2) are well suited for this goal.

First, the calcium release after receptor activation was measured in relation to overexpressed GRKs. Second, the importance of GRKs for downstream signal regulators such as β -arrestin and the kinase p-ERK1/2 was measured exemplarily at bradykinin receptors.

In the first section, the intracellular calcium concentration was quantified by fluorescence measurements in HEK-293 cells. The investigated GRKs were overexpressed to differentiate them from endogenous effects. This allowed drawing conclusions on the influence of these GRKs and their mutants for receptor signal inactivation. GRK mutants have been used to selectively assess the relevance of individual GRK domains.

GRK2 and 3 showed a kinase-independent regulation of the calcium signal for both bradykinin receptors, but a kinase-dependent regulation for the protease-activated receptors. For GRK4-6 the functional dependence on GRK kinase activity could be demonstrated for all investigated receptors. $G\alpha_q$ binding to the N-terminal domain of GRK2 and 3 was functionally essential for both bradykinin-receptors, important for PAR1 and without effect for GRK

calcium signal regulation of PAR2. For all four receptors the G β γ binding to the C-terminal GRK domain was crucial for the GRK function.

In consensus with other publications, these data support the model of GRK2 and 3 being recruited to the activated receptor by G β γ binding. Subsequently, either the GRK kinase or the G α_q binding ability is functionally more important, depending on the activated receptor. Studies carried out within this thesis using GRK2 and 3 double mutants with only one functional domain remaining also indicated synergistic mechanisms of the latter two GRK domains, which could be explained, inter alia, by intra-GRK interactions. Additionally, strong differences between the pairs of receptors seen in GRK4-6 regulation allow the assumption that GRK affinity differences exist for different GPCRs.

Measurements in the second section, which quantified the effect of GRK2 family for p-ERK1/2 generation after GPCR activation, were processed by immunosandwich assay. The results confirmed mainly the relevance of the GRK domains, as described above for calcium. The impact of GRK overexpression on β -arrestin recruitment to the activated receptor, were carried out by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Corresponding results showed no or minor changes for GRK2-5 after GRK overexpression, contrary to the expected increase in receptor- β -arrestin binding and BRET-signal, except for GRK6, where a GRK kinase-dependent reduction of the BRET-signal could be detected.

Altogether, these investigations substantiate that the influence of GRKs and their functional domains on receptor calcium signal regulation is primarily determined by the activated receptor along with the GRK family involved. Moreover, the results of the second section illustrate that the regulation of cellular proteins downstream to receptors via GRK has so far been understood insufficiently. Thus, further investigations must follow before a targeted therapy, for example by addressing specifically the GRK-GPCR regulation of a certain receptor, can be developed in the future taking into account potential risks and side effects.

C Einleitung

C.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Klasse der Membranrezeptoren beim Menschen dar (Miao et al., 2016). Mit nahezu 800 Genen, deren Sequenz auf 4% der codierenden Sequenz der humanen DNA gespeichert ist, fungieren die Rezeptoren als zentrale biologische Schaltstelle der interzellulären Kommunikation (Fredriksson et al., 2003; Jacobson, 2015). Meist binden Liganden extrazellulär an den Rezeptor und stabilisieren dadurch eine Konformation des Rezeptors, die zur Übertragung des Signals ins Zellinnere führt (Duc et al., 2015). Mindestens ebenso groß wie die Zahl der Rezeptoren ist auch die Zahl der Liganden, die die Rezeptoraktivität in einem Spektrum von voll agonistisch (aktivierend) bis hin zu voll antagonistisch (neutral hemmend) oder sogar invers agonistisch (Reduktion basaler Aktivität) modulieren (Abbildung 1). Nebst Neurotransmittern, Lipiden, Peptiden und verschiedenen Hormonen sind Duftstoffe und Lichteinfall im Auge Stimuli, die zur GPCR-Aktivierung führen und intrazellulär Signalkaskaden auslösen, welche sodann Zelleffekte bewirken (S. M. Lee et al., 2015).

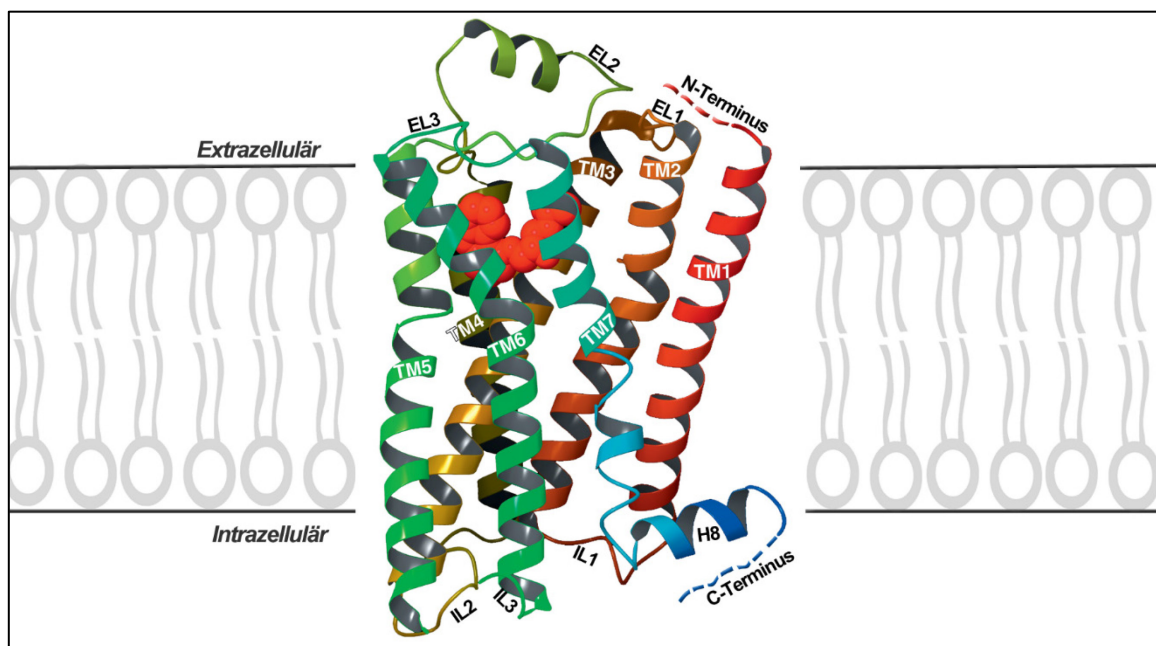


Abbildung 1: 3D-Modell des β_2 -Adrenorezeptors mit inversem Agonisten (modifiziert nach Costanzi (2013))

Der β_2 -Adrenorezeptor zeigt die charakteristische Morphologie aller GPCRs, bestehend aus sieben Transmembrandomänen (TM1-7), die durch die Zellmembran führen. Extrazellulär weist der Rezeptor den N-Terminus und drei Peptidschleifen (EL1-3) auf, intrazellulär den C-Terminus, drei intrazelluläre Schleifen (IL1-3) und die Helix 8 (H8). Der inverse Agonist Carazolol wird durch das rote Molekül repräsentiert.

Eine Eigenschaft, die alle GPCRs vereint, ist die Strukturähnlichkeit. Die Rezeptoren bestehen aus einer Polypeptidkette, die sieben Mal hauptsächlich als α -Helix durch die

Plasmamembran der Zelle führt (Fredriksson et al., 2003). Daher werden GPCRs auch als 7-Transmembranrezeptoren (7TM) bezeichnet (Abbildung 1). Der N-Terminus sowie drei Peptidschleifen (EL1-3) sind dabei extrazellulär, der C-Terminus sowie weitere drei Peptidschleifen (IL1-3) sind intrazellulär lokalisiert (Rasmussen et al., 2007).

Dass GPCRs evolutionär hochkonserviert sind, zeigt sich neben der Struktur auch in der Tatsache, dass nicht nur Menschen und Tiere, sondern auch Pflanzen, Pilze und Protozoen selbige in einer Vielzahl exprimieren (de Mendoza et al., 2014; Strotmann et al., 2011). Die Kommunikation über Zellgrenzen hinweg kann folglich als ein zentraler Mechanismus mehrzelliger Organismen angenommen werden. Regulation und vor allem Dysregulation dieser wichtigen Rezeptorklasse ist für die Pathogenese vieler Krankheiten von großer Bedeutung (Heng et al., 2013; Roux et al., 2014). Heute sind die Rezeptoren direkte Zielstruktur für mehr als ein Drittel aller auf dem Markt befindlichen Pharmaka, darunter über 25% der 100 meistverkauften Medikamente weltweit (Cavasotto et al., 2003; V. V. Gurevich et al., 2019a; Lu et al., 2016).

Zur Familie der GPCRs gehören auch die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren B1R, B2R, PAR1 und PAR2, die im Folgenden detaillierter vorgestellt werden sollen.

C.1.1 Bradykininrezeptoren

Die Nonapeptide Bradykinin (BK) und der Kallidin-Metabolit [Des-Arg¹⁰]-Kallidin (DAK) gehören zur Gruppe der Kinine. Beide Peptide wirken hauptsächlich als Liganden für die Bradykininrezeptoren, den Bradykinin B1 Rezeptor (B1R) und den Bradykinin B2 Rezeptor (B2R). Die Aminosäuresequenz der beiden Rezeptoren stimmt nur zu ca. 36% überein, dadurch erklären sich teilweise ihre divergierenden Eigenschaften. Die Rezeptoren werden unter anderem durch ihre Bindungsaffinität zu den beiden Liganden unterschieden. B2R bindet Bradykinin, B1R [Des-Arg¹⁰]-Kallidin deutlich stärker als das jeweils andere Peptid. Regulatorisch weisen die Rezeptoren weitere Unterschiede auf, so wird B2R dauerhaft, B1R fast ausschließlich unter pathologischen Konditionen exprimiert (Faussner et al., 1998; Leeb-Lundberg et al., 2005). Auch bei der Signaltermination nach Rezeptoraktivierung zeigt sich die Verschiedenheit der Bradykininrezeptoren. B2R desensibilisiert innerhalb von Minuten. Der aktivierte B2R wird schnell internalisiert und der Ligand dissoziiert vom Rezeptor. Der B1R hingegen wird nach Ligandenaktivierung kaum desensibilisiert, nicht internalisiert und auch der Ligand dissoziiert nur sehr langsam vom Rezeptor (Marceau et al., 2020). Eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Rezeptoren konnte die Arbeit von Faussner et al., 1998 aufzeigen, wonach der C-Terminus für die Desensibilisierung und Rezeptorinternalisierung eine entscheidende Bedeutung hat. Ein Aspekt der die beiden Rezeptoren unterscheidet, ist hierbei die Phosphorylierbarkeit des C-Terminus. B2R wird phosphoryliert, B1R hingegen nicht (Alhenc-Gelas et al., 2011; Blaukat et al., 1999). Eine Langzeitstimulation mit dem

Agonisten führt bei B2R zu einer Reduktion der Rezeptorzahl, beim B1R eher zu einer Zunahme der Rezeptorexpression (Faussner et al., 1999; Phagoo et al., 2001).

Gewebshormone der Kinin-Gruppe sind mitverantwortlich für Vasodilatation und Steigerung der vaskulären Permeabilität. Von Bedeutung sind sie beispielsweise zur Blutdruck- und Nierenperforationsregulation und pathophysiologisch unter anderem bei Entzündungsreaktionen oder der Schmerzentstehung (Moreau et al., 2005). In den letzten Jahren konnten zahlreiche Studien einen kardioprotektiven Effekt der Kinine bei Herzinfarkten oder Herzinsuffizienz zeigen (Costa-Neto et al., 2008; Sharma et al., 2015). ACE (*angiotensin converting enzyme*)-Hemmer, wie beispielsweise Ramipril, die häufig bei Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt werden, führen unter anderem zum verminderten Abbau von Bradykinin. Die Kininkonzentrationssteigerung ist fundamentaler Bestandteil des pharmakologischen Wirkeffekts (Lancellotti et al., 2018).

C.1.2 Protease-aktivierte Rezeptoren

Entgegen dem oben beschriebenen Muster der GPCR-Aktivierung durch freie Liganden zeigen Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), wie der Name bereits antizipieren lässt, eine andere Form der Rezeptoraktivierung. Verschiedene Proteasen sind in der Lage Teile des N-Terminus so abzuspalten, dass der neu entstandene N-Terminus wie ein gebundener Ligand (*tethered ligand*) wirkt, der den Rezeptor als Agonist aktivieren kann (Trejo et al., 1998). Die Signaltermination erfolgt vergleichbar zu anderen GPCRs über Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors. Weil die Rezeptoraktivierung via Proteinspaltung irreversibel ist, kommt es sehr wahrscheinlich zu keinem Recycling, sondern zur Degradation des internalisierten Rezeptors (Trejo, 2003).

Aufgrund der Eigenart der irreversiblen Aktivierung wurden in dieser Arbeit die beiden Vertreter der Protease-aktivierten Rezeptoren PAR1 und PAR2 untersucht. Ihre Aminosäuresequenz stimmt zu 35% überein (Barnes et al., 2004). PAR1 wird durch Thrombin, PAR2 durch Trypsin aktiviert. Neuere Ergebnisse zeigen, dass hohe Thrombinkonzentrationen jedoch auch zur PAR2 Aktivierung durch Thrombin führen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher selektive Agonisten, die dem endogenen *tethered ligand* nachempfunden wurden, zur Stimulation genutzt. Als selektiver Agonist für PAR1 kam TFLLR-NH₂ zum Einsatz, für PAR2 2-Furoyl-LIGRLO-NH₂ (Mihara et al., 2016).

Eine Beteiligung bei der Krankheitsentstehung wurde für PAR1 und 2 unter anderem bei Entzündung, Wundheilung, Artherosklerose, myokardialem Remodelling und kardialer Hypertrophie nachgewiesen (Antoniak et al., 2013; Steinberg, 2005). Seit 2014 ist in den USA der PAR1 Hemmer Vorapaxar zugelassen. Das *small molecule* fungiert als kompetitiver Antagonist des *tethered ligand* und hemmt die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation, auf die PAR1 einen entscheidenden Einfluss hat. Durch eine

Behandlung mit Vorapaxar nach myokardialer Ischämie sollen weitere atherothrombotische Ereignisse verhindert werden (Flaumenhaft et al., 2017; Tscharre et al., 2020).

C.2 Heterotrimere G-Proteine

C.2.1 Struktur und Funktion der G-Proteine

Neben der morphologischen Struktur, bestehend aus sieben Transmembrandomänen, ist die zweite Eigenschaft, die fast alle GPCRs vereint, die Möglichkeit intrazellulär heterotrimere G-Proteine (*Guanine nucleotide-binding protein*) zu binden und zu aktivieren. G-Proteine bestehen aus einer α - (39-52 kDa), β - (~36 kDa) und γ -Untereinheit (6-9 kDa), wobei die β - und γ -Untereinheiten eng assoziiert sind, so dass sie funktionell zusammengefasst werden können (Neer, 1995; Rens-Domiano et al., 1995). G-Proteine werden nach der $G\alpha$ -Untereinheit benannt. Basierend auf Funktions- und Sequenzähnlichkeit werden vier $G\alpha$ -Familien unterschieden. Neben $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{12}$ wird $G\alpha_q$ abgegrenzt (Baltoumas et al., 2013). Die $G\alpha_q$ -Familie führt unter anderem zu der, in dieser Arbeit untersuchten, Inositoltrisphosphat (IP_3) vermittelten Freisetzung von intrazellulärem Calcium.

Auch bei der $G\beta\gamma$ -Untereinheit wurden unterschiedliche Subtypen identifiziert. So gibt es sechs unterschiedliche $G\beta$ (Sequenzähnlichkeit: 50-90%) und 12 verschiedene $G\gamma$ -Untereinheiten (Sequenzähnlichkeit: 20-80%) (Duc et al., 2015; Syrovatkina et al., 2016). Heterotrimere G-Proteine können aus unterschiedlichen Kombinationen der α , β , γ -Untereinheiten bestehen, was in variierender Affinität zu verschiedenen Rezeptoren, aber auch divergierendem Signalvermittlungsverhalten resultieren kann (Oldham et al., 2008).

C.2.2 G-Protein Aktivierung

GPCRs und heterotrimere G-Proteine diffundieren regelhaft membranassoziiert frei (Syrovatkina et al., 2016). Durch Bindung des Agonisten an den GPCR wird der sogenannte *ternary complex* gebildet, bestehend aus dem GPCR, dem intrazellulär gebundenen G-Protein und dem extrazellulär gebundenen Agonisten (Rasmussen et al., 2011).

Im inaktiven Zustand bindet die $G\alpha$ -Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP). Mediert durch Bindung an den aktivierten GPCR, der als Guaninnucleotid-Austauschfaktor (GEF) wirkt, kommt es zum Nukleotidaustausch an der $G\alpha$ -Untereinheit. Der aktivierte Rezeptor induziert die Öffnung der GDP/GTP-Bindestelle des G-Proteins und führt zur Affinitätsverschiebung von GDP hin zu Guanosintriphosphat (GTP), das darüber hinaus im Zytosol in deutlich höherer Konzentration als GDP vorliegt (Lefkowitz, 2013). Durch die GTP-Bindung an $G\alpha$ kommt es zur Dissoziation des $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ voneinander und vom Rezeptor (Carpenter et al., 2016). Damit ist der erste Schritt zur Übertragung des extrazellulären Signals ins Zellinnere erfolgt. Die freien Untereinheiten $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ können nachfolgend direkt oder indirekt durch Interaktion mit Effektorproteinen die Aktivität von

Signalkaskaden modulieren (Abbildung 2) und so die vom GPCR-Agonisten induzierte zelluläre Wirkung vermitteln (Baltoumas et al., 2013).

C.2.3 G-Protein Inaktivierung

Die Inaktivierung der G-Proteine erfolgt durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheiten. Dabei wird GTP zu GDP und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Das nunmehr GDP-gebundene $G\alpha$ assoziiert mit einem freien $G\beta\gamma$ zum heterotrimeren G-Protein. Der inaktive Ausgangszustand ist wieder erreicht, wodurch der Zyklus geschlossen ist und das heterotrimer G-Protein für eine erneute Aktivierung zur Verfügung steht (Abbildung 2).

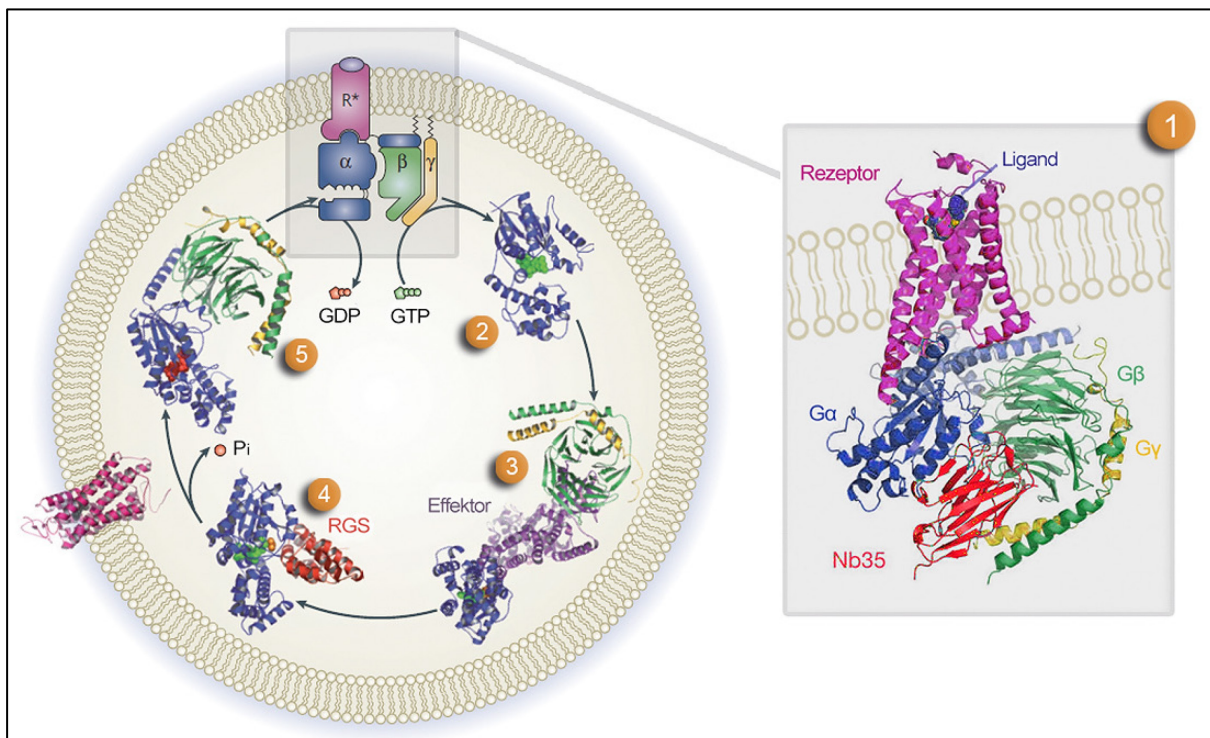


Abbildung 2: Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus (modifiziert nach Oldham et al. (2008) [links] und Rasmussen et al. (2011) [rechts])

Der G-Protein-Zyklus beschreibt den Aktivierungs-Inaktivierungskreislauf dieser Proteine. Ausgangspunkt ist der rechts dargestellte *ternary complex* (1) bestehend aus Ligand (violett), G-Protein-gekoppeltem Rezeptor (pink) und dem daran gebundenen G-Protein, zusammengesetzt aus $G\alpha$ - (blau) und $G\beta\gamma$ - (grün, gelb) Untereinheit. Zur Stabilisation der Kristallstruktur wurde artifizuell der Nanobody (Nb35) (rot) zugefügt. Durch Agonist-induzierte Konformationsänderung des GPCRs kommt es zur Liberation des GDP aus dem heterotrimeren G-Protein und der Aufnahme von GTP. Die GTP-vermittelte Aktivierung des G-Proteins führt zur Ablösung (2) der $G\alpha$ -Untereinheit von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit und beider vom GPCR. Nachfolgend können die freien, aktivierten G-Protein-Untereinheiten mit Effektoren interagieren (3) und dadurch Signalwege modulieren. Die Inaktivierung des $G\alpha$ -GTP erfolgt primär durch dessen intrinsische GTPase-Funktion, die jedoch durch Bindung von GTPase-aktivierenden Proteinen (hier: RGS - *regulator of G protein signaling*) (4) beschleunigt werden kann. Durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und anorganischem Phosphat ist $G\alpha$ inaktiviert und bindet eine freie $G\beta\gamma$ -Untereinheit (5). Nachfolgend kann das heterotrimer G-Protein wieder aktiviert werden und der Zyklus erneut beginnen.

C.3 Second messenger Calcium

C.3.1 Bedeutung des intrazellulären Calciumsignals

Calcium ist eines der zentralen Signalmoleküle mehrzelliger Organismen. Es ist an der Regulation vieler vital bedeutsamer Zellfunktionen beteiligt, wie beispielweise der Zellproliferation und Induktion des Zelltods (Carafoli et al., 2016; Pinto et al., 2015). Um eine präzise, physiologische Wirkung des intrazellulären Calciums gewährleisten zu können, ist die strikte Kontrolle der zytosolischen Calciumkonzentration essentiell (Carafoli et al., 2016). Als Beispiel hierfür kann der IP_3 -Calcium-Signalweg im kardiovaskulären System gelten. Kommt es zur Dysregulation desselben, können unter anderem Hypertonie und Herzinsuffizienz resultieren (Althoff et al., 2015; Nakayama et al., 2010).

C.3.2 IP_3 -Calcium-Signalweg

Der IP_3 -Calcium-Signalweg wird in der Regel durch die Bindung eines Agonisten an einen $G\alpha_q$ -gekoppelten GPCR induziert (Abbildung 3).

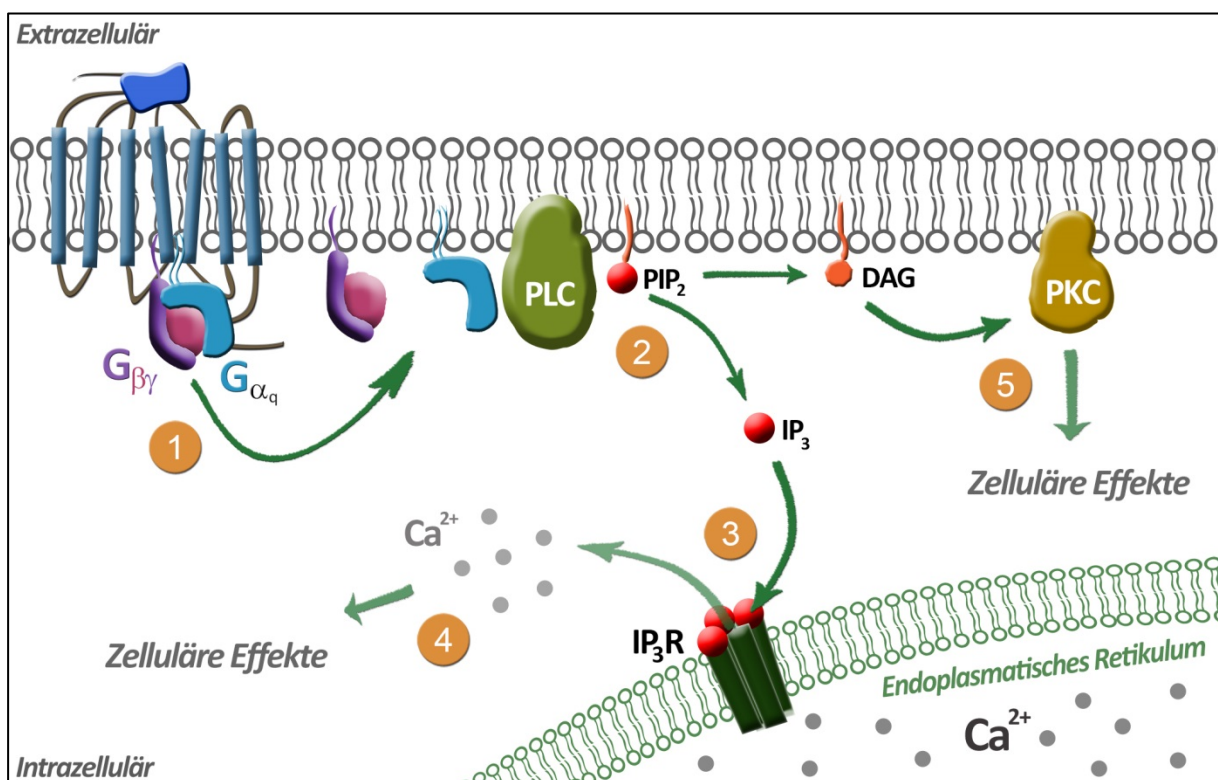


Abbildung 3: Schematische Darstellung des IP_3 -Calcium-Signalwegs

Nach der Agonisten-induzierten GPCR-Aktivierung kommt es am G_q -Protein zum Austausch von GDP gegen GTP und dadurch zur Ablösung und Dissoziation des heterotrimeren G_q -Proteins (1). Das freie, aktive $G\alpha_q$ und/oder $G\beta\gamma$ induziert im 2. Schritt die Phospholipase $C\beta/\gamma$ (PLC). Dies führt durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zur Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). IP_3 bindet sodann an den IP_3 -Rezeptor (IP_3R) in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (3) und führt dort zur transienten Calciumfreisetzung (4). Die intrazelluläre Calciumliberation moduliert und steuert nachrangig (*downstream*) zahlreiche zelluläre Effekte. DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche durch Phosphorylierung von Effektorproteinen modulatorisch auf zelluläre Effekte wirkt (5).

Nach Freisetzung von $G\alpha_q$ kann die membranständige Phospholipase $C\beta$ aktiviert werden. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und setzt dadurch Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) frei (Raffaello et al., 2016; Sterne-Marr et al., 2003). IP_3 bindet sodann an den IP_3 -Rezeptor (IP_3R) am endoplasmatischen Retikulum und führt dort zur transienten Freisetzung von Calcium ins Zytosol (Mak et al., 2015). Auch die freie $G\beta\gamma$ -Untereinheit kann zur Aktivierung der Phospholipase $C\gamma$ (PLC γ) und dadurch zur Freisetzung von Calcium führen (Katz et al., 1992).

C.4 MAPK-Signalweg

Neben dem *second messenger* Calcium ist auch die Ebene der intrazellulären Effektoren Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit. Konkret wurde hierzu ERK1/2, ein Zielenzym des MAPK-Signalwegs, experimentell quantifiziert.

C.4.1 ERK1/2

Der MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)-Signalweg ist eine hochkonservierte Signalkaskade, welche nach erfolgter Rezeptorstimulation zelluläre Effekte induziert (Seger et al., 1995). ERK1/2 (*Extracellular-Signal Regulated Kinase*) zählt neben JNK, p38 Kinase und ERK5 zu den vier wichtigsten MAPK-Kaskaden (Wortzel et al., 2011).

ERK1/2 kann als Prototyp der MAPKs gelten. Mehr als 200 verschiedene zelluläre Substrate konnten bereits als Ziel der Kinase identifiziert werden (von Kriegsheim et al., 2009; Yoon et al., 2006), darunter auch viele Transkriptionsfaktoren im Zellkern (Brunet et al., 1999). ERK1/2 reguliert durch Phosphorylierung unter anderem den Zellzyklus, die Zellproliferation, die Proteintranskription und die Zelldifferenzierung, wie auch den Zelltod (Pearson et al., 2001; Ramos, 2008). Die ERK1/2-Signalkaskade selbst wird durch zahlreiche zelluläre Modulatoren in einem komplexen Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung gehalten (Ramos, 2008; Wortzel et al., 2011). Die Relevanz dieser strikten Regulation zeigen Untersuchungen, die der Dysregulation von ERK1/2 einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Tumoren, Diabetes oder kardiovaskulären Krankheitsbildern, wie Herzhypertrophie, zuschreiben (Rose et al., 2010).

C.4.2 $G\alpha_q$ -vermittelte ERK1/2 Modulation

MAPKs sind auch bei der Transduktion vieler GPCR-Signale von Bedeutung. $G\alpha_q$ beispielsweise wirkt über das PLC-induzierte Signal aktivierend auf die ERK1/2-Kaskade (Abbildung 4). Sowohl über die IP_3 -vermittelte Calciumfreisetzung als auch über die DAG-aktivierte-PKC kann der ERK1/2-Signalweg stimuliert werden. Welcher der beiden oder ob beide Pfade hierfür genutzt werden, scheint Zelltyp-abhängig (Goldsmith et al., 2007). Bradykinin B2 Rezeptoren wirken hauptsächlich über die $G\alpha_q$ vermittelte IP_3 -Calciumliberation auf das ERK1/2 Signal (Dikic et al., 1996). Dennoch konnte in HEK-293-

Zellen gezeigt werden, dass eine effiziente ERK1/2-Stimulation das Zusammenwirken des G_{α_q} und des G_{α_i} vermittelten Bradykinin B2 Rezeptorsignals bedarf (Leschner et al., 2011). $G_{\beta\gamma}$ hingegen beeinflusst die Aktivierung des ERK1/2 Signals nicht direkt (Blaukat et al., 2000). Neuere Untersuchungen konnten dennoch eine wichtige Funktion der freien $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit nach Abspaltung von G_{α_q} detektieren. Durch Dimerisierung des aktivierten p-ERK1/2 (phosphoryliertes ERK1/2) und Bindung der freien $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit, kann es zur Autophosphorylierung des ERK1/2 kommen. Das zusätzlich phosphorylierte p-ERK1/2 kann sodann im Zellkern Zielproteine aktivieren und dadurch beispielsweise in Kardiomyozyten eine Hypertrophie induzieren (Lorenz et al., 2009).

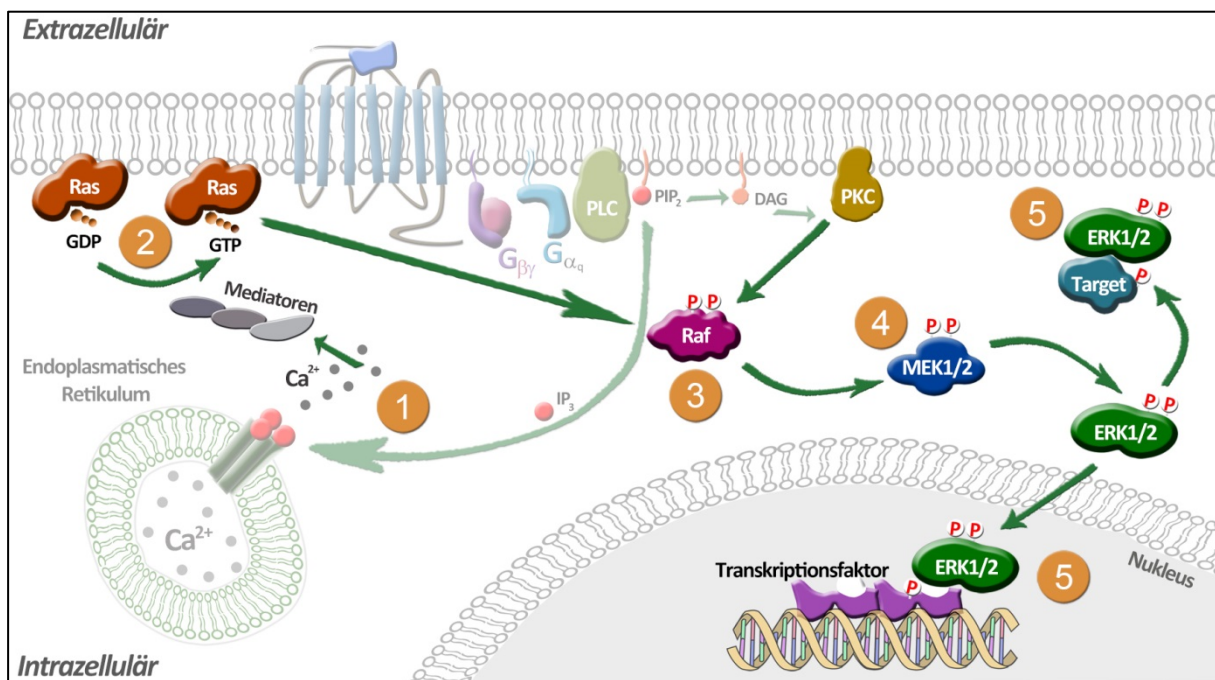


Abbildung 4: Schematische Darstellung der ERK1/2-Signalkaskade

Nach der Aktivierung des heterotrimeren G_q -Proteins, der Hydrolyse von PIP_2 zu DAG und IP_3 sowie der Freisetzung von Calcium ins Zytosol (1) kommt es durch einige Mediatoren (grau) zur Aktivierung der ERK1/2-Phosphorylierungskaskade, beginnend beim kleinen G-Protein Ras (2). Dieses führt zur Aktivierung von Raf (3). Auch DAG kann zur Aktivierung von Raf führen, dies erfolgt über die PKC-vermittelte Raf-Phosphorylierung (3). Aktiviertes Raf selbst phosphoryliert die MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase) (4), welche sodann ERK1/2 durch Phosphorylierung aktiviert. Die Proteinkinase p-ERK1/2 kann sowohl zytosolische als auch nukleäre Zielproteine durch Phosphorylierung steuern (5).

C.5 Desensibilisierung des GPCR-Signalwegs

Um eine dauerhafte Aktivierung der GPCRs und damit einhergehend eine dauerhafte Aktivierung der nachfolgenden Signalwege zu verhindern, gibt es auf verschiedenen Ebenen Mechanismen, die eine Desensibilisierung und Inaktivierung der beteiligten Proteine bewirken und dadurch die zelluläre Homöostase aufrechterhalten (Kennedy et al., 2015). Durch diese Regulation wird die rasche Adaptation der Zelle an veränderte Bedingungen sichergestellt sowie gewährleistet, dass nachfolgende Ligandenstimuli detektiert werden können.

Das klassische Model der Rezeptordesensibilisierung gilt als wichtiger Schritt dieser Regulation (Abbildung 5) und basiert auf der These, dass Phosphorylierung des aktivierten GPCRs essentielle Voraussetzung für die nachfolgenden Schritte ist (Smith et al., 2016). Unterschieden wird homologe und heterologe Desensibilisierung, wobei zellulär beide Komponenten an der Rezeptorregulation beteiligt sind. Bei der heterologen Desensibilisierung phosphoryliert eine aktivierte *second-messenger*-abhängige Kinase, wie die Proteinkinase C, Signalproteine und GPCRs, unabhängig von deren Aktivitätszustand (Rajagopal et al., 2018).

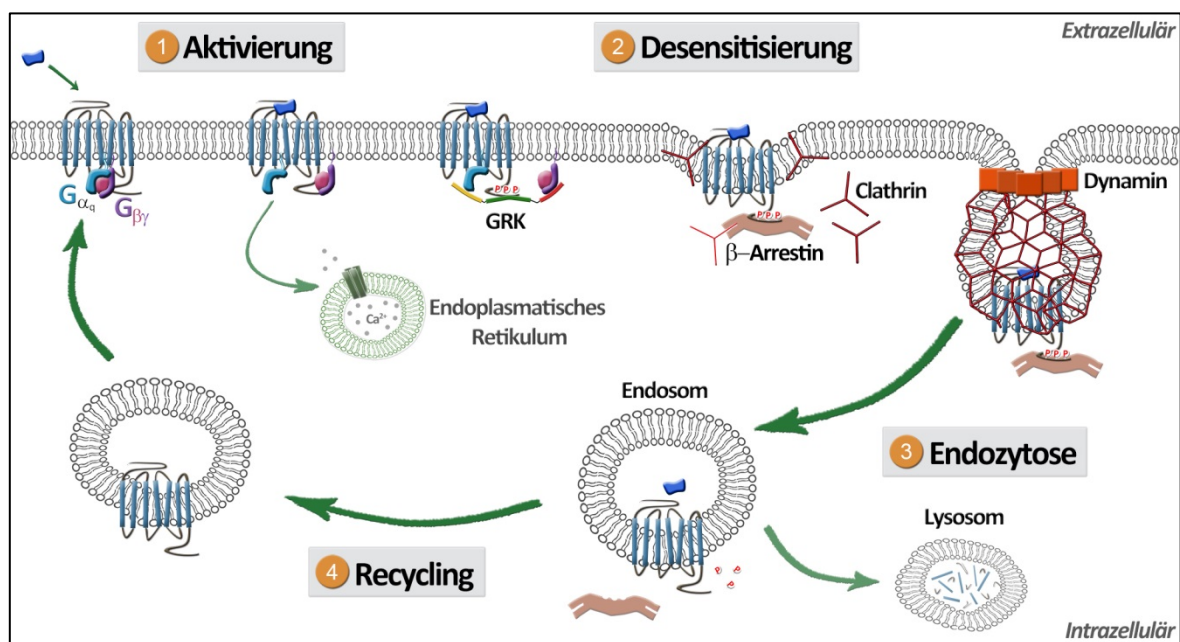


Abbildung 5: Homologe Desensibilisierung am Beispiel eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptors (modifiziert nach Moore et al. (2007))

Nach der Aktivierung (1) des Rezeptors durch den agonistischen Liganden (blau) und Aktivierung der entsprechenden G-Proteine kommt es in den meisten Fällen zu einer schnellen Signalabschaltung. G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) phosphorylieren den aktivierten Rezeptor, was den ersten Schritt der homologen Desensibilisierung (2) darstellt. Zytosolische Arrestine und in der Folge Internalisierungsinduktoren, wie Clathrin und Dynamin, werden an den phosphorylierten Rezeptor rekrutiert und führen zu dessen Endozytose (3). Abhängig vom Rezeptor werden im Endosom der Ligand, die GRK-Phosphorylierung und alle gebundenen intrazellulären Regulator entfernt und der Rezeptor anschließend an die Membran zurückgebracht (4) oder in einem Lysosom abgebaut.

Die homologe Desensibilisierung wird vor allem durch sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) initialisiert und zeichnet sich dadurch aus, dass spezifisch die GPCRs phosphoryliert werden die aktiviert sind (Benovic et al., 1986; Lohse et al., 1990).

Nach der Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors folgt die Membranrekrutierung von weiteren Proteinen, wie den zytosolischen β -Arrestinen (Barak et al., 1997). Diese binden an den Rezeptor, verhindern dadurch unter anderem eine weitere Aktivierung von G-Proteinen und vermitteln die Rezeptorinternalisierung. Abhängig vom GPCR kommt es nach Inaktivierung und Ablösung des Liganden im Endosom zum Recycling des Rezeptors an die Membran oder zu dessen proteolytischem Abbau (Roux et al., 2014).

Experimentelle Eliminierung der Phosphorylierung beim β_2 -adrenergen Rezeptor durch Einsatz von phosphorylierungsdefizienten Rezeptoren oder Kinase-defizienten Rezeptorkinasen verhinderte die Rekrutierung nachrangiger Regulationsmoleküle, wie den β -Arrestinen und somit die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung (Bouvier et al., 1988; Kong et al., 1994). Ob selbiges auch für andere Rezeptoren zutrifft, ist bislang nur unzureichend erforscht. Untersuchungen zu einzelnen Rezeptoren weisen jedoch darauf hin, dass es auch phosphorylierungs-unabhängige Desensibilisierung gibt (Fernandez et al., 2011; Perroy et al., 2003; Ribeiro et al., 2009).

C.6 β -Arrestin 1 und 2

Arrestine sind am Prozess der phosphorylierungs-abhängigen GPCR-Desensibilisierung und -Internalisierung beteiligt. Zur Familie der Arrestine gehören vier Mitglieder, darunter die außerhalb der Retina ubiquitär exprimierte Vertreter β -Arrestin 1 und 2 (Attramadal et al., 1992; Lohse et al., 1990). Auch wenn die beiden β -Arrestine eine Sequenzähnlichkeit von >70% aufweisen, so zeigen Ergebnisse der letzten Jahre, dass sie teilweise funktionelle Unterschiede aufweisen (Srivastava et al., 2015).

Generell gilt, dass β -Arrestine vor allem durch Phosphorylierung der aktivierten GPCRs rekrutiert werden (Bouvier et al., 1988; Wilden, Wüst, et al., 1986), an den Rezeptor binden und dadurch weitere G-Protein-Bindung und Aktivierung sterisch behindern (Lohse et al., 1990). Dies erklärt auch den Namen Arrestin vom Englischen *to arrest* (aufhalten) (Krupnick et al., 1998). β -Arrestine dienen selbst als Gerüstproteine (*Scaffold*-Proteine), die zur Anlagerung von Clathrin und ähnlichen Internalisierungsproteinen führen und dadurch, nebst der Inaktivierung und Desensibilisierung, auch die Internalisierung der GPCRs in Endosomen vermitteln (Goodman et al., 1996). Dabei ist zu beachten, dass viele, aber nicht alle, GPCRs β -Arrestine zur Internalisierung benötigen (Bhatnagar et al., 2001; K. B. Lee et al., 1998).

C.7 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, kurz GRKs, gehören zur Enzymklasse der Serin/Threonin-Kinasen. Die initial identifizierte Funktion der GRKs bestand in der Phosphorylierung aktivierter GPCRs als erster Schritt der homologen Desensibilisierung (J. A. Pitcher et al., 1998). Seither wurden zahlreiche, teilweise phosphorylierungs-unabhängige Effekte der GRKs für ausgewählte GPCRs aber auch für nachrangige Zellstrukturen, wie beispielsweise MEK (MAPK/ERK Kinase), beschrieben (Black et al., 2016; Jimenez-Sainz et al., 2006; Steury, McCabe, et al., 2017).

GRKs gelten, ebenso wie die GPCRs, als evolutionär hochkonservierte Proteine deren Existenz und Struktur sich bis zu eukaryotischen Einzellern zurückverfolgen lassen. Es

wurden sieben verschiedene GRKs (GRK1-7) identifiziert. Diese werden anhand von Sequenzübereinstimmung in drei Familien eingeteilt (Komolov et al., 2018).

GRK1 und 7 werden nur in der Retina exprimiert, dienen dort der Opsin-Signalregulation und werden der GRK1-Familie zugeordnet (Komolov et al., 2018). Alle übrigen GRKs (GRK2-6) werden in dieser Arbeit näher betrachtet. Sie werden ubiquitär exprimiert, mit Ausnahme der GRK4, die vor allem im Hoden, Kleinhirn und der Niere vorkommt (Allen et al., 2015). GRK2 und 3 weisen eine ca. 80%-ige Sequenzähnlichkeit auf und werden als GRK2-Familie zusammengefasst. Die Aminosäuresequenzen von GRK4, 5 und 6 sind zu ca. 70% ähnlich, sie bilden die dritte, sogenannte GRK4-Familie (J. A. Pitcher et al., 1998). GRKs zeichnen sich durch ihre Strukturähnlichkeit aus, bestehend aus drei Funktionsdomänen (siehe Abbildung 6).

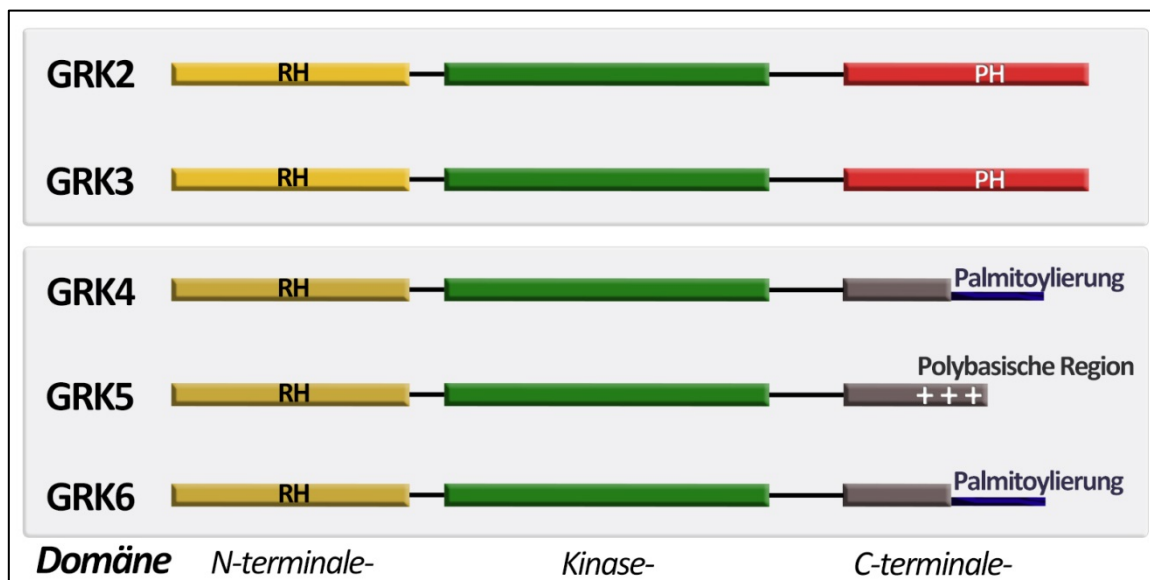


Abbildung 6: Schematische Darstellung der GRK-Funktionsdomänen (modifiziert nach Willets et al. (2003))

GRKs bestehen aus drei Funktionsdomänen, die jedoch abhängig von der GRK-Familie unterschiedliche Strukturmerkmale und daraus folgende Eigenschaften aufweisen. Hochkonserviert ist bei allen GRKs die zentrale Kinasedomäne sowie eine N-terminale RH-Domäne (*Regulator of G protein signaling homology* Domäne). Spezifisch für die GRK2-Familie ist die Möglichkeit an der RH-Domäne freie $G\alpha_q$ und an der C-terminalen PH-Domäne freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zu binden. Die GRK4-Familie hingegen weist C-terminal Palmitoylierungen (GRK4, 6) oder polybasische Sequenzen (GRK5) auf, die eine dauerhafte Membranbindung dieser GRKs ermöglichen.

Die N-terminale Domäne umfasst bei allen GRKs ungefähr 185 Aminosäuren (AS), weist eine Sequenzähnlichkeit von circa 30% und als Strukturmerkmal eine RH-Domäne (*regulator of G protein signaling homology domain*) auf (Lodowski et al., 2006; J. A. Pitcher et al., 1998).

Die Kinasedomäne bildet die zentrale Funktionsdomäne aller GRKs und ist mit einer Länge von 263 – 266 AS hochkonserviert (Lodowski et al., 2006; J. A. Pitcher et al., 1998).

Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass verschiedene GRKs unterschiedliche Phosphorylierungspräferenzen für Rezeptoren, Rezeptordomänen oder spezifische Aminosäuresequenzen haben. Je nachdem, welche der GRKs 2-6 rekrutiert und aktiviert wird, resultieren wahrscheinlich unterschiedliche Phosphorylierungsmuster der intrazellulären Peptidschleifen respektive des GPCR C-Terminus (Blaukat et al., 2001; Shenoy et al., 2011). Dieses möglicherweise GPCR/GRK-spezifische Phosphorylierungsmuster könnte wie ein „Barcode“ funktionieren. Untersuchungen der letzten zehn Jahre stützen die Hypothese, dass dieser „Barcode“ die nachfolgende Proteinrekrutierung von beispielsweise β -Arrestinen GRK-spezifisch beeinflusst und somit die Signaltermination moduliert (Li et al., 2015; Nobles et al., 2011).

Die C-terminale Domäne, mitverantwortlich für die Membranlokalisierung der GRKs, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den GRK-Familien. So sind GRK2 und 3 mit einer Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne ausgestattet und diese ist mit ca. 230 AS knapp 100 AS länger als der C-Terminus der GRK4-Familie. GRKs der GRK4-Familie zeichnen sich zum Teil durch posttranslationale Modifikationen aus, wie die Palmitoylierung der GRK4 und 6 illustriert, die wahrscheinlich eine Lokalisierung dieser beiden GRKs an der Plasmamembran zur Folge hat. Gleiches gilt auch für die GRK5, die einen polybasischen C-Terminus aufweist, welcher mit den negativ geladenen Membranlipiden der Plasmamembran interagieren kann (Komolov et al., 2018; J. A. Pitcher et al., 1998).

Trotz umfassender Studien ist bisher wenig darüber bekannt, ob und wie nur fünf ubiquitär exprimierte GRKs hunderte GPCRs mit zum Teil sehr unterschiedlichen Aminosäuresequenzen regulieren können (Komolov et al., 2018), wie GRKs aktivierte GPCRs spezifisch erkennen und binden, welche GRK-Domänen dabei wichtig sind und insbesondere welche Bedeutung phosphorylierungs-unabhängige Effekte für die GRK-Funktionalität haben.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die funktionelle Relevanz der einzelnen GRK-Domänen im direkten Vergleich für unterschiedliche GPCRs zu evaluieren. Nachfolgend werden die für diese Arbeit wichtigsten Erkenntnisse der Literatur gegliedert nach GRK-Familien dargestellt.

C.7.1 GRK2-Familie

GRK2 und 3 sind wahrscheinlich primär zytosolisch lokalisiert und gelangen erst nach Aktivierung eines GPCRs an die Plasmamembran, wo selbige mit dem aktivierten Rezeptor interagieren. Eine mögliche Erklärung für die Translokation der GRKs nach GPCR-Aktivierung konnte bereits 1992 für den β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 -AR) identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die C-terminal-lokalisierte PH-Domäne der GRK an das Membranphospholipid PIP_2 und an freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten binden kann, welche nach β_2 -AR-Aktivierung und Spaltung der heterotrimeren G-Proteine freigesetzt werden. Außerdem

belegen die Daten, dass die GRK-G $\beta\gamma$ -Bindung zu einer verstärkten Kinaseaktivität der GRKs am β_2 -AR beiträgt (DeBurman et al., 1996; J. Pitcher et al., 1992).

Die Kristallisation von GRK2 mit, an dessen C-terminale PH-Domäne gebundenem G $\beta\gamma$ verifizierte dies und illustrierte, dass GRK2 in einer triangulären Quartärstruktur vorliegt, wobei N- und C-Terminus die zentrale Domäne der GRK umschließen. Weiter konnte gezeigt werden, dass GRK2 neben der G $\beta\gamma$ -Untereinheit zeitgleich G α_q mit seiner N-terminalen RH-Domäne binden und dadurch funktionell inaktivieren kann, wie dies schematisch in Abbildung 7 illustriert ist. Eine direkte Bindung von G α_i oder G α_s an GRK2 oder 3 konnte hingegen bisher nicht nachgewiesen werden. Die sterische Interaktion der drei GRK-Funktionsdomänen bietet Hinweise für die Verstärkung ihrer Kinaseaktivität durch gleichzeitige Bindung der aktivierten G-Proteinuntereinheiten an die N- oder C-terminale Domäne der GRK (Carman et al., 1999; Lodowski et al., 2003; Salles, Mariggio, et al., 2000; Tesmer et al., 2005). Die Entdeckung einer N-terminal lokalisierten Bindestelle für die C-terminale PH-Domäne unterstreicht die Hypothese von Intra-GRK-Interaktionen und die Orientierung in triangulärer Quartärstruktur (Lodowski et al., 2006).

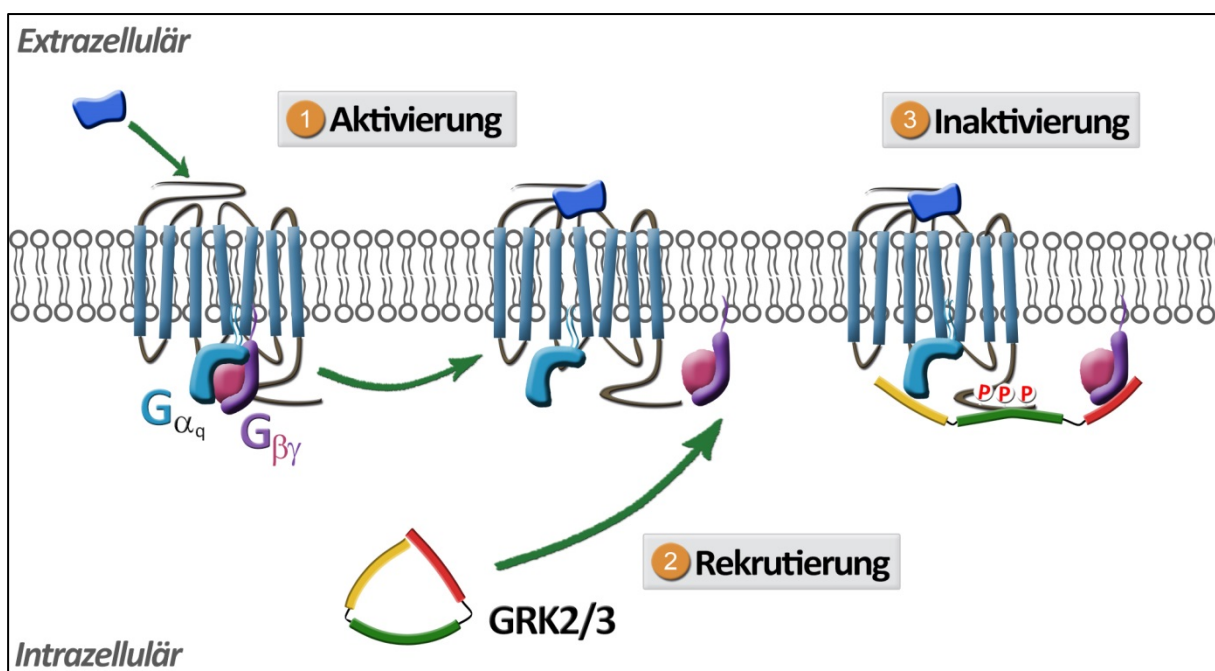


Abbildung 7: Schematische Darstellung der GRK2 und 3 Rekrutierung nach GPCR-Aktivierung

Im inaktiven Zustand befindet sich die GRK2 oder 3 im Zytosol. Erst nach Aktivierung (1) des GPCRs und Spaltung des intrazellulären heterotrimeren G-Proteins in die beiden Untereinheiten G α und G $\beta\gamma$ folgt die Membranrekrutierung (2) der GRK2 und 3. Diese erfolgt dabei am ehesten durch die Bindung der C-terminalen PH-Domäne an die nun freie G $\beta\gamma$ -Untereinheit. Durch die räumliche Nähe des freien G $\beta\gamma$ zum aktivierten GPCR und die Bindung der GRK an diesen, wird die GPCR Phosphorylierung (P) durch GRK wahrscheinlicher (3). Die Struktur der GRK lässt eine gleichzeitige Bindung und Inaktivierung der freien G α_q -Untereinheit zu, die überdies zur Signaltermination beiträgt.

Die Struktur der GRK3 ist bisher wenig untersucht, wobei die Sequenzähnlichkeit von knapp 85% vermuten lässt, dass die für GRK2 beschriebenen Erkenntnisse weitestgehend auch für

GRK3 gelten. Davon abzugrenzen ist jedoch der Bereich der C-terminalen PH-Domäne, in der die beiden GRKs deutliche Unterschiede aufweisen und eine isoliert betrachtete AS-Übereinstimmung von nur knapp 52% vorliegt (Daaka et al., 1997; Komolov et al., 2018).

C.7.2 GRK4-Familie

Im Gegensatz zur GRK2-Familie sind die drei GRKs der GRK4-Familie überwiegend membrangebunden (Abbildung 8). Dies resultiert aus ihrer C-terminalen Beschaffenheit bzw. den posttranslationalen Modifikationen (Willets et al., 2003). Durch die Membranlokalisation der GRK4-6 konnte teilweise eine Phosphorylierung von Rezeptoren auch im inaktiven Zustand nachgewiesen werden (Li et al., 2015; Rankin et al., 2006).

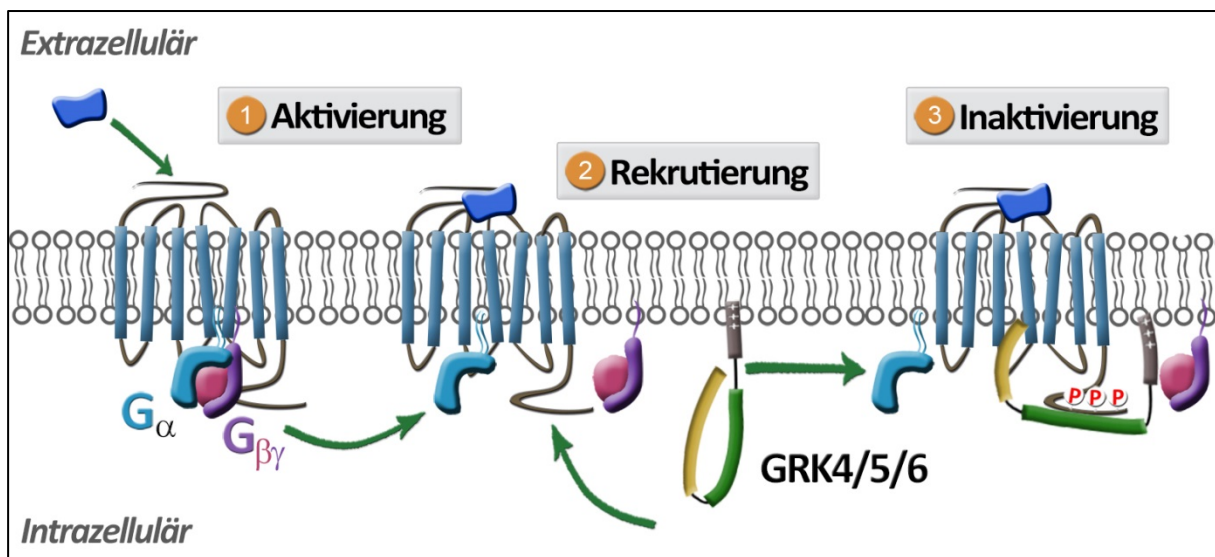


Abbildung 8: Schematische Darstellung der GRK5 Rekrutierung nach GPCR-Aktivierung (gemäß Komolov et al. (2017))

GRK4 und 6 sind mittels C-terminaler Palmitoylierungen, GRK5 durch eine polybasische Sequenz im C-Terminus wahrscheinlich dauerhaft an der Plasmamembran lokalisiert. Nach Aktivierung (1) des GPCRs und Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die beiden Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ folgt die Rekrutierung (2) der (hier dargestellten) GRK5 an den aktivierten Rezeptor, das Aufbrechen des *ionic lock*, einer elektrostatischen Interaktion zwischen N-terminaler und Kinase-Domäne und anschließend die Phosphorylierung des GPCRs (3). Eine Interaktion mit den G-Protein Untereinheiten, wie für die GRK2-Familie nachgewiesen, ist für die GRK4-Familie bisher nicht bekannt.

Die Kristallisation der GRK6 identifizierte weitere Unterschiede. Die N-terminale RH-Domäne weist jeweils eine Bindestelle sowohl für PIP_2 als auch für die eigene Kinase-Domäne auf. Dies macht eine Intra-GRK6-Interaktion möglich. Eine direkte Bindung der GRK5 oder GRK6 an $G\alpha$ -Untereinheiten konnte bisher nicht gezeigt werden (Carman et al., 1999; Lodowski et al., 2006). Die Analyse der GRK5 ergab ähnliche Bindestellen wie für GRK6 gezeigt, wobei eine dynamische Strukturanalyse in Interaktion mit β_2 -AR nahelegt, dass eine elektrostatische Bindung, das sogenannte *ionic lock*, zwischen der N-terminalen Domäne und der Kinase-Domäne für die Stabilisierung der GRK im inaktiven Zustand von großer Bedeutung ist. Das *ionic lock* bricht demnach bei GPCR-Bindung auf, was die GRK5 in einen

elongierten, aktivierten Zustand überführt (Komolov et al., 2017). GRK4 weist eine grundsätzlich ähnliche Kristallstruktur wie GRK6 auf, wobei Hinweise auf eine mögliche zytoplasmatische Lokalisation inaktiver GRK4 und eine potenzielle Dimerisierung der membrangebundenen GRK4 vorliegen (Allen et al., 2015).

C.7.3 Pathophysiologische Bedeutung der GRKs

Bei Herzinfarkt und Herzinsuffizienz sind GRKs häufig vermehrt exprimiert, bei Multipler Sklerose sowie Arthritis konnte das Gegenteil gezeigt werden (Mayor et al., 2018; Tarrant et al., 2008; Tutunea-Fatan et al., 2015; Ungerer et al., 1993; Vroon et al., 2005). Neuere Studien deuten darauf hin, dass auch verschiedene Tumorpathologien mit dysregulierter GRK-Expression und -Aktivität einhergehen (Nogues et al., 2018; Yu et al., 2018). In welchen der genannten Fälle die GRKs ursächlich beteiligt und bei welchen Krankheiten die Dysregulation der GRKs Folge der Veränderungen im Krankheitsfall sind, bleibt vielfach noch zu klären.

Für die Herzinsuffizienz, eine der häufigsten Todesursachen weltweit, konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Normalisierung der GRK2-Aktivität zur Reduktion der Krankheitsprogression und Verbesserung des Outcomes führt (Raake et al., 2012; Rengo et al., 2016; Schlegel et al., 2017; Schumacher et al., 2015). Dies macht deutlich, dass die GRK-GPCR-Interaktion potenzielles Ziel für pharmakologische Therapien werden kann. Einen ersten therapeutischen Ansatz hierfür bietet der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Paroxetin, der als GRK2-Inhibitor identifiziert werden konnte und im Mausmodell bereits einen positiven Einfluss bei Herzinsuffizienz zeigte (Guo et al., 2017). Um zukünftig Pharmaka zu entwickeln, die hochselektiv die Interaktion von bestimmten GPCRs mit einzelnen GRKs oder GRK-Domänen modulieren, ist ein umfassendes Verständnis der GRK-Funktionsdomänen und der GRK-Rezeptor-Interaktion essentiell.

D Fragestellung und experimentelle Vorgehensweise

Regulation extrazellulärer Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, G-Proteine, *second messenger* bis zu den intrazellulären Effektoren erfolgt in engen Grenzen. Dysregulation des Gleichgewichts zwischen Aktivierung und Inhibition intrazellulärer Signaltransduktoren ist Grund für Dysfunktion auf zellulärer Ebene und Ursache zahlreicher Krankheiten. Ebenso wichtig wie die Aktivierung eines Signalwegs ist daher die Termination des selbigen, um das intrazelluläre Gleichgewicht, die Funktionalität und nicht zuletzt auch das Überleben eines Zellverbands zu gewährleisten.

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) gelten als elementare Regulatoren dieses Gleichgewichts. GRKs induzieren durch ihre Interaktion mit den gleichnamigen Rezeptoren deren Desensibilisierung und können somit als Regulatoren auf intrazellulär erstem Level gelten. Folglich verwundert es nicht, dass gezeigt werden konnte, dass Überexpression, aber auch *Knockdown* der GRKs zu pathologischen Verschiebungen des intrazellulären Signalgleichgewichts führen. Wie nur fünf außerhalb der Retina exprimierte GRKs mit hunderten Rezeptoren regulierend interagieren und welche GRK-Domänen dabei wichtig sind, ist bisher unzureichend untersucht. Ein tieferes Verständnis dieser Mechanismen ist aber unabdingbare Grundlage für die Identifikation möglicher pharmakologischer Zielstrukturen für eine therapeutische Modulation in der Zukunft.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die funktionelle Bedeutung der einzelnen GRK-Domänen für die Rezeptorsignalregulation zu quantifizieren und für ausgewählte GPCRs zu vergleichen. Hierzu wurden vier $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren, die Bradykinin B1 und B2 Rezeptoren sowie die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 ausgewählt.

Im ersten Teil wurde die Calciumfreisetzung nach Rezeptoraktivierung gemessen. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde mittels Fluoreszenzmessungen in HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von überexprimierten GRKs bestimmt. Dabei wurden neben GRK Wildtypen auch Mutanten eingesetzt, um selektiv die Relevanz einzelner GRK-Domänen beurteilen zu können.

Im zweiten Teil wurde die Bedeutung der GRKs für nachgeordnete Signalregulatoren wie β -Arrestine und p-ERK1/2 exemplarisch an den Bradykininrezeptoren untersucht. Die Messungen erfolgten mittels Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer oder Immun-Sandwich-Assay.

E Material und Methoden

E.1 Material

E.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage, 3716MP	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage, EMB 600-2	Kern, Balingen
Attune Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems, Darmstadt
Elektrophoresekammer Minisubcell GT	Biorad, München
Flockeneisbereiter AF 100	Scotsman, Sprockhövel
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-70	Olympus, Tokyo, Japan
UV-Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Heraeus HERAcell™ CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heraeus HERAsafe™ Typ HS18/2	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Wärmeschrank B30	Memmert, Schwabach
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Tokyo, Japan
NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen
Paramix II	Julabo, Seelbach
PCR Primus 25 Thermal Cycler	MWG Biotech, Ebersberg
PCR Thermocycler Primus Typ 25 advanced®	Peqlab, Erlangen
PCR TPersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH Meter 766 Calimatic®	Knick, Berlin
Platereader BioTek® Synergy 2	BioTek, Bad Friedrichshall
Platereader BMG FLUOstar® OPTIMA	BMG LABTECH, Ortenberg
Platereader Tecan Safire2™	Tecan, Männedorf
Platereader Tecan Infinite® 200 PRO	Tecan, Männedorf
Taumelnder Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Power Supply E44	Dansk Laboratorieudstyr A/S, Kopenhagen
UV Flächenstrahler N 36M, 312 nm	Benda Konrad Laborgeräte, Wiesloch
Power Supply EPS 301	Amersham-Pharmacia-Biotech Buckinghamshire
Roller mixer SRT9	Stuart, Staffordshire
Nalgene® Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Sterilisator LTA 400	Zirbus, Bad Grund
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad WB45	Memmert, Schwabach
X-Cell II™ Blot Module	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
X-Cell SureLock™ Electrophoresis	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge™ Pico™	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge Heraeus™ Fresco™ 17	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

E.1.2 Chemikalien und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AlphaScreen® SureFire® p-ERK1/2 (T202/Y204) Assay Kit	PerkinElmer, Rodgau
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Europe, Freiburg
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Blasticidin S HCl	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Bradykinin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
CTZ-H	Promega, Fitchburg
CutSmart® Buffer	NewEngland BioLabs, Frankfurt
DesArg10-Kallidin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin
EcoTransfect™	OZ Bioscience, Marseille, Frankreich
Erlenmeyerkolben 100, 250 und 1000ml	Wagner und Munz, München
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Falcons	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FLIPR® Calcium 5 Assay Kit	Molecular Devices, Biberach an der Riß
Gibco™ DMEM, high glucose	Life Technologies, Darmstadt
Gibco™ HBSS-Puffer (calcium, magnesium, no phenol red) (1x)	Life Technologies, Darmstadt
Gibco™ Trypsin/EDTA (1x)	Life Technologies, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HEPES Puffer (1M)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hygromycin B	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim
Micro BSA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitrocellulose Membran 0.45 µm	BioRad, München
Nunc™ CryoTube™ 1ml	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide™ System	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PAR1 Selective Agonist (TFLLR-NH ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PAR2 Selective Agonist (2-Furoyl-LIGRLO-NH ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Petrischalen, Polystyrol, Ø 9 cm	Greiner, Nürtingen
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NewEngland BioLabs, Frankfurt
QIAprep® Spin Midiprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Rotiophorese® Gel 40	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten Corning® Costar® Stripette®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4 DNA Ligase Buffer	NewEngland BioLabs, Frankfurt
T4-DNA Ligase	NewEngland BioLabs, Frankfurt
Tetrazyklin	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Trypton	AppliChem, Darmstadt
TWEEN® 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Whatman™ 3MM Chr Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen
Zellkulturplatten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zellkulturplatten farblos 96-well	TPP, Trasadingen
Zellkulturplatten schwarz 96-well, clear bottom	PerkinElmer, Rodgau
Zellkulturplatten weiß 96-well, clear bottom	PerkinElmer, Rodgau

E.1.3 Primer

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz
BGH ASE	GGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG
CMV SE	GTACATGACCTTATGGGACTTTCC
GRK 2 K220R ASE	GCTTTTTGTCCAGGCAC CT CATGGCGTACATCTTGC
GRK 2 K220R SE	GCAAGATGTACGCCATG AGGT GCCTGGACAAAAGC
GRK 3 K220R ASE	CCTCTTCTTATCTAAGCAT CT CATTGCATACATTTTTCC
GRK 3 K220R SE	GGAAAAATGTATGCAATG AGAT GCTTAGATAAGAAGAGG
GRK 2 R106A ASE	CGAAGATCT CGCG GCTGCGGGCC
GRK 2 R106A SE	GGCCCGCAGC GCGG GAGATCTTCG
GRK 3 R106A ASE	GGCATCATAAATTTGT GCA CTTCTGCAAAGGCGG
GRK 3 R106A SE	CCGCCTTTGCAGAAGT GCACA AATTTATGATGCC
GRK 2 R587Q ASE	CCCCGCCACTCGAG TTGG TGGGG
GRK 2 R587Q SE	CCCCAAC CAACT CGAGTGGCGGGG
GRK 3 R587Q ASE	CCTCTCCATTCAAG TTG ATTTGGAAAGAGG
GRK 3 R587Q SE	CCTCTTTCAAAT CAACT TGAATGGAGAGG
GRK 4 K216-217M ASE	ATTCTTTTTTTTTGTAG CATCAT GCCAGGCATACATTTTTCC
GRK 4 K216-217M SE	GGAAAAATGTATGCCTGC ATGATG CTACAAAAAAAAGAAT
GRK 5 K215R ASE	CTCTTCTTCTCCAAGC CGCT GCAGGCATAC
GRK 5 K215R SE	GTATGCCTGC AGGCG CTTGAGAAGAAGAG
GRK 6 K215-216M ASE	GCTTTTTCTCTAG CATCAT GCCAGGCATACATC
GRK 6 K215-216M SE	GATGTATGCCTGC ATGATG CTAGAGAAAAGC

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen - Thermo Fisher Scientific (Dreieich) oder der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert. Die eingefügten Punktmutationen sind fett gedruckt.

E.1.4 Plasmide

E.1.4.1 pcDNA5/FRT/TO

CMV-Promoter: Basen 232-958

TATA Box: Basen 804-810

Tetrazyklin Operator (2X TetO₂) Sequenzen:
Basen 820-859

CMV forward Priming-Site: Basen 769-789

Multiple Cloning-Site: Basen 968-1077

BGH reverse Priming-Site: Basen 1089-1106

BGH Polyadenylations-Signal: Basen 1095-1319

FRT-Site: Basen 1603-1650

Hygromycin Resistenzgen (kein ATG): Basen 1658-2678

SV40 early Polyadenylations-Signal: Basen 2810-2940

pUC-Ursprung: Basen 3323-3996 (komplementärer Strang)

bla-Promoter: Basen 5002-5100 (komplementärer Strang)

Ampicillin (*bla*) Resistenzgen: Basen 4141-5001

(komplementärer Strang)

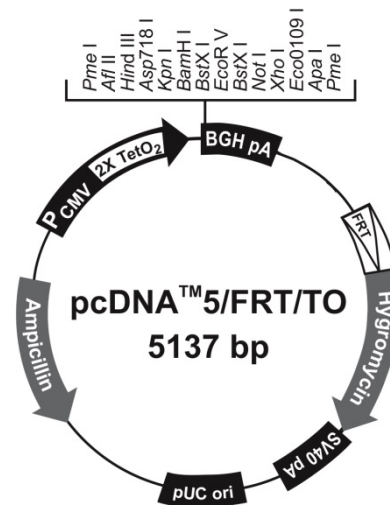


Abbildung 9: Plasmidkarte des pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

Das Plasmid dient zur stabilen Expression eines Zielgens in Zellen des Flp-In T-REx-Systems, wie den in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen. Der CMV/TetO₂ Promotor stellt eine hohe und Tetrazyklin-induzierbare Expression des Zielgens sicher. Durch die enthaltene FRT-Sequenz (*FLP recombination target*) ist eine gezielte Integration des Plasmids in entsprechende Flp-In Säugetierzellen mittels DNA-Rekombination möglich. Benötigt wird dafür zusätzlich die Flp-Rekombinase pOG44 (siehe unten).

E.1.4.2 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 (komplementärer Strang)

bla-Promoter: Basen 4999-5097 (komplementärer Strang)

Ampicillin (*bla*) Resistenzgen: Basen 4138-4998

(komplementärer Strang)

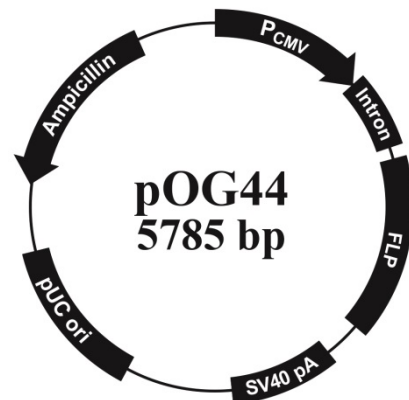


Abbildung 10: Plasmidkarte des pOG44 (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

Dieses Plasmid enthält das Flp-Rekombinase Gen. Die Flp-Rekombinase detektiert FRT-Sequenzen und vermittelt zwischen diesen Stellen die DNA-Rekombination.

E.1.5 Bakterienstämme

E.1.5.1 JM109 Competent Cells (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

Genotyp: $e14^-(McrA^-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K^- m_K^+) supE44 relA1 \Delta(lac-proAB)$
[F' *traD36 proAB lacI^qZΔM15*]

E.1.5.2 XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

Genotyp: Tet^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96$
relA1 lac Hte [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r*]

E.1.6 Säugetierzellen

Flp-In T-REx-293 Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zelltyp: HEK (*human embryonic kidney*) Zellen

Katalogisiert: European Collection of Cell Culture

Zytogenese: 2n = 46

Die Zelllinie enthält eine stabil integrierte FRT-Sequenz, die an einem transkriptionell aktiven Genlocus platziert ist. Alle Gensequenzen, die mittels pcDNA5/FRT/TO-Vektor- und pOG44 eingebracht werden, werden an der gleichen Stelle ins Genom der Zelle integriert und lassen sich so gut miteinander vergleichen. Zudem exprimieren die Zellen stabil das Tet-Repressorprotein.

E.1.7 Proteine

Protein	Hersteller
Bradykinin B1 Rezeptor	cDNA Resource Center, Bloomsberg
Bradykinin B2 Rezeptor	cDNA Resource Center, Bloomsberg
eYFP	Clontech, Takara Bio, Mountain View
GRK2-6	cDNA Resource Center, Bloomsberg
RLucII	Promega, Fitchburg
β -Arrestin1	cDNA Resource Center, Bloomsberg
β -Arrestin2	cDNA Resource Center, Bloomsberg

E.1.8 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-GRK 2 rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GRK 3 rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GRK 4 rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GRK 5 rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GRK 6 rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-rabbit-HRP	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-GAPDH rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-HA rabbit polyclonal FITC-conjugate	Bethyl, Montgomery

E.1.9 Restriktionsendonuklease

Bezeichnung	Hersteller
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Not</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Xho</i> I	New England Biolabs, Frankfurt

E.1.10 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
5-fach Ladungspuffer/ 5-fach Laemmli-Puffer	50% Glycerol, 25% DTT, 10% SDS, 0.625 M Tris/HCl, 1.25% Bromophenol blau, pH 6.8
Trenngel-Puffer	1.5 M Tris-base, pH 8.8
Sammelgel-Puffer	50 mM Tris-base, pH 6.8
10-fach Tris-Glycin-Puffer	0.25 M Tris-base, 1.92 M Glycin, 1% SDS, pH 8.3
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Acetat, 2 mM EDTA, pH 8.0
TBST-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween® 20, pH 7.5
Transfer-Puffer	NuPAGE (Thermo Fisher Scientific) TransferBuffer (20x) 25 mM Biscine, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, Methanol (1:100), pH 7.2
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X-100, 0.5% Natriumdeoxycholat, 0.1% SDS, pH 8.0
Blockierungspuffer	5% Milch in TBST-Puffer

E.1.11 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
SOC Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefextrakt, 10 mM MgCl ₂ , 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, 15 g/l Agar

Alle weiteren Reagenzien können bei den Firmen Merck, Roth oder Sigma-Aldrich erworben werden.

E.1.12 Computerprogramme

- Adobe Photoshop CS 6 (Version 13.0)
- BMG OPTIMA 2.20R2
- EndNote X8.2
- FlowJo Version 10
- Graph Pad Prism 5.04
- Image-Pro Plus 5.0
- MacVector Version 13.06
- MARS Data Analysis Software Version 3.01 R2
- Microsoft Office 2013

E.2 Methoden

E.2.1 Molekularbiologische Methoden

E.2.1.1 DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation und Einbringung von Punktmutationen in die DNA von GRKs wurde die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) verwendet. Die Primer (Oligonucleotide) wurden unter Beachtung folgender Regeln erzeugt:

Die Primerlänge soll zwischen 20 und 30 Nucleotiden betragen, um eine ausreichende Spezifität sicher zu stellen. Für die geschätzte Schmelztemperatur T_m soll gelten:

$$T_m [^\circ\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) > 50^\circ\text{C}$$

Dabei bezeichnet (A + T) die Summe der Basen Adenin (A) und Thymin (T) und (G + C) die Summe der Guanin- (G) und Cytosinnukleotide (C). Der Gehalt an Guanin und Cytosin soll summiert zwischen 40% und 60% erreichen. Punktmutationen wurden so eingefügt, dass die Fehlpaarungsstelle in der Primermitte lokalisiert ist. Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen oder der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und die entsprechenden Sequenzen sind unter E.1.3 aufgeführt.

Für die Elongation wurde die thermostabile *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* der Firma New England BioLabs verwendet. Diese DNA Polymerase zeichnet sich durch eine DNA Amplifikation mit geringer Fehlerquote aus und ist damit auch für lange und komplexe Amplikons unabhängig vom GC-Gehalt geeignet. Der Einsatz von *Q5 High GC Enhancer* sollte die Ergebnisse bei GC-reichen DNA-Fragmenten ($\geq 65\%$ GC) zusätzlich verbessern. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 1 gezeigt.

1.	93°C	3 min	Initiale Denaturierung	} Zyklus 35x
2.	93°C	30 s	Denaturierung	
3.	52°C	30 s	Primerhybridisierung	
4.	72°C	20 s/kb	Elongation	
5.	72°C	5 min	Finale Elongation	

Tabelle 1: PCR-Programm

E.2.1.2 DNA-Punktmutation mittels ortsspezifischer Mutagenese

Um ins Genom der GRK2-6 gezielt Punktmutationen einzubringen, wurde das Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese genutzt (Abbildung 11). Alle GRKs waren bereits in das pcDNA5/FRT/TO-Plasmid integriert. Als Senseprimer wurde CMV, als Antisenseprimer BGH genutzt, da diese die GRK-DNA auf dem pcDNA5/FRT/TO Plasmid flankieren (Abbildung 9). Für die Einbringung der Punktmutation wurde ein Sense ($\text{SENSE}_{\text{MUT}}$) und Antisense ($\text{ANTISENSE}_{\text{MUT}}$) Primerpaar erzeugt, das die gewünschte Mutation enthielt (siehe E.1.4).

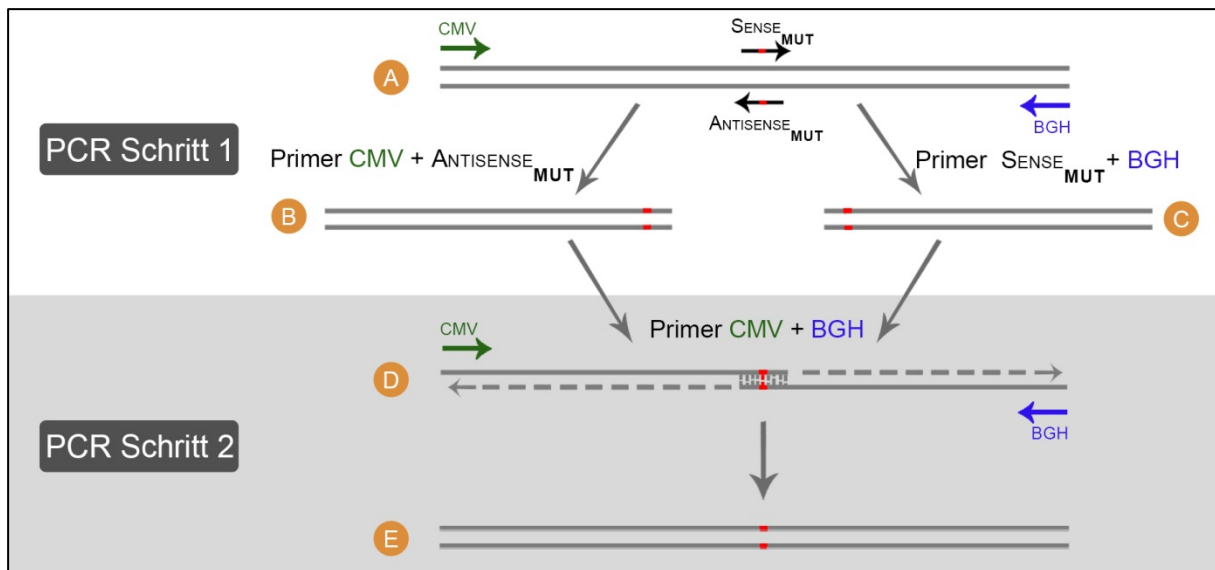


Abbildung 11: Schematische Darstellung der ortsspezifischen Mutagenese (adaptiert nach Heckman et al. (2007))

Zum Einbringen einer Punktmutation werden Sense- (SENSE_{MUT}) und Antisense- (ANTISENSE_{MUT}) Primer mit der gewünschten Mutation erstellt. Im PCR Schritt 1 wird die Ursprungs-DNA (A) mittels Primerpaar Sense CMV + ANTISENSE_{MUT} und SENSE_{MUT} + Antisense BGH elongiert. Dabei entstehen die beiden DNA-Fragmente B und C, die beide bereits die Punktmutation enthalten. PCR Schritt 2 beruht darauf, dass DNA-Fragment B und C eine Sequenzüberschneidung (D) aufweisen. Werden B und C als Template der PCR samt Senseprimer CMV und Antisenseprimer BGH eingesetzt, so entsteht durch Amplifikation die vollständige Ursprungs-DNA, allerdings mit der Punktmutation an der gewünschten Stelle (E).

Als Vorlage (*Template*) für die PCR standen in der GRK2-Familie, nebst der codierenden GRK2 DNA, bereits drei punktmutierte Gensequenzen dieser GRK zur Verfügung, gleiches galt auch für die GRK3 DNA. Auf der Ebene der Aminosäuren war mutationsbedingt daher, nebst dem jeweiligen Wildtypen, auch eine R106A, K220R und R587Q GRK-Mutante verfügbar. Ziel der ortsspezifischen Mutagenese war die Einbringung jeweils einer weiteren Mutation, so dass sich die Doppelmutanten R106A-K220R und K220R-R587Q für GRK2 und GRK3 ergaben. Bei der GRK4-Familie lag für alle Vertreter (GRK4-6) ein Plasmid mit der codierenden Wildtyp DNA vor. Hier sollten Punktmutationen eingefügt werden, um auf Ebene der Aminosäuren die GRK4 K216-217M, GRK5 K215R und GRK6 K215-216M zu erzeugen.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch im linken Bild die beiden PCR Produkte des 1. Schritts. Erzeugt wurden sie aus dem DNA-Template GRK2 R106A und den beiden Primerpaaren Sense CMV + ANTISENSE_{K220R} und SENSE_{K220R} + Antisense BGH. Wobei sowohl SENSE_{K220R}, als auch ANTISENSE_{K220R} die Punktmutation an der gleichen Stelle enthielten, so dass auf Aminosäurenebene statt Lysin (K) an der Stelle 220 Arginin (R) eingebaut wurde. Nutzt man beide PCR-Produkte aus Schritt 1 äquimolar als DNA-Template für die PCR des 2. Schritts, so entsteht die Doppelmutante GRK2 R106A-K220R, wie in Abbildung 12 im rechten Bild gezeigt.

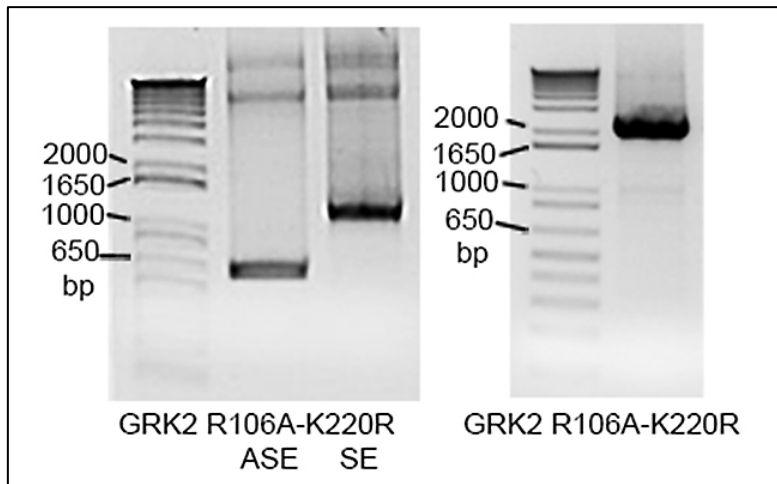


Abbildung 12: Ortsspezifische Mutagenese am Beispiel der GRK2 R106A-K220R

Das linke Bild zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der beiden PCR-Produkte des 1. Schritts nach der Masse. Als DNA-Template wurde GRK2 R106A eingesetzt. Das ASE-Amplifikat wurde mittels Sense CMV + ANTISENSE_{K220R} Primerpaar erzeugt. Das SE-Amplifikat ist Ergebnis der PCR mit SENSE_{K220R} + Antisense BGH Primer. Die rechte Aufnahme zeigt das Resultat des 2. PCR Schritts, die GRK2 R106A samt K220R-Punktmutation, so dass GRK2 R106A-K220R entstanden ist. (*bp*: Basenpaare)

Die eingesetzten Ansätze für PCR-Schritt 1 können Tabelle 2, die für PCR Schritt 2 Tabelle 3 entnommen werden.

Komponenten	Stock	Volumen
DNA Template	500 ng/ μ l	0,2 μ l
Q5 Reaktionspuffer	5x	6 μ l
dNTP	1 mM	2,4 μ l
Primer CMV bzw. BGH	100 pM	0,6 μ l
Primer SENSE _{MUT} bzw. ANTISENSE _{MUT}	100 pM	0,6 μ l
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase		0,6 μ l
Q5 High GC Enhancer	5x	6 μ l
Aqua steril, destilliert		13,6 μ l
<i>Reaktionsvolumen</i>		<i>30 μl</i>

Tabelle 2: Bestandteile des PCR Schritts 1

Komponenten	Stock	Volumen
PCR Produkt #1	25 ng/ μ l	2 μ l
PCR Produkt #2	25 ng/ μ l	2 μ l
Q5 Reaktionspuffer	5x	6 μ l
dNTP	1 mM	2,4 μ l
Primer CMV	100 pM	0,6 μ l
Primer BGH	100 pM	0,6 μ l
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase		0,6 μ l
Q5 High GC Enhancer	5x	6 μ l
Aqua steril, destilliert		9,8 μ l
<i>Reaktionsvolumen</i>		<i>30 μl</i>

Tabelle 3: Bestandteile des PCR Schritts 2

E.2.1.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in einprozentigem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Durch Suspension von 0,4 g Agarose in 40 ml TAE-Puffer und anschließendem Erhitzen bei ca. 600 Watt im Mikrowellenofen wurde das Gel hergestellt. Nach kurzem Abkühlen wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml zugesetzt, um unter UV-Lichtbestrahlung die aufgetrennten DNA-Fragmente darstellen zu können. Die DNA-Proben wurden mit dem Ladungspuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und in die Ladetaschen des ausgehärteten Gels gegeben. Zusätzlich wurde ein DNA-Standard (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen) als Referenz für die Größe der DNA-Fragmente auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung mittels Elektrophorese erfolgte im TAE-Pufferbad bei 5-7 V/cm für ca. 25 Minuten. Unter UV-Licht (302 nm) konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente durch Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden (Abbildung 12). Die Exposition mit UV-Licht wurde so kurz wie möglich gehalten, um strahlungsbedingte DNA-Schäden zu vermeiden.

E.2.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Unter UV-Licht-Kontrolle wurde das gewünschte DNA-Fragment (UV-Bande) nach erfolgter elektrophoretischer Separation mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extractions-Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Prozessierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Dazu wurde die ausgeschnittene Gelbande mit dreifacher Menge des Solubilisierungspuffers versetzt, bei 50°C unter Durchmischung für 5 Minuten inkubiert und dabei im Puffer gelöst. Nach Überführen in eine Silikamembran-Säule, wurde die Säule für 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert und das Säulenfiltrat verworfen, das DNA-Fragment blieb durch Adsorption in der Säule zurück. Die Säule wurde anschließend nochmals mit Solubilisierungspuffer und sodann mit einem ethanolhaltigen

Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 10 µl sterilem, destilliertem Wasser (pH 8.5) wurde abschließend die DNA aus der Säule eluiert. Das Elutionsprodukt wurde bei -20°C gelagert.

E.2.1.5 Photometrische DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentration und Reinheit des Elutionsprodukts wurden mittels NanoDrop 1000 Spektralphotometer der Firma Peqlab photometrisch bestimmt. Basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz wurde dazu bei 260 nm die Absorption (A) der Nucleinsäure bei Durchtritt durch die 1 µl-Probe bestimmt und daraus die DNA-Konzentration errechnet. Der Reinheitsgrad wurde sodann durch die Ermittlung der Absorptionsratio (AR) überprüft. Hierzu wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen, welche Kontamination beispielsweise durch Proteine detektiert.

$$AR = \frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$$

Sofern gilt $1,8 \leq AR \leq 2,0$ ist eine Proteinkontamination der DNA-Probe unwahrscheinlich.

E.2.1.6 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen verfügen über die Fähigkeit bestimmte DNA-Sequenzen zu erkennen und die DNA dort zu schneiden (Tabelle 4). Durch geeignete Auswahl dieser Enzyme können DNA-Fragmente gezielt ausgeschnitten werden.

Bezeichnung	Schnittstellen (5'→3')	Herkunft
<i>HindIII</i>	A↓AGCT↑T	Haemophilus influenzae
<i>BamHI</i>	G↓GATC↑C	Bacillus amyloliquefaciens
<i>NotI</i>	GC↓GGCC↑GC	Nocardia otitidis-caviarum
<i>XhoI</i>	C↓TCGA↑G	Xanthomonas holcicola

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Als Trägerplasmid (Vektor) weist pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) zahlreiche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen im Bereich der sogenannten *Multiplen Cloning-Site* auf (Abbildung 9). Somit kann das Plasmid spezifisch geschnitten und ein mit entsprechenden Schnittstellen versehenes DNA-Fragment (*Insert*) eingefügt, also ligiert werden. Praktisch erfolgte die Restriktion des Vektorsubstrats, indem die Bestandteile des Restriktionsansatzes gemäß Tabelle 5 unter Eiskühlung zusammengefügt und anschließend bei 37°C für eine Stunde inkubiert wurden. Das so geschnittene Trägerplasmid ist anschließend bereit für die Ligation, also das Verbinden der geschnittenen DNA-Fragmente. Die für die Restriktion verwendeten Endonukleasen vom Typ II schneiden die DNA so, dass *Sticky Ends* entstehen, also Schnittländer bei denen ein Einzelstrang einige Basen über den anderen hinausragt. Dadurch kann sich ein komplementär geschnittenes DNA-Fragment, beispielsweise die DNA der GRKs, leicht anheften, was die Ligation begünstigt.

Komponenten	Stock	Volumen/Menge
Substrat		1 µg
Restriktionsendonuklease 1	20 U ¹ /µl	1 µl
Restriktionsendonuklease 2	20 U ¹ /µl	1 µl
<i>CutSmart</i> Puffer	10x	2 µl
Aqua steril, destilliert		auf 20 µl ergänzen
<i>Reaktionsvolumen</i>		20 µl

Tabelle 5: Bestandteile des Restriktionsansatzes

¹Die Restriktionsendonukleasenmenge um 1 µg λ-Phagen-DNA (48kb) in 50 µl Gesamtvolumen bei 37°C in 1 Stunde komplett zu verdauen, entspricht 1 Unit.

Um *Insert* und geschnittenen Vektor zu ligieren wurde, gemäß dem Herstellerprotokoll, 10-50 ng Vektor-DNA eingesetzt und ein molarer Überschuss für die eingesetzte Menge an *Insert* wie folgt berechnet:

$$m_{Insert} = \frac{3 \times m_{Vektor} \times kb_{Insert}}{kb_{Vektor}}$$

Die berechneten Mengen an *Insert* und Vektor wurden unter Raumtemperatur zusammengefügt und unter Eiskühlung bei 4°C mit 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) und 1 µl 10-fach T4 Ligasepuffer versetzt. Der Reaktionsansatz wurde sodann mit destilliertem, sterilem Wasser auf das Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei 16°C inkubiert. Als Erfolgskontrolle kann das zuvor ligierte *Insert* erneut aus dem Vektor herausgeschnitten und mittels gelelektrophoretischer Auftrennung visualisiert werden (Abbildung 13).

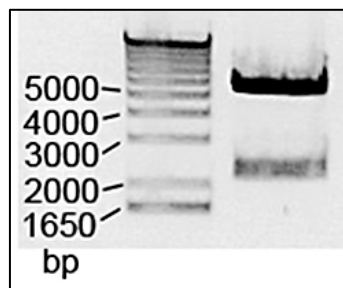


Abbildung 13: Restriktionsresultat am Beispiel der GRK2 R106A-K220R

Der pcDNA5/FRT/TO Vektor wurde mit dem GRK2 R106A-K220R *Insert* ligiert. Um die korrekte Ligatur zu prüfen, wurde die DNA mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BamHI* geschnitten. In der gelelektrophoretischen Auftrennung stellt die obere Bande mit 5137 Basenpaaren (bp) den Vektor pcDNA5/FRT/TO dar, die untere Bande repräsentiert das *Insert* GRK2 R106A-K220R (2070bp).

E.2.1.7 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli*-Stämme wurden mittels Hitzeschock-Methode transformiert. Es wurden hierfür entweder 5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1 µg einer Plasmidpräparation unter Eiskühlung mit 50 µl *E. coli*-Bakterien vermischt. Als Bakterienstämme kamen entweder *XL10-Gold Ultracompetent Cells* oder *JM109 Competent Cells* der Firma Agilent Technologies zum Einsatz. Erstere sind besonders geeignet für die Transformation großer oder ligierter Plasmide. Einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte die Transformation mittels Erhitzen auf 42°C für 30 Sekunden sowie eine erneute Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Anschließend wurden die Bakterien mit 110 µl SOC-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln im Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert. Das ganze Volumen wurde sodann mittels Drigalskispatel auf eine ampicillinhaltige (50 µg/ml Ampicillin) LB (*Lysogeny Broth*) Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

E.2.1.8 Kultivierung von transformierten *E. coli*-Stämmen

E. coli Bakterien wurden entweder in LB Medium oder auf LB Agarplatten (LB Medium + 15 g/l Agar) kultiviert. Zur Sterilisierung wurde das LB Medium für 20 Minuten mit einem Druck von $1,2 \times 10^5$ Pa und einer Temperatur von 121°C im Autoklaven inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde dem LB Medium Ampicillin in einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Mit Hilfe des Antibiotikums konnten die erfolgreich transformierten *E. coli* Bakterien selektioniert werden, da alle eingebrachten Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten.

E.2.1.9 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien

Zur Extraktion der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* Bakterien wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen, gemäß den Herstellerangaben, genutzt. Das Kit setzt die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse der Bakterien frei. Proteine und genomische Bakterien-DNA werden nach dem Lyseprozess ausgefällt und können abzentrifugiert werden. Die Plasmid-DNA wird anschließend, vergleichbar der Aufreinigung aus dem Agarosegel (E.2.1.4), mittels Silikamembran-Säule isoliert.

Als Substrat für das Miniprep Kit wurden erfolgreich transformierte *E. coli* Kolonien für 12 Stunden bei 37°C und 240 U/min in 6 ml ampicillinhaltigem (50 µg/ml) LB Medium kultiviert. Bei jeder Bakterienteilung wurde dabei auch die zuvor transformierte Plasmid-DNA verdoppelt. Nach dem Zentrifugieren konnte das entstandene Bakterienpellet mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* behandelt werden. Hierzu wurde das Pellet in Anwesenheit von RNase A resuspendiert, unter alkalischen Bedingungen (NaOH/SDS) lysiert, der Überstand neutralisiert und der Bakteriendebris mittels Zentrifugation entfernt. Als finaler Schritt wurde die Plasmid-DNA durch Prozessierung in einer Silikamembran-Säule aus dem Überstand isoliert (wie in E.2.1.4) und in 50 µl sterilem, destilliertem Wasser (pH 8.5) eluiert.

E.2.1.10 DNA Sequenzierung

Die DNA aller angefertigten GRK-Mutanten wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) mittels fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden vollständig sequenziert (Sanger et al., 1977). Zur Überprüfung der DNA- und Aminosäure-Sequenzen wurde das Programm MacVector (Version 13.06) der Firma MacVector, Inc. und das Onlinetool BLAST des *National Center for Biotechnology Information* verwendet. Abbildung 14 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Aminosäuresequenz-Analyse einer GRK Mutante.

GRK2 R106A-K220R	1	MADLEAVLADVSYLMAMEKSKATPAARASKKILLPEPSIRSVMQKYLEDRGEVTFEKIFS	60
GRK2	1	MADLEAVLADVSYLMAMEKSKATPAARASKKILLPEPSIRSVMQKYLEDRGEVTFEKIFS	60
GRK2 R106A-K220R	61	QKLGYLFRDFCLNHLEEARPLVEFYEEIKKYEKLETEEERVARSAEIFDSYMKELLAC	120
GRK2	61	QKLGYLFRDFCLNHLEEARPLVEFYEEIKKYEKLETEEERVARSAEIFDSYMKELLAC	120
GRK2 R106A-K220R	121	SHPFKSATEHVQGHGKQVPPDLFQPYIEEICQNLRGDVFQKFIESDKFTRFCQWKNV	180
GRK2	121	SHPFKSATEHVQGHGKQVPPDLFQPYIEEICQNLRGDVFQKFIESDKFTRFCQWKNV	180
GRK2 R106A-K220R	181	ELNIHLLTMNDFSVHRIIGRGGFGEVYGCRKADTGKMYAMRCLDKKRIKMKQGETLALNER	240
GRK2	181	ELNIHLLTMNDFSVHRIIGRGGFGEVYGCRKADTGKMYAMRCLDKKRIKMKQGETLALNER	240
GRK2 R106A-K220R	241	IMLSLVSTGDCPFIV	255
GRK2	241	IMLSLVSTGDCPFIV	255
			Identities
			253/255(99%)

Abbildung 14: Abgleich der Aminosäuresequenz am Beispiel der GRK2 R106A-K220R mit dem GRK2 Wildtyp

Nach Übersetzen des GRK2 R106A-K220R DNA-Sequenzierungsprodukts in die korrespondierende Aminosäuresequenz, wurde diese mit der auf UniProt.org verfügbaren Wildtyp GRK2 Aminosäuresequenz (P25098-1) mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) verglichen. Die beiden Punktmutationen sind farblich hervorgehoben.

Abbildung angepasst auf Basis von BLAST® des *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*.

E.2.2 Zellbiologische Methoden

E.2.2.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Für diese Arbeit wurde eine Zelllinie bestehend aus humanen embryonalen Nierenzellen, die sogenannten HEK-293-Zellen, verwendet. Diese Zelllinie wurde bei 37°C und 5% CO₂ als semi-adhärenter Monolayer kultiviert. Als Flüssignährmedium wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) eingesetzt, das ergänzend mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und kontaminationsprophylaktisch mit jeweils 1% Penicillin (P) und Streptomycin (S) versetzt wurde. HEK-293-Zellen wurden im Allgemeinen in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, regelmäßig mit den Antibiotika Blastocidin (250 µg/ml) und sofern sie stabil transfiziert waren zusätzlich mit Hygromycin B (250 µg/ml) selektioniert. Die Verdopplungszeit der HEK-293-Zellen beträgt etwa 18-24 Stunden. Zwei bis dreimal pro Woche erfolgte daher die Subkultivierung. Hierzu wurde zunächst das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS (ohne Calcium/Magnesium) gewaschen und sodann mit

500 µl EDTA-Trypsin versetzt, um die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen in Wachstumsmedium (DMEM, 10% FCS, 1% P/S) resuspendiert und ausgesät. Um auszuschließen, dass Trypsin aus fötalem Kälberserum Bradykinin freisetzt und die Experimente damit beeinflusst, wurden die Zellen für Experimente gesondert behandelt. Hierzu wurde zu Beginn der Arbeit das Trypsin in einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt entfernt, im weiteren Verlauf der Experimente wurde gänzlich auf den Einsatz von Trypsin zur Zellablösung verzichtet und stattdessen ca. 4°C kaltes PBS (ohne Calcium/Magnesium) + 0,5 mM EDTA verwendet. Die Funktionalität und die experimentellen Ergebnisse waren vergleichbar.

E.2.2.2 Zelladhärenzoptimierung mittels Poly-D-Lysin Hydrobromid

Die semi-adhärenten Eigenschaften der HEK-293-Zellen ermöglichen eine trypsinfreie Ablösung von der Zellkulturflasche. Im experimentellen Ablauf war es jedoch teilweise nötig Zellkavitäten mehrmals zu waschen. Um sicherzustellen, dass die Zellen sich dabei nicht ablösen, wird regulär eine Beschichtung der Kavitäten vor dem Aussäen der HEK-293-Zellen, das sogenannte *Precoating*, mittels 0,01% Poly-D-Lysin Hydrobromid (M>300000) für 2 Stunden durchgeführt. Dadurch kann eine optimierte Zelladhärenz erreicht werden. Im Verlauf der Arbeit konnten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine direkte Poly-D-Lysin Hydrobromid Zugabe zum Wachstumsmedium in einer Endkonzentration von 2µg/ml bei der Resuspension der Zellen einen vergleichbaren oder sogar besseren Effekt auf die Zelladhärenz der HEK-293-Zellen hatte. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigen dies (A. Faußner, M. Deininger, Manuskript zur Publikation in Vorbereitung). Funktionalität und experimentelle Ergebnisse beider Methoden waren in der vorliegenden Arbeit äquivalent.

E.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von HEK-293-Zellen

Zum Einfrieren der HEK-293-Zellen wurden diese zunächst, wie in E.2.2.1 beschrieben, von der Zellkulturflasche abgelöst, inkubiert, mittels Wachstumsmedium (DMEM, 10% FCS, 1% P/S) resuspendiert und anschließend 5 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eisgekühltem Wachstumsmedium + 7,5% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und zu je 1ml in die Einfrierröhrchen überführt. In Isopropanolboxen wurden die Zellen langsam auf -80°C heruntergekühlt und sodann dauerhaft bei unter -150°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen bei Raumtemperatur inkubiert, die flüssige Zellsuspension in 5 ml Wachstumsmedium gegeben und bei 700 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Größtenteils von DMSO befreit, wurde das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Wachstumsmedium nochmals gewechselt.

E.2.2.4 Flp-In T-REx-Expressionssystem

Das Flp-In T-REx-System der Firma Invitrogen ermöglicht die stabile Insertion eines Zielgens, dem sogenannten GOI (*gene of interest*), an einer vordefinierten Stelle im Genom (Abbildung 15). Als Ausgangszelllinie wurden HEK-293-Zellen genutzt, welche das Flp-In T-REx-System enthalten. Als GOI wurde die Gensequenz der zu untersuchenden GRK-Mutante in das pcDNA5/FRT/TO Trägerplasmid kloniert. Sowohl die HEK-293-Flp-In T-REx-Ausgangszelllinie, nachfolgend als HEK-293-Zelllinie bezeichnet, als auch das pcDNA5/FRT/TO Trägerplasmid enthalten eine FRT-Sequenz (*Flp Recombination Target*), die durch die Flp-Rekombinase erkannt wird. Diese Flp-Rekombinase wird vom pOG44 Plasmid exprimiert, das ebenfalls Bestandteil des Flp-In T-REx-Systems ist.

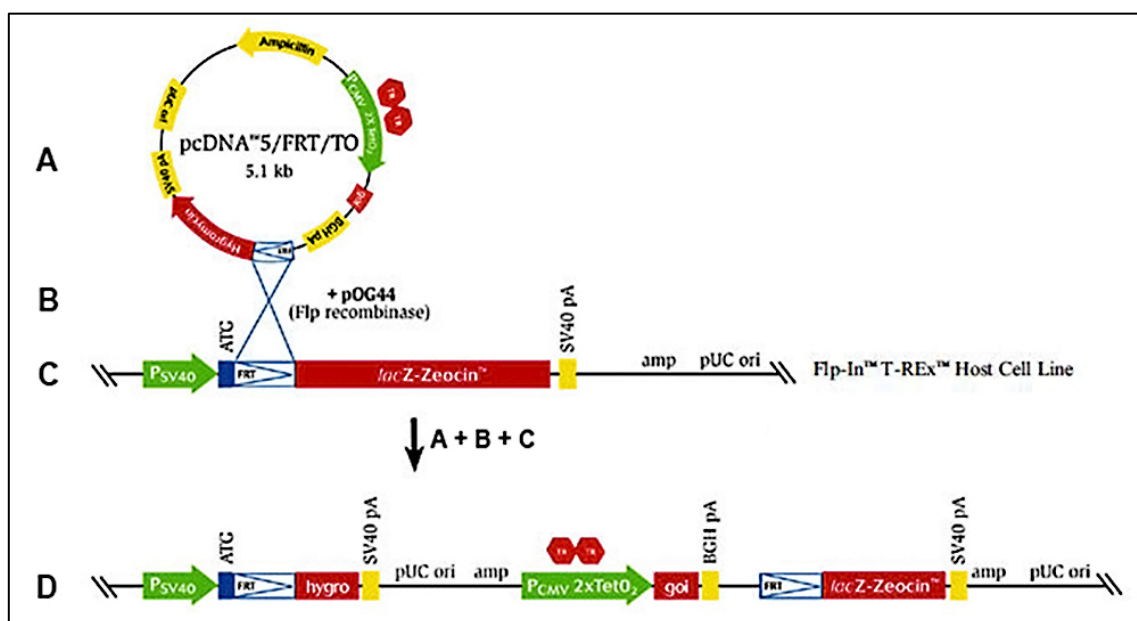


Abbildung 15: Schematische Darstellung der stabilen Expression mittels Flp-In T-REx-System (modifiziert nach Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

Das Flp-In T-REx-System ermöglicht die stabile Expression des Zielgens in HEK-293-Zellen. Das pcDNA5/FRT/TO Plasmid dient dabei unter anderem als Träger für das Zielgen (*GOI: gene of interest*), der pOG44 Vektor führt zur Expression der Flp-Rekombinase. Sowohl die HEK-293-Zelllinie, als auch das pcDNA5/FRT/TO Plasmid verfügen über eine FRT-Sequenz, die von der Flp-Rekombinase erkannt wird. Diese induziert sodann die homologe Rekombination zwischen den beiden FRT-Sequenzträgern, wodurch das Zielgen stabil in die HEK-293-Zellen integriert wird.

Werden nun das pcDNA5/FRT/TO Trägerplasmid (Abbildung 15, A) und das pOG44 Plasmid (transient, Abbildung 15, B) in eine HEK-293-Zelle (Abbildung 15, C) transfiziert, so detektiert die transient exprimierte Flp-Rekombinase die FRT-Sequenzen sowohl im Genom der Zelle als auch auf dem Trägerplasmid und induziert eine homologe Rekombination. Durch den DNA-Doppelstrangaustausch wird die Geninformation des pcDNA5/FRT/TO samt GRK-Mutante stabil ins Genom der HEK-293-Zelle integriert (Abbildung 15, D). Dies erfolgt somit isogen, also immer an der gleichen Stelle im Genom der HEK-293-Zelllinie, wodurch sich die Effekte der verschiedenen GRK-Mutanten gut vergleichen lassen.

Da das pcDNA5/FRT/TO Trägerplasmid, nebst dem Zielgen (GOI), auch eine Hygromycin-Resistenz aufweist, kann eine Selektion der transfizierten Zellen erfolgen. Die Hygromycin-Resistenz kann allerdings nur transkribiert werden, wenn die Integration des Trägerplasmids an der Flp-In Stelle im Genom erfolgt ist. Dies wird dadurch sichergestellt, dass SV40-Promotor und ATG-Startcodon für die Antibiotikaresistenz nicht auf dem Trägerplasmid, sondern stabil in der HEK-293-Zelle in Verbindung mit der FRT-Stelle exprimiert werden.

Besonderheit des Flp-In T-REx-Systems ist neben der isogenen Integration auch die Induzierbarkeit des Zielgens (GOI). Hierzu enthält das pcDNA5/FRT/TO Trägerplasmid zwei Tet-Operator ($TetO_2$) Sequenzen im hybriden CMV-Promotor des Zielgens. HEK-293-Zellen exprimieren konstitutiv den Tet-Repressor ($tetR$), welcher durch Homodimerbildung und Bindung an $TetO_2$ die Transkription des Zielgens blockiert. Zugegebenes Tetrazyklin (+Tet, 5 $\mu\text{g/ml}$) bindet mit hoher Affinität den Tet-Repressor. Der Tet-Repressor-Tetrazyklin-Komplex kann $TetO_2$ nicht mehr binden und die Transkription des Zielgens kann erfolgen. Tetrazyklin führt dadurch zu einer weitgehend regulierbaren Transkription des Zielgens in den HEK-293-Zellen (Abbildung 16).

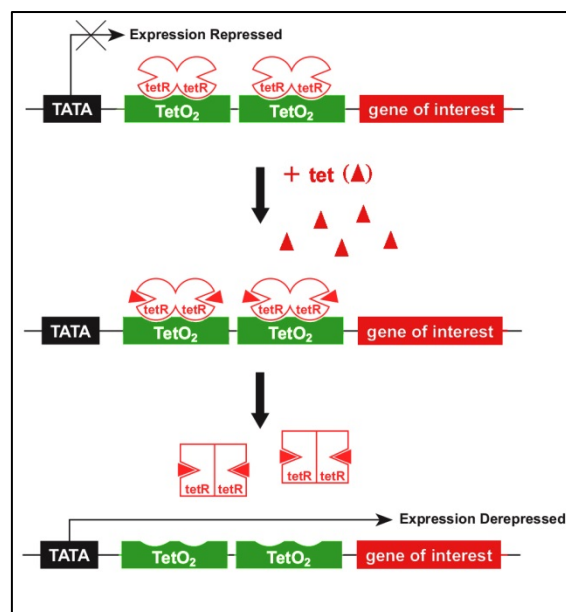


Abbildung 16: Schematische Darstellung des $TetO_2$ -Systems (modifiziert nach Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

Das $TetO_2$ -System ermöglicht eine Regulierbarkeit der Transkription des Zielgens (GOI). Durch Tetrazyklinzugabe ($tet \blacktriangle$) wird der Tetrazyklin-Repressor ($tetR$) geblockt und die Transkription des Zielgens induziert. In Abwesenheit von Tetrazyklin gewährleistet der an den Tet-Operator ($TetO_2$) gebundene $tetR$ eine Transkriptionsblockade des GOI. Der $tetR$ wird durch die HEK-293-Zelllinie konstitutiv exprimiert. Die Expression wird durch Selektion mit Blastizidin aufrechterhalten.

E.2.2.5 Transfektion der HEK-293-Zellen mittels Lipofektion

E.2.2.5.1 Stabile Transfektion

Um GRK-Mutanten dauerhaft in HEK-293-Zellen zu exprimieren, wurden diese mittels Flp-In T-REx-Expressionssystem der Firma Invitrogen stabil transfiziert. HEK-293-Zellen wurden dazu auf 12-Kavitäten-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80% transfiziert. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch neues ersetzt.

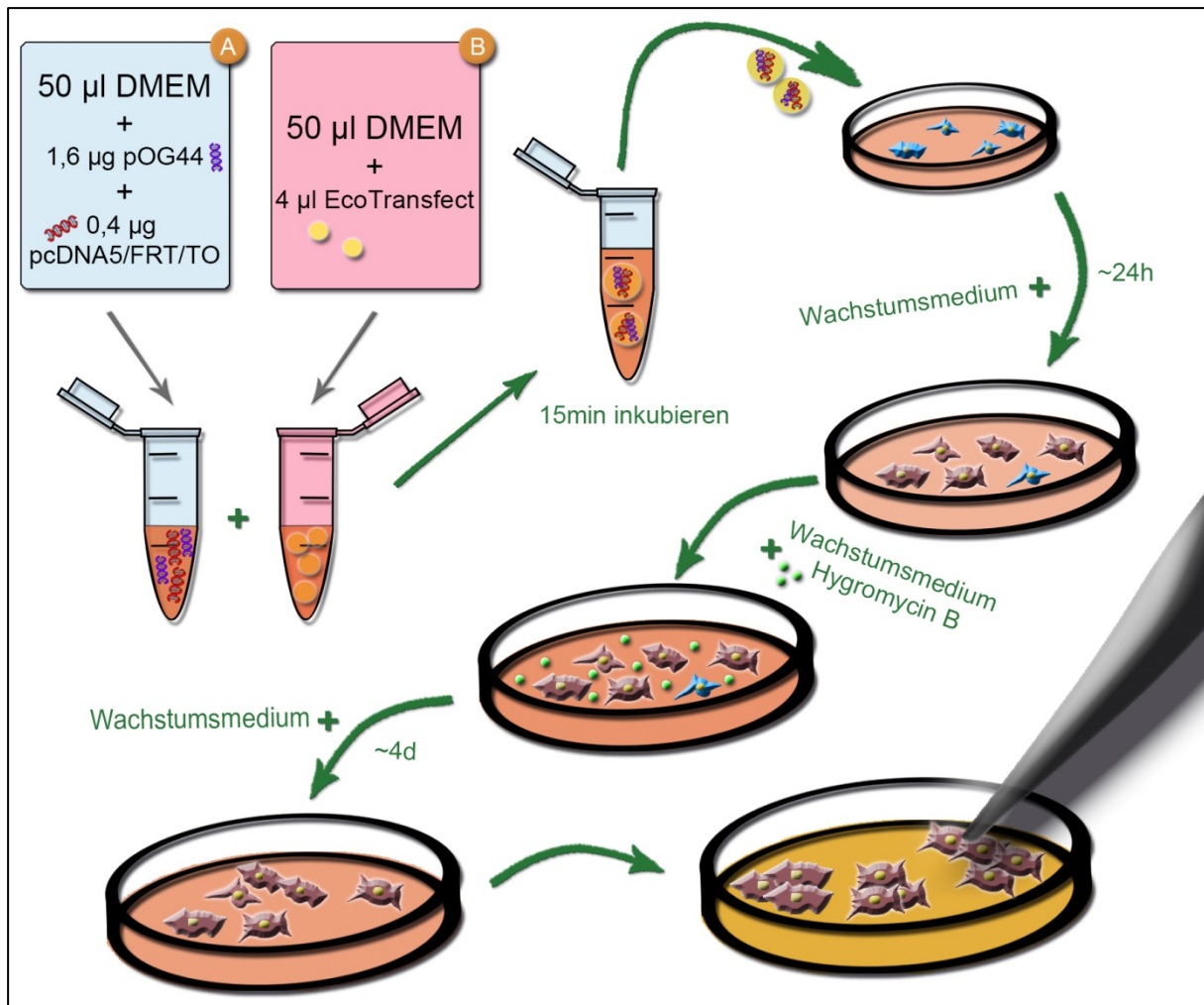


Abbildung 17: Schematische Darstellung der stabilen Transfektion

Zunächst werden die beiden Ansätze A und B getrennt hergestellt. Sodann wird Plasmidlösung A mit Lipotransfektionsansatz B für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 24 Stunden werden die Zellen auf eine Zellkulturschale (10 cm Ø) überführt. Sobald die Zellkonfluenz 80% beträgt, erfolgt ein Medienwechsel und der Zusatz des Antibiotikums Hygromycin B zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen. 4 Tage später wird Zelldebris mit dem Wachstumsmedienwechsel entfernt. Sobald sich makroskopisch Zellkolonien abgrenzen lassen, werden diese mittels Pipettenspitze zur Weiterkultur in 12-Kavitäten-Platten überführt.

Zunächst wurde der Transfektionsansatz zusammengestellt. Hierzu wurden zu 50 µl DMEM, 1,6 µg pOG44 Plasmid sowie 0,4 µg pcDNA5/FRT/TO Plasmid mit dem gewünschten Zielgen gegeben. In einem zweiten Mikroreaktionsgefäß wurden 4 µl EcoTransfect zu 50 µl

DMEM gegeben (Abbildung 17). Beide Ansätze wurden sodann vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Transfektion der vorbereiteten HEK-293-Zellen in der 12-Kavitäten-Platte, wobei obiger Transfektionsansatz vollständig für eine Kavität eingesetzt wurde. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die transfizierten HEK-293-Zellen trypsinisiert, in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und auf einer Zellkulturschale ($\varnothing = 10$ cm) ausgebracht. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 50-70% erreichten, wurde das Wachstumsmedium gewechselt und 50 μ l Hygromycin B (50 mg/ml) zur Selektion zugesetzt.

Nach circa 4 Tagen wurde das Wachstumsmedium erneut gewechselt und die Zellen ohne Hygromycin B weiter inkubiert. Ungefähr 10 Tage nach der Transfektion waren zwischen 10 und 50 Zellklone makroskopisch zu sehen. Diese konnten einfach unter Zuhilfenahme einer Pipettenspitze steril von der Zellkulturschale abgekratzt und in eine 12-Kavitäten-Platte überführt werden. Es wurden jeweils vier bis sechs Klone weiterkultiviert und die Überexpression der GRK-Mutanten mittels Western Blot nachgewiesen.

E.2.2.5.2 Transiente Transfektion

Um in HEK-293-Zellen temporär Rezeptoren oder modifizierte β -Arrestine zu exprimieren, wurden die Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transient transfiziert. Die Zellen wurden hierzu auf 6-Kavitäten-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70-90% transfiziert. Vorab wurde das verbrauchte Wachstumsmedium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz bestand aus zwei Subansätzen. In einer Kavität einer 96-Kavitätenplatte wurden 2 μ g des zu transfizierenden Plasmids mit 50 μ l DMEM vermischt, in einer zweiten Kavität wurde der Lipotransfektionsansatz vorbereitet. Dafür wurden 4 μ l EcoTransfect mit 50 μ l DMEM gemischt. Anschließend wurden beide Ansätze vereint und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die vorbereitete Transfektionslösung wurde sodann vollständig für die Transfektion einer vorbereiteten Kavität eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die transient transfizierten Zellen in 96-Kavitäten-Platten überführt und für Experimente vorbereitet. Ungefähr 72 Stunden nach Transfektion erfolgten die Messungen. Der Transfektionserfolg wurde mittels Durchflusszytometrie, wie in Abschnitt E.2.3.5 beschrieben, quantifiziert.

E.2.2.6 Konzentrationsmessung des *second messengers* Calcium

Die transiente Freisetzung von Calcium ins Zytoplasma nach Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCRs) wurde mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert.

E.2.2.6.1 FLIPR Calcium 5 Assay Kit

In dieser Arbeit wurde das FLIPR Calcium 5 Assay Kit der Firma Molecular Devices zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration verwendet. Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen erfordert es kein Waschen der Zellen nach der Farbstoffinkubation.

Das Waschen bei anderen Fluoreszenzmessverfahren dient dazu Restfarbstoff zu entfernen und dadurch das Hintergrundsignal zu minimieren. Abgespülte Zellen oder Fluoreszenzfarbrückstände können dennoch die Messung beeinflussen (Xin et al., 2007). Das in dieser Arbeit genutzte FLIPR Calcium 5 Assay Kit vermeidet diese Problematik durch einen *Quencher*, welcher potenzielle Hintergrundsignale durch extrazellulär an Calcium gebundenen Fluoreszenzfarbstoff maskiert. Der *Quencher* dringt nicht in die Zellen ein, dorthin gelangt nur der calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoff. Bindet der Fluoreszenzfarbstoff im Zytosol an Calcium, kann er nach Anregung ein Fluoreszenzsignal emittieren (Abbildung 18). Je mehr intrazelluläres Calcium vorhanden ist, desto mehr Farbstoff bindet Calcium, so dass das Fluoreszenzsignal proportional mit dem intrazellulären Calciumgehalt ansteigt.

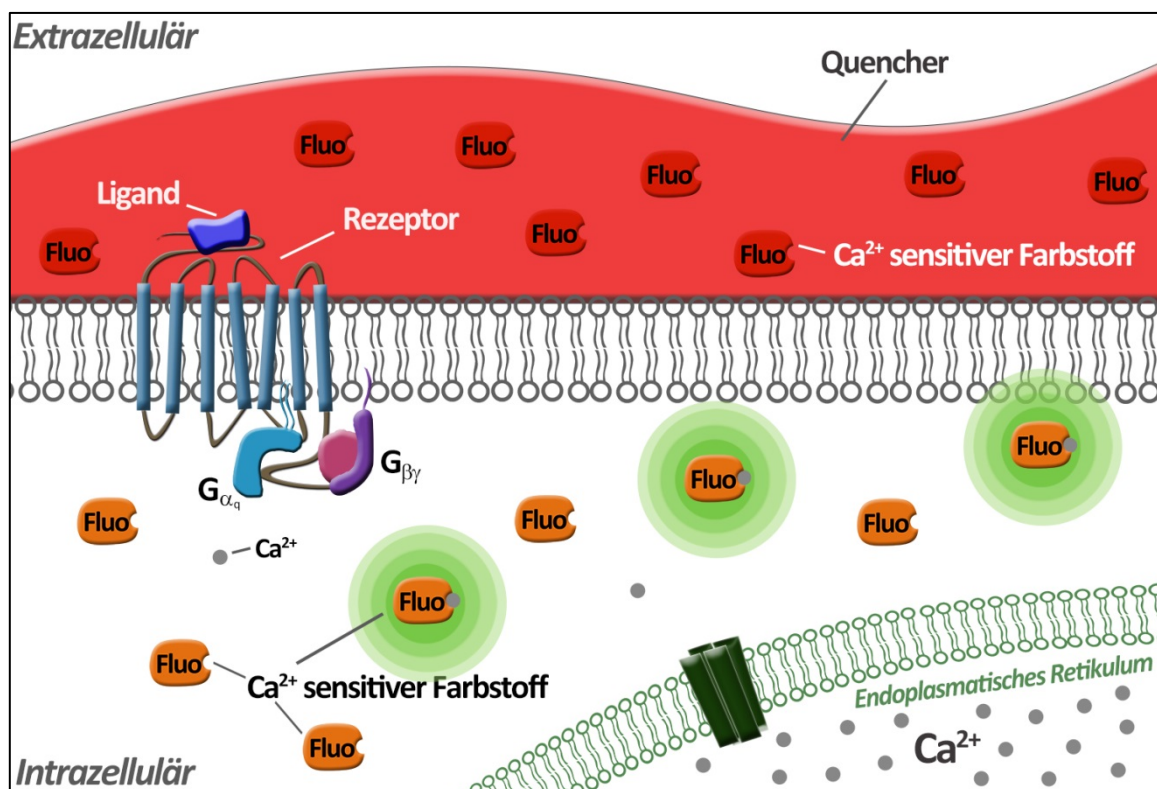


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Funktionsweise des FLIPR Calcium Assay Kits (modifiziert nach Molecular Devices, Biberach an der Riß)

Das FLIPR Calcium Assay Kit dient zur Detektion transients intrazellulärer Calciumliberation beispielsweise nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCRs). Der Fluoreszenzfarbstoff (Fluo) des Kits gelangt durch die Zellmembran ins Zytosol, wird dort von Esterasen modifiziert und bindet Calcium (Ca^{2+}). Ausschließlich Calcium-gebundener Farbstoff fluoresziert bei 485 nm (Emission 520 nm) und ermöglicht damit eine Abschätzung der intrazellulären Calciumkonzentration. Außerhalb der Zelle verhindert der *Quencher* eine Störung der Messung durch, an extrazelluläres Calcium gebundenen Fluoreszenzfarbstoff.

E.2.2.6.2 Intrazelluläre Calciummessung der HEK-293-Zellen

Untersucht wurden HEK-293-Zellen die mittels Flp-In T-REx-System stabil, aber regulierbar mit einer GRK-Mutante transfiziert worden waren. Gegebenenfalls wurden zusätzlich GPCRs transient transfiziert, die die intrazelluläre Calciumfreisetzung induzieren sollten.

Die Zellen wurden auf schwarze 96-Kavitäten-Platten mit durchsichtigem Boden ausgesät. Die Hälfte der Kavitäten wurde mit Tetracyclin (5 µg/ml) versetzt, um die Transkription der GRK-Mutanten zu aktivieren. Die anderen Kavitäten dienten als Kontrolle. Am darauffolgenden Tag wurde das Wachstumsmedium der ca. 80-90% konfluenten Monolayer entfernt, die Zellen mittels 200 µl HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (mit Calcium/Magnesium) gewaschen und anschließend mit 100 µl HBSS und 100 µl des FLIPR Calcium 5 Farbstoffs für ca. 1,5 - 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Platten in einen Platerader gegeben und bei 37°C gemessen. Tabelle 6 zeigt die verwendeten Standardeinstellungen für alle Experimente.

Basiseinstellungen	
Messtyp:	Fluoreszenz
Messart:	Kinetische Einzelkavitätenmessung
Messrichtung:	bottom-optic
Intervallanzahl:	250
Intervallzeit:	0.50 s
Temperatur:	37°C
Optische Einstellungen	
Absorption:	485 nm
Emission:	520 nm
Signalverstärkung (<i>gain</i>):	1250

Tabelle 6: Systemeinstellung des FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg)

Nach Messung der Hintergrundfluoreszenz über 10 Sekunden wurde, mittels in den Platerader integriertem Injektor, automatisiert und bei jeder Messung in vergleichbarer Weise der Rezeptoragonist zugegeben (Tabelle 7).

Zielrezeptor	Agens	Endkonzentration	Literatur
B1R	Des-Arg ¹⁰ -Kallidin (DAK)	1 µM	Regoli et al. (1998)
B2R	Bradykinin (BK)	1 µM	Morgan-Boyd et al. (1987)
PAR1	TFLLR-NH ₂	10 µM	McGuire et al. (2004)
PAR2	2-Furoyl-LIGRLO-NH ₂	1 µM	McGuire et al. (2004)

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Agentien

Die Konzentration der Rezeptoragonisten wurde aus der Literatur so gewählt, dass eine maximale Rezeptorstimulation erreicht wurde. Dadurch wurde eine gute Vergleichbarkeit der Messungen gewährleistet. Jede Kavität wurde einzeln in einer kinetischen Messung über 125 Sekunden untersucht. Alle 0,5 Sekunden erfolgte die Bestimmung der relativen Fluoreszenzeinheiten RFU (*Relative Fluorescence Units*), auch während der Zugabe des Rezeptoragonist (Abbildung 19).

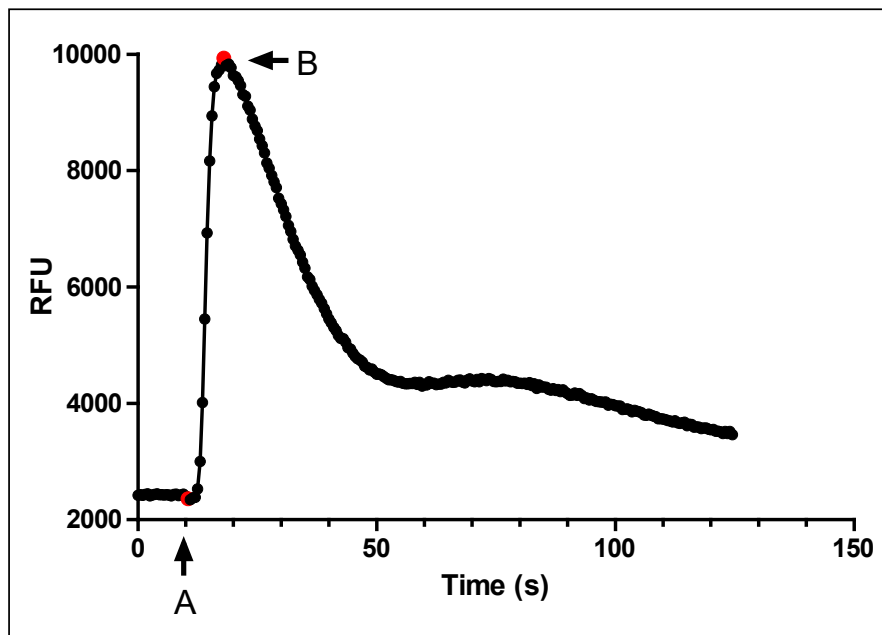


Abbildung 19: Zeit-RFU-Kurve einer intrazellulären Calciummessung (exemplarisch)

Die Kurve zeigt repräsentativ eine intrazelluläre Fluoreszenz-Calcium-Messung. Nach 10 Sekunden erfolgte automatisiert die Injektion des Agonisten (Punkt A), worauf, vermittelt durch den entsprechenden Rezeptor, intrazellulär Calcium freigesetzt wurde. Am Punkt B ist innerhalb von ca. 10 Sekunden nach Stimulation die maximale Calciumkonzentration und folglich maximale Fluoreszenzintensität erreicht, darauf fällt die Kurve wieder ab.

E.2.2.6.3 Auswertung der Calcium-Messungen

Zur quantitativen Auswertung der intrazellulären Calcium-Messungen wurden transfizierte HEK-293-Zellen verglichen. Grundlage dessen ist die Möglichkeit in den HEK-293-Zellen mittels Flp-In T-REx-System die Transkription der GRK-Mutanten Tetrazyklin-abhängig zu regulieren. Einziger Unterschied zwischen den betrachteten Zellkavitäten war, dass zwei der vier pro GRK-Mutante untersuchten Kavitäten am Vortag der Fluoreszenzmessung mit 5 µg/ml Tetrazyklin (+Tet) induziert wurden. Dadurch wurde in den Zellen dieser Kavitäten die Transkription der GRK-Mutante induziert. Die nicht mit Tetrazyklin (-Tet) behandelten Kavitäten dienten als Kontrolle ohne Expression der GRKs. Nach Injektion des GPCR-Agonisten kam es zur intrazellulären Freisetzung von Calcium. Gemäß der in Abbildung 20 gezeigten Berechnung, wurde die relative Suppression der maximalen Calciumfreisetzung in Abhängigkeit von der Expression der GRKs und ihrer Mutanten für alle untersuchten

G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestimmt. Dabei wurden pro Messung mindestens Dupletten angefertigt. Alle Messungen wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt. Die Standardisierung und Automatisierung der intrazellulären Calciummessung mittels Platereader und integriertem Injektorensystem ermöglichte über die numerische Datenanalyse hinaus, eine qualitative Betrachtung der Calciumfreisetzung auf Basis der gemessenen Fluoreszenzkurven.

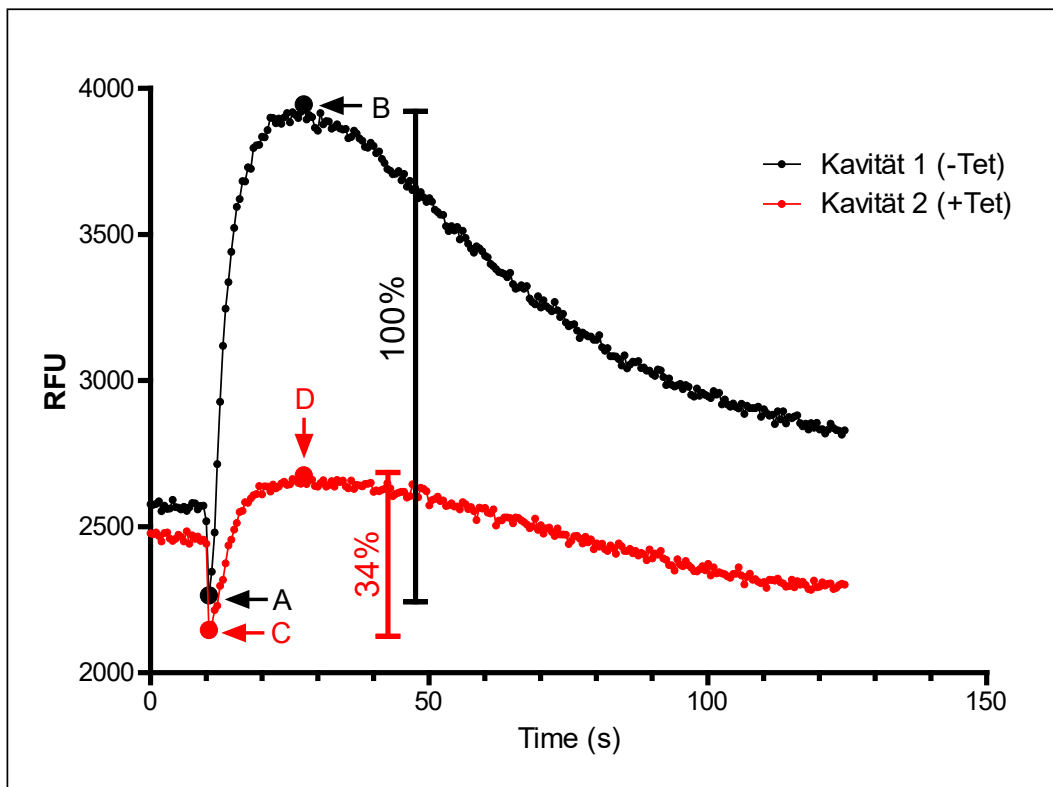


Abbildung 20: Berechnung der Suppression des Calciumsignals durch die GRK-Mutanten (exemplarische Darstellung)

Auf dem Graphen sind zwei intrazelluläre Fluoreszenzcalciummessungen aufgetragen. Einziger Unterschied der untersuchten Kavitäten 1 und 2 ist, dass am Vortag der Messung bei Kavität 2 eine Induktion der GRK-Transkription mittels Tetrazyklin (+Tet) erfolgte. Nach automatisierter Injektion des GPCR-Agens nach 10 Sekunden fällt die relative Fluoreszenzintensität RFU in beiden Kavitäten ab, da dieser Effekt repräsentativ für viele Messungen ist, wurde dies bei der Auswertung berücksichtigt und als Basalwert der niedrigste gemessene Wert eingesetzt. Die Differenz des Maximal- und Minimalwertes der beiden Kavitäten wurde ins Verhältnis gesetzt und der resultierende Prozentsatz ermittelt, wobei jeweils Kavität 1 als Referenz (=100%) genutzt wurde. Rechnung: $(D-C) / (B-A)$.

E.2.2.7 Quantifizierung der β -Arrestin-Rekrutierung

Gemäß dem Model der homologen Desensibilisierung folgt der GPCR-Phosphorylierung durch GRKs die Rekrutierung von zytoplasmatischen β -Arrestinen (Barak et al., 1997). Um diese Rekrutierung in lebenden Zellen zu detektieren und zu quantifizieren wurde der Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer, kurz BRET genutzt.

E.2.2.7.1 Funktionsweise des BRET

BRET beruht auf dem sogenannten Förster-Resonanzenergietransfer, dem physikalischen Effekt des strahlungsfreien Energietransfers von einem Donor auf einen Akzeptor (Förster, 1948). Die Besonderheit des Verfahrens ist die Tatsache, dass dieser Transfer ausschließlich stattfindet, wenn Donor und Akzeptor in einem Abstand von 1 bis ca. 10 nm zueinander lokalisiert sind, wobei die Energieintensität neben dem Abstand vor allem von der Orientierung zueinander abhängt. BRET nutzt als Donor das Enzym RLuc, eine Luciferase der Seefedernart *Renilla reniformis*, die unter Umsetzung des Substrats Coelenterazin H (CTZ-H) blau luminesziert. Als Akzeptor dient das gelb fluoreszierende Protein eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*). Befinden sich RLuc und eYFP bei Zusatz des RLuc-Substrats CTZ-H in direkter Nähe, kommt es zur Energieübertragung von RLuc auf eYFP, welches daraufhin gelb fluoresziert ohne das weitere externe Stimuli nötig sind. Distanzen im einstelligen Nanometerbereich werden intrazellulär regelhaft durch Protein-Protein-Interaktionen erreicht (Brown et al., 2015). Dadurch ist das Verfahren geeignet, um beispielsweise die Bindung von β -Arrestin an den Bradykininrezeptor zu detektieren, da gezeigt werden konnte, dass der Rezeptor C-Terminus und der Arrestin N-Terminus eine enge intermolekulare β -Faltblatt Bindung eingehen (Zhou et al., 2017).

E.2.2.7.2 BRET-Messung der β -Arrestine

Um BRET für die Detektion der β -Arrestinrekrutierung an den GPCR nach GRK-Phosphorylierung zu nutzen, wurde dem Bradykinin B2 Rezeptor C-terminal eine modifizierte RLuc, die sogenannte RLucII angefügt (B2R-RLucII). Der Rezeptor fungiert somit als Biolumineszenz-Donor. Die Sequenz von β -Arrestin 1 beziehungsweise β -Arrestin 2 wurde N-terminal mit eYFP fusioniert, so dass β -Arrestin 1 respektive 2 als sogenanntes Akzeptor-Fluorophor wirkt. Modifizierter B2-Rezeptor und β -Arrestin wurden anschließend transient in HEK-293-Zellen transfiziert, die jeweils eine der fünf untersuchten GRKs 2-6 stabil, Tetrazyklin-induzierbar exprimierten. Somit ließ sich die Rekrutierung der eYFP-markierten β -Arrestine an B2R-RLucII mittels BRET GRK-abhängig untersuchen, wie in Abbildung 21 beispielhaft illustriert. Die resultierende Fluoreszenzintensität ließ sich quantifizieren.

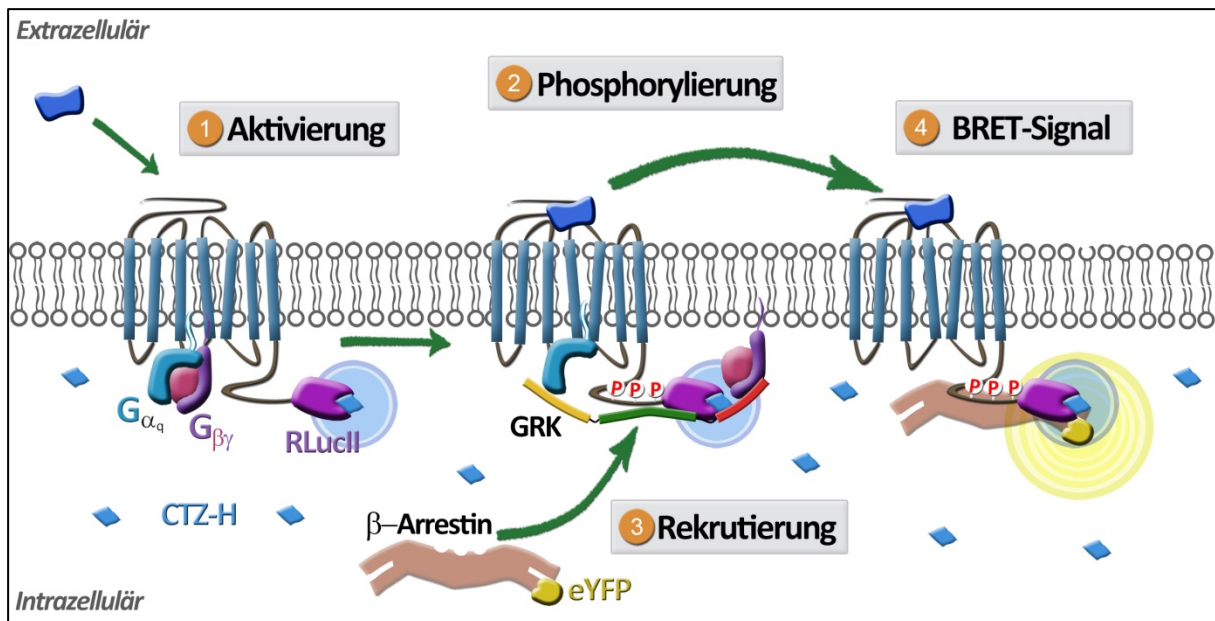


Abbildung 21: Schematische Darstellung der β -Arrestin BRET-Messung

Das Bradykinin B2 Rezeptor-RLucII-Fusionsprotein (B2R-RLucII) erzeugt unter Umsatz des intrazellulären Substrats CTZ-H Lumineszenz. Nach der Rezeptoraktivierung (1) kommt es zur Spaltung des heterotrimeren $G\alpha$ -Proteins am B2R-RLucII. Gemäß der homologen Desensibilisierungshypothese folgt der Rezeptoraktivierung die GRK-Rekrutierung und Phosphorylierung des Rezeptors (2) sowie die Rekrutierung von β -Arrestin 1 und/oder 2, welches N-terminal mit eYFP fusioniert wurde. Durch Bindung des eYFP- β -Arrestins an den phosphorylierten B2R-RLucII wird die für BRET kritische Distanz unterschritten und Energie an eYFP übertragen. Die resultierende Fluoreszenzintensität kann gemessen werden (4).

E.2.2.7.3 BRET-Messung in HEK-293-Zellen

Vor der BRET-Messung wurden die HEK-293-Zellen zunächst gemäß dem in E.2.2.5.2 beschriebenen Vorgehen transient mit einem Rezeptor und einem β -Arrestin transfiziert. Dabei wurden zur Transfektion folgende Ansätze verwendet: Lipotransfektionsansatz 50 μ l DMEM mit 0,5 μ l EcoTransfect und Transfektionsansatz 50 μ l DMEM mit 0,25 μ g Plasmid, bestehend aus 0,05 μ g B2R-RLucII oder einer Rezeptormutante S->A B2R-RLucII, bei der alle Serine des C-Terminus zu Alaninen mutiert wurden sowie 0,2 μ g eYFP- β -Arrestin 1 respektive 2 oder einer leeren Plasmidkontrolle (Mock-Kontrolle). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und auf eine weiße 96-Kavitätenplatte mit klarem Boden ausgebracht und dort für ca. 48 Stunden inkubiert, bis beinahe 100% Zellkonfluenz erreicht wurde. Am Tag vor der Messung wurde in der Hälfte der Kavitäten einer Zellreihe die Expression der entsprechenden GRK-Mutante durch Zugabe von Tetrazyklin induziert. Für die BRET-Messung wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Kavitäten mit HBSS gewaschen und anschließend mit 30 μ l HBSS versehen. Zunächst wurde die erfolgreiche Expression der eYFP- β -Arrestine über die Basisfluoreszenzmessung geprüft. Nach Abdecken des Kavitätenbodens mit weißer Folie wurde 10 μ l CTZ-H (Endkonzentration 15 μ M) zugegeben und die Gesamtlumineszenz nach Erreichen des Maximalwerts gemessen. Anschließend wurde 10 μ l HBSS plus Bradykinin (Endkonzentration 1 μ M) hinzugefügt und

das BRET-Signal bestimmt. Alle Messungen erfolgten mit dem Platerader Tecan Infinite 200PRO unter den in Tabelle 8 dargestellten Einstellungen bei 23°C.

Einstellungen Basisfluoreszenz	
Messtyp:	Fluoreszenz
Messdirektion:	bottom-optic
Integrationszeit:	50 µs
Optische Einstellungen	
Absorption:	485 nm
Emission:	535 nm
Absorptionsbandbreite:	20 nm
Emissionbandbreite:	25 nm
Signalverstärkung (<i>gain</i>):	80
Einstellungen Lumineszenz gesamt	
Messmodus:	Lumineszenz
Messart:	Kinetische Messung
Integrationszeit:	1000 ms
Intervallzeit:	Minimal (ca. 5 s)
Intervallzahl:	6
Einstellungen BRET-Messung	
Messmodus:	Lumineszenz
Messart:	Kinetische Messung
Filter 1:	Blue1 (ca. 400 - 480 nm)
Filter 2:	Green1 (ca. 520 - 580 nm)
Integrationszeit pro Filter:	500 ms
Intervallzeit:	Minimal (ca. 5 s)
Intervallzahl	10

Tabelle 8: Systemeinstellungen des Infinite 200 PRO für BRET-Messung (Tecan, Männedorf)

E.2.2.7.4 Auswertung der BRET-Messungen

Das BRET-Signal bestimmt sich aus dem Verhältnis der BRET-Messung mit Filter 2 gegen Filter 1. Dabei handelt es sich um das Signal vom Akzeptor eYFP (Signalmaximum ~527 nm) im Verhältnis zum Donor RLucII (Signalmaximum ~482 nm). Um korrekte Ergebnisse zu erhalten ist die Hintergrundaktivität zu berücksichtigen, die aus den Kavitäten ohne Akzeptor (Mock-Kontrollen) bestimmt und bei den Messungen subtrahiert wurde. Es resultiert das Netto BRET-Ergebnis (Net-BRET).

Die Net-BRET Ergebnisse der Kavitäten mit GRK-Induktion können anschließend ins Verhältnis zu den Ergebnissen ohne GRK-Induktion gesetzt werden, wodurch sich der Einfluss der GRK auf die Arrestin-Rekrutierung quantifizieren lässt. Die Kavitäten ohne Tetrazyklin-Induktion der GRK-Expression werden dabei analog zu den Calciummessungen mit 100% gleichgesetzt. Abgesehen von der Zugabe des Tetrazyklins handelt es sich bei den

Kavitäten um identische Zellen. Alle Messungen wurden dreimal unabhängig und jeweils als Duplikate durchgeführt.

E.2.3 Proteinbiochemische Methoden

E.2.3.1 Proteinfreisetzung durch Zell-Lyse

Zur späteren Analyse wurden die Proteine zunächst aus den Zellen durch Lyse freigesetzt. Hierzu wurde das Wachstumsmedium entfernt, einmal mit eisgekühltem PBS (mit Calcium/Magnesium) gewaschen und sodann mit 300 µl RIPA-Puffer, der zuvor mit dem *cComplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* versetzt wurde, für 10 Minuten unter Eiskühlung bei 4°C lysiert. Nach Transfer der Lysate in ein Mikroreaktionsgefäß wurden diese für weitere 30 Minuten bei 4°C unter Rollen inkubiert und sodann bei 14.000 U/min, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene Proteinkonzentration wurde mittels *Micro BSA Protein Assay Kit* der Firma Thermo Fisher Scientific bestimmt.

E.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

E.2.3.2.1 Herstellung eines diskontinuierlichen Gels

Das diskontinuierliche Gel für den SDS-PAGE besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Ersteres dient dazu die Proteine zu konzentrieren, es ist grobporig, hat einen sauren pH-Wert und weist eine geringere Leitfähigkeit auf. Das Trenngel dient dazu, die Proteine gemäß ihrer Molekülmasse zu separieren. Nach Anlegen der elektrischen Spannung an das Gel, wandern die kleinen SDS-Proteinkomplexe schneller, die großen langsamer zur Anode, dadurch kommt es zur gewünschten Größenauftrennung.

Nach Vorbereitung der Gelform und der Gellösungen, wie in Tabelle 9 a beschrieben, wurde zunächst die Polymerisation des Trenngels durch Zugabe von TEMED und 10%-igem APS, wie in Tabelle 9 b gezeigt, gestartet und die Gellösung sodann in die Gelform gegossen, mit Ethanol bedeckt und 20 Minuten zur Polymerisation inkubiert. Nach Abgießen des Ethanols wurde der Probenkamm eingesetzt und die Sammelgellösung aus Tabelle 9 a durch Zusatz von 7,5 µl TEMED und 50 µl 10%-iges APS zur Polymerisation gebracht. Anschließend wurde der Ansatz in die Gelform pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bezeichnung	Trenngel	Sammelgel	
Destilliertes H ₂ O	4,2 ml	2,6 ml	} a
Puffer	2,5 ml (pH 8.8)	1,25 ml (pH 6.8)	
40% Acrylamid	3,33 ml	1,1 ml	
10% SDS	100 µl	50 µl	
TEMED	15 µl	7,5 µl	} b
10% APS	100 µl	50 µl	

Tabelle 9: Gelzusammensetzung

E.2.3.2 Massenabhängige Separation der Proteine

Um eine Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Molekülmasse zu erreichen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Hierzu mussten die Proteine zunächst denaturiert, linearisiert und reduziert sowie von ihrer Eigenladung befreit werden. Dazu wurde das Proteinlysate im Verhältnis 5:1 mit dem 5-fach Laemmli-Puffer (25% DTT) versetzt und sodann bei 95°C für 5 Minuten erhitzt.

Das im Puffer enthaltene anionische Detergenz SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) lagert sich gleichmäßig an die Proteine an und führt dadurch zu einer weitgehend einheitlich negativen Ladungsverteilung selbiger. Beim Erhitzen kommt es nebst der Proteindenaturierung durch SDS auch zu einer Linearisierung der Proteine. Unterstützt wird dies durch das enthaltene Dithiothreitol (DTT), welches in einer Endkonzentration von 200 mM zur Reduzierung der Disulfidbrücken führt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden konzentrationsgleich in die Taschen des diskontinuierlichen Gels gegeben. Zusätzlich wurde als Proteinstandard 8 µl *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* der Firma Thermo Fisher Scientific aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte in der vertikalen Elektrophoresekammer *X-Cell SureLock* unter Anlage einer Spannung von 110 V, 80 mA für ca. 2 Stunden im Tris-Glycin-Puffer.

E.2.3.3 Proteintransfer mittels Western Blot

In einem feuchten Transferverfahren wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine vom Gel unter Anlage einer elektrischen Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Der Aufbau bestand aus folgenden Teilen:

Anode – Schwamm (2x) – Whatman-Filterpapier – Nitrocellulosemembran (0,45 µm) – Gel – Whatman-Filterpapier – Schwamm (7x) – Kathode

Gefüllt mit Transferpuffer wurde die *X-Cell SureLock* Kammer für 2 Stunden mit einer Spannung von 40 V und einer Stromstärke von 150 mA betrieben.

E.2.3.4 Immunologischer Proteinnachweis

Zur Detektion spezifischer Proteine in der Nitrocellulosemembran wurden Antikörper eingesetzt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren, erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation der Nitrocellulosemembran in 5%iger Milch, gelöst in TBST-Puffer bei Raumtemperatur. Der gewünschte Primärantikörper wurde sodann in der in Tabelle 10 genannten Verdünnung eingesetzt und in 3 ml TBST-Puffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter Rollen inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST für jeweils 5 Minuten entfernt.

Zielprotein	Herkunft	Reihenfolge	Verdünnung
GRK 2	Kaninchen	primär	1:1000
GRK 3	Kaninchen	primär	1:1000
GRK 4	Kaninchen	primär	1:1000
GRK 5	Kaninchen	primär	1:1000
GRK 6	Kaninchen	primär	1:1000
GAPDH	Kaninchen	primär	1:10000
Kaninchen (mit Meerrettich-peroxidase gekoppelt (HRP))	Ziege	sekundär	1:2000

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Antikörper

Gelöst in 5 ml TBST wurde sodann der HRP-markierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 für 1 Stunde mit der Nitrozellulosemembran bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST-Puffer für jeweils 5 Minuten. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für 5 Minuten mit 2 ml *Lumi-Light Western Blotting Substrat* der Firma Roche bei Raumtemperatur inkubiert. HRP setzt das Substrat unter Lumineszenzfreisetzung um. Die Antikörper-Protein-Komplex-Banden konnten dadurch auf dem Autoradiographiefilm *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) als Schwärzung des Films sichtbar gemacht werden (Abbildung 24).

E.2.3.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur Zellanalyse. In der vorliegenden Arbeit wurde FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) dazu genutzt, die Transfektionseffizienz von transient transfizierten Rezeptoren zu bestimmen. Hierzu wurden alle Rezeptorplasmide mittels HA(Hämagglutinin)-Tag markiert. Zellen, die den HA-markierten Rezeptor exprimieren können mit einem Anti-HA-FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-Antikörper nachgewiesen werden.

Die potenziell transfizierten Zellen wurden mit dem HA-FITC-Antikörper (1:300) für 30 Minuten unter Lichtabschluss bei 4°C inkubiert, anschließend 100.000 Zellen via FACS analysiert und die prozentuale Transfektionsrate bestimmt. Es ergab sich eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 30-50%.

E.2.3.6 Messung des p-ERK1/2 nach GPCR-Aktivierung

Intrazelluläre Signalkaskaden können nach der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors zur Phosphorylierung von ERK1/2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) führen.

E.2.3.6.1 AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 Assay Kit

Die Menge des endogen phosphorylierten ERK1/2 kann in lysierten Zellen mit einem optischen Detektionsverfahren bestimmt werden. Hierzu wurde das *AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 Assay Kit* der Firma PerkinElmer eingesetzt. Das System basiert auf einem Immun-Sandwich-Assay (Abbildung 22).

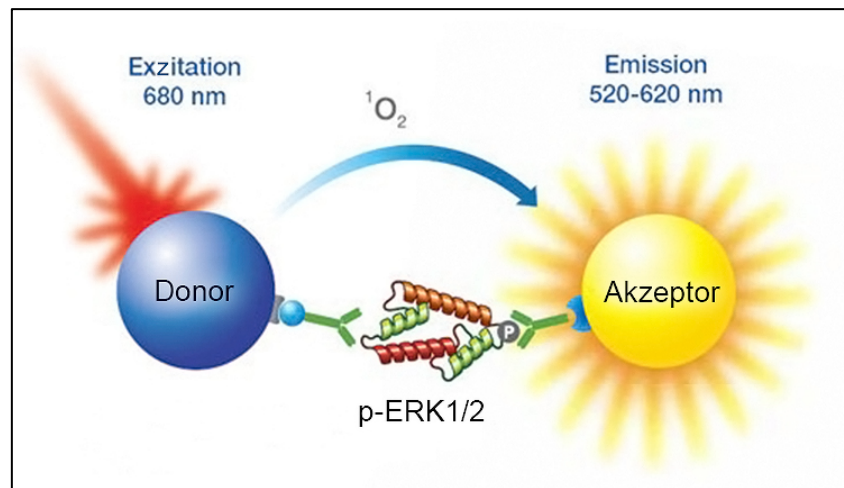


Abbildung 22: AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 Technologie (modifiziert nach PerkinElmer, Rodgau)

AlphaScreen SureFire ermöglicht die Quantifizierung des endogenen p-ERK1/2. Erreicht wird dies durch einen Immun-Sandwich-Assay. Sowohl Donor (Anti-ERK1/2) als auch Akzeptor (Anti-Phosphorylierung) verfügen über einen spezifischen Antikörper. Beide gemeinsam binden nur an p-ERK1/2. Nach Exzitation generiert der Donor Singulett-Sauerstoff, der, wenn er den Akzeptor erreicht, dort zur Emission von Licht führt. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ist sehr instabil und hat daher nur eine kurze Lebensdauer und Diffusionsreichweite. Nur wenn Donor und Akzeptor an dasselbe p-ERK1/2-Protein gebunden sind, ist der Abstand ausreichend kurz. Ohne gleichzeitige Bindung erfolgt in der Regel keine Lichtemission.

Ein Donor bindet über Streptavidin einen Antikörper, der spezifisch ERK1/2 erkennt und bindet. Der Akzeptor ist über Protein A mit einem Anti-Phosphorylierungs-Antikörper verbunden. Folglich binden sowohl Donor als auch Akzeptor über ihre spezifischen Antikörper an phosphoryliertes und damit aktiviertes p-ERK1/2. Wird der Donor mit Laserlicht der Wellenlänge 680 nm bestrahlt, generiert er aus Umgebungssauerstoff Singulett-Sauerstoff, der eine sehr kurze Lebenszeit von nur 4 μs und eine maximale Diffusionsreichweite von 200 nm hat. Erreicht der Singulett-Sauerstoff den Akzeptor, löst selbiger eine Reaktionskaskade aus, die zur Lichtemission im Spektrum 520-620 nm führt. Dies ist der Fall, wenn beide Assay-Substanzen an p-ERK1/2 gebunden und sich dadurch sehr nahe sind. Die Intensität der Lumineszenz verhält sich dabei proportional zur Menge an p-ERK1/2 und ermöglicht damit einen Vergleich der GRK-Mutanten in Bezug auf deren Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2.

E.2.3.6.2 p-ERK1/2 Messung der HEK-293-Zellen

Für die Bestimmung des endogenen p-ERK1/2 wurden HEK-293-Zellen mit stabiler, regulierbarer Expression einer GRK-Mutante transient mit dem zu untersuchenden GPCR transfiziert. Die Zellen wurden vergleichbar der intrazellulären Calciummessung in klare 96-Kavitäten-Platten ausgesät, so dass am Folgetag ein konfluenten Monolayer von ca. 80-90% erreicht wurde. Die Hälfte der Kavitäten wurde am Tag vor der Messung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin (+Tet) indiziert. Am Versuchstag wurde das Wachstumsmedium entfernt und die

Kavitäten mit 100 µl HBSS + 20 mM HEPES gewaschen, das vorher im Wasserbad auf 37°C angewärmt wurde. Anschließend wurden die Kavitäten mit 90 µl ebenfalls angewärmtem FCS-freiem Hunger-Medium gefüllt. Das Hunger-Medium bestand aus DMEM, 0,5% BSA (Bovines Serumalbumin) und jeweils 1% Penicillin (P) und Streptomycin (S). Tetrazyklin wurde in gleicher Konzentration dort zugefügt, wo bereits über Nacht Tetrazyklininduktion bestand. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Kavitäten im Wasserbad bei 37°C exakt 5 Minuten mit dem GPCR-Agonisten in der in Tabelle 7 gezeigten Endkonzentration stimuliert. Die Stimulation wurde durch Absaugen des Hunger-Mediums samt GPCR-Agonisten beendet und sofort die Lyse der HEK-293-Zellen mittels 50 µl Lysepuffer eingeleitet. Der Lysepuffer bestand aus, in destilliertem Wasser verdünnten, *AlphaScreen SureFire 5-fach-Lysispuffer*. Die Kavitäten wurden abschließend bei Raumtemperatur und 350 U/min für 10 Minuten auf dem Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg) inkubiert, bevor sie auf Trockeneis gestellt und bei -80°C gelagert wurden bis sie tiefgefroren an die *Assay Development and Screening Platform* des Helmholtz Zentrums München am Institut für Molekulare Toxikologie und Pharmakologie zur Analyse gegeben wurden. Pro Messung wurden Triplikate angefertigt, die Messungen wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt. Die Messungen am Helmholtz Zentrum München erfolgten gemäß den Herstellerangaben des *AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 Assay Kits*.

Aus den Lumineszenzrohdaten der *Assay Development and Screening Platform* des Helmholtz Zentrums München wurden arithmetische Mittelwerte der Triplikate berechnet. Die Werte der Tetrazyklin-induzierten Zellen, die folglich die GRK-Mutanten exprimierten, wurden ins Verhältnis zu den Werten der nicht Tetrazyklin-induzierten HEK-293-Zellen gesetzt. Dadurch wurde eine quantitative Vergleichbarkeit der verschiedenen GRK-Mutanten in Bezug auf ihre p-ERK1/2 Induktion ermöglicht.

E.2.4 Statistische Datenanalyse und -auswertung

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde das arithmetische Mittel ± SEM mindestens dreier separater Messungen ermittelt und grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA sowie gegenüber der nicht-induzierten Messung (Kontrolle = 100%) oder dem GRK-Wildtypen mittels Post-Hoc Dunnett's Test. Die BRET-Ergebnisse wurden mittels zweiseitigem t-Test untersucht. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Messwerte wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software durchgeführt.

Als statistisch signifikant galten folgende p-Werte: p<0.05(*), p<0.01(**), p<0.001(***), p<0.0001(****).

F Ergebnisse

F.1 Einfluss von GRKs auf GPCR induzierte Calciumsignale

F.1.1 Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung des GRK-Einflusses

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen beeinflussen die Inaktivierung von GPCRs sowie von Signalkaskaden, welche durch aktivierte GPCRs stimuliert werden. Im Fokus dieser Arbeit steht die Bedeutung der GRKs und ihrer Funktionsdomänen für die Regulation des *second messengers* Calcium, der nach GPCR-Aktivierung G-Protein-vermittelt intrazellulär freigesetzt wird.

F.1.1.1 Herstellung von Kinase-defizienten GRKs

Gemäß dem Konzept der homologen Desensibilisierung, welches unter C.5 umfassend erläutert wurde, sollte die Kinasefunktion der GRKs von zentraler Bedeutung für die Regulation der GPCR-Signaltermination sein. Um dies zu überprüfen, wurden neben den Wildtyp GRKs auch GRK-Mutanten untersucht, bei denen die Kinasedomäne punktmutiert und damit funktionslos war.

Für die GRK2-Familie existierten in unserer Arbeitsgruppe bereits aus vorherigen Projekten GRK-Mutanten mit einer punktmutierten Kinasedomäne (Welte, 2013). Für die GRK4-Familie wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese Kinase-defiziente GRKs erzeugt. Hierzu wurden bereits aus der Literatur bekannte Mutationssequenzen genutzt (Tabelle 11).

Bezeichnung	Literaturreferenz
GRK2 K220R	Kong et al. (1994)
GRK3 K220R	
GRK4 K216M-K217M	Sallese, Salvatore, et al. (2000)
GRK5 K215R	Tiruppathi et al. (2000)
GRK6 K215M-K216M	Lazari et al. (1999)

Tabelle 11: Punktmutationen der GRK-Kinasedomäne

Die resultierenden GRK-Mutanten wurden gemäß ihrer funktionellen Einschränkung als Kinase-defizient oder kurz *Kinase-def* bezeichnet. Alle benötigten molekularbiologischen Verfahren sind im Methodenteil unter D.2.1 umfassend dargestellt. Abbildung 23 zeigt die Sequenz und Punktmutationen aller untersuchten GRKs.

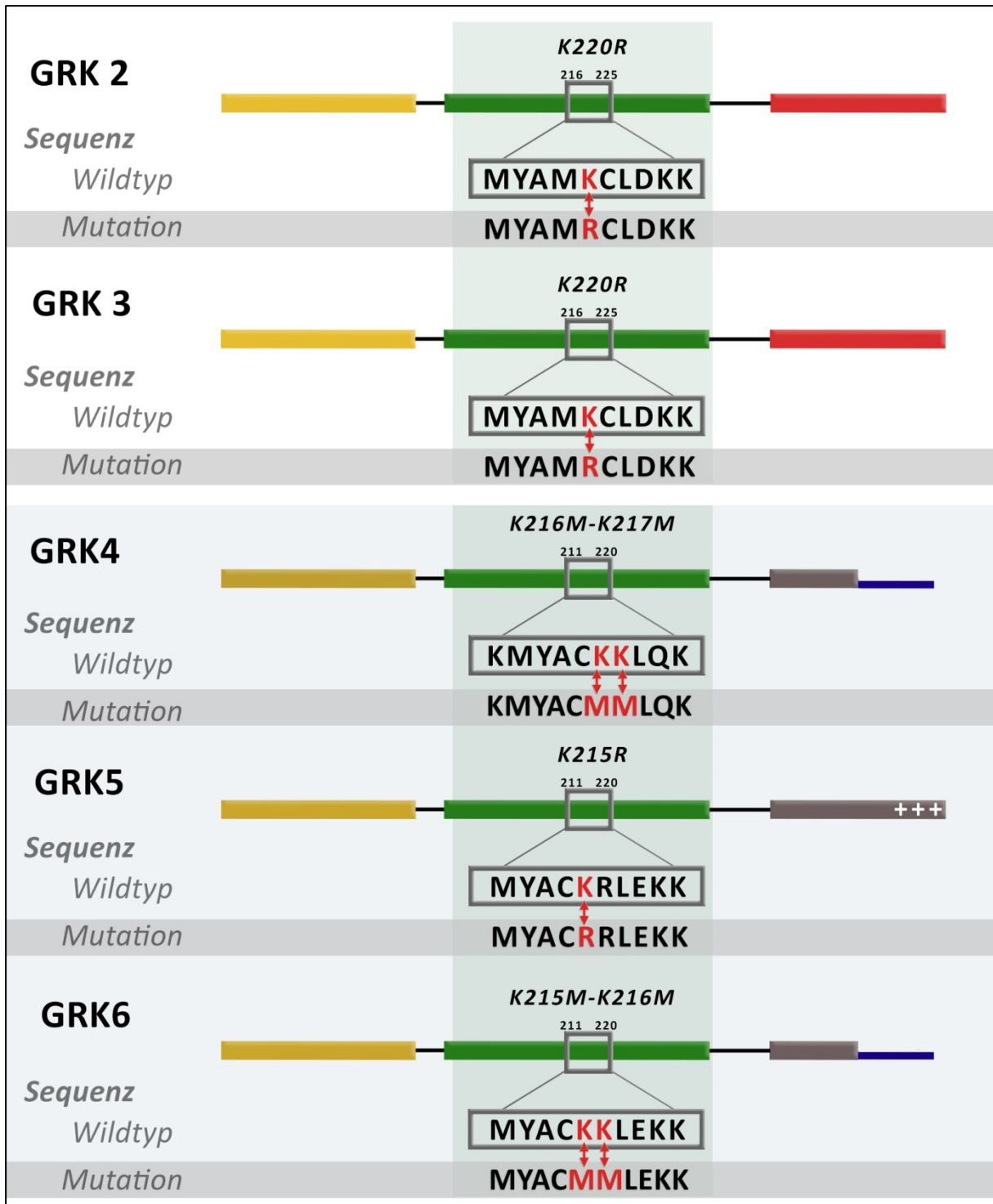


Abbildung 23: Illustration der GRK-Kinasedomäne Punktmutationen

Die Grafik visualisiert den jeweiligen Sequenzausschnitt in dem die Punktmutation(en) durchgeführt wurde(n). K220R bedeutet beispielsweise, dass an Aminosäuresequenzposition 220 ein Lysin (K) durch ein Arginin (R) ausgetauscht wurde, wodurch die GRK2/3 Kinase-Domänen ihre Funktion verlieren. Analoges gilt für die anderen Mutanten.

F.1.1.2 Überprüfung der Regulierbarkeit der GRK-Expression

Zur Untersuchung der GPCR-Regulation durch GRKs oder deren Mutanten wurden diese stabil in HEK-293-Zellen transfiziert. Nachfolgend werden stabil mit GRKs transfizierte HEK-293-Zellen als GRK-HEK-293-Zellen bezeichnet. Das Vorgehen wurde detailliert im Methodenteil in E.2.2.5.1 beschrieben. Es wurden HEK-293-Zellen mit Flp-In T-REX-Expressionssystem genutzt, was eine stabile Transfektion und isogene, Tetrazyklin-induzierbare Expression der GRKs ermöglichte. Die transfizierten Plasmide wurden ergo jeweils an der gleichen Stelle im Zellgenom integriert. Das Expressionslevel aller in HEK-293-Zellen transfizierten GRKs wurde somit nicht durch unterschiedliche Einbauorte im Genom mit gegebenenfalls divergentem Expressionsverhalten beeinflusst. Das Flp-In T-REX System bot außerdem die Möglichkeit die Expression der eingebrachten GRKs Tetrazyklin-abhängig zu regulieren. Ohne Tetrazyklinzugabe erfolgte beinahe keine GRK-Überexpression. Die Überexpression und Tetrazyklin-Induzierbarkeit aller stabil transfizierten GRKs wurde mittels Western Blot überprüft (Abbildung 24).

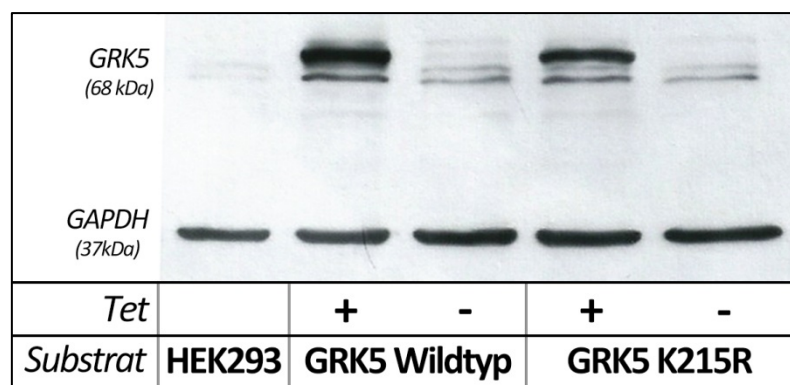


Abbildung 24: Regulierbarkeit der GRK-Expression von GRK5 im Western Blot

Der Western Blot verdeutlicht beispielhaft die Tetrazyklin-abhängige Induktion (+Tet) der GRK5-Expression bei stabil transfizierten Zellen. Als Ladungskontrolle diente GAPDH, da selbige in fast allen Zellen konstant in hoher Konzentration exprimiert wird. Die eingesetzte Proteinmenge war in allen fünf Reihen 60µg. (kDa: Kilodalton)

Als Referenz diente das endogene Expressionslevel der GRKs in der HEK-293-Ausgangszelllinie. Vergleicht man selbiges im vorliegenden Western Blot mit den Zellen, die zwar stabil mit dem GRK5-Plasmid transfiziert, jedoch nicht mit Tetrazyklin (-Tet) induziert wurden, illustriert dies eine geringe Durchlässigkeit (*leakness*) des Systems. Zwar scheint das GRK5-Proteinlevel in den nicht-induzierten Zellen etwas größer als bei der HEK-293-Ausgangszelllinie zu sein, doch deutlich geringer als bei den mit Tetrazyklin induzierten Zellen (+Tet). Folglich sind mit GRK transfizierte, jedoch nicht-induzierte Zellen als Kontrolle für die Messungen geeignet. Vorteil dieses Systems ist, dass es sich bei nicht-induzierten Kontrollzellen und Zellen mit induzierter GRK-Überexpression um ansonsten identische Zellen handelt. Lediglich im letzten Schritt vor der Messung wurden die Zellen auf zwei Kavitäten aufgeteilt und in der einen Kavität durch Zugabe von Tetrazyklin (5 µg/ml) die

GRK-Überexpression induziert. Um die Funktionalität des beschriebenen Systems für die GRK-abhängige Calciumkonzentrationsbestimmung zu evaluieren, wurden nachfolgend erste Messungen durchgeführt.

F.1.2 Bestimmung des Calciumsignals endogener Bradykinin B2 Rezeptoren in Abhängigkeit der GRK-Expression

Zur Bestimmung des GRK-Einflusses auf das intrazelluläre Calciumsignal des endogenen Bradykinin B2 Rezeptors (B2R) wurden die stabil mit GRK-Konstrukten transfizierten, induzierbaren HEK-293-Zellen mit 1 μM Bradykinin (BK) bei 37°C stimuliert. Bradykinin fungierte in diesem Fall als Agonist des endogenen in HEK-293 Zellen exprimierten B2R, welcher über $\text{G}\alpha_q$ und IP_3 die intrazelluläre Calciumliberation induziert. Der Calcium-Konzentrationsverlauf wurde, wie im Methodenteil unter E.2.2.6.2 umfassend beschrieben, über die Zeit erfasst und gemäß E.2.2.6.3 ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt, wobei Abschnitt A exemplarisch den relativen Konzentrationsverlauf des intrazellulären Calciums für die fünf induzierten Wildtyp-GRKs und Abschnitt B die korrespondierende Auswertung der Peaks für Wildtypen und Kinase-defiziente GRK-Mutanten darstellt.

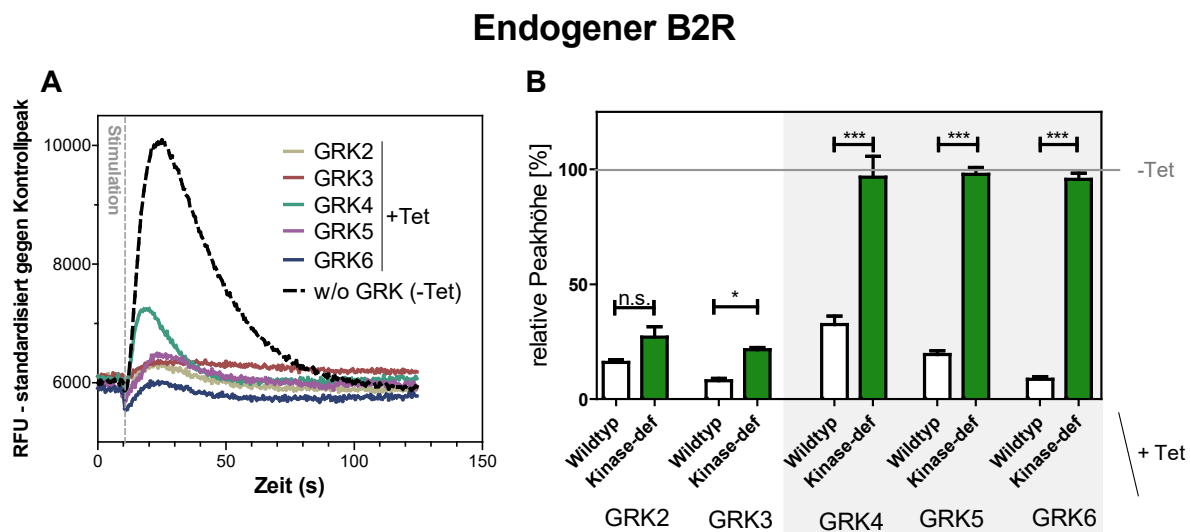


Abbildung 25: B2R-induzierte Calciumliberation in Abhängigkeit der GRKs

Bei HEK-293-Zellen mit einer stabilen regulierbaren Überexpression einer der GRKs2-6 oder deren Mutanten, wurde durch Tetrazyklinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Zellkavitäten die Expression des GRK-Konstrukts induziert. Die restlichen Kavitäten (-Tet) dienen als Kontrolle für den GRK-Effekt. Nach 24h Induktion erfolgte bei 37°C die Rezeptorstimulation mit 1 μM Bradykinin und die kinetische Fluoreszenz-Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration.

A zeigt exemplarisch die kinetischen Konzentrationskurven der fünf GRK Wildtypen im Vergleich zur Kontrolle (-Tet, unterbrochene schwarze Linie), wobei eine Adaptation der Basalwerte zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte. Die Stimulation erfolgte nach 10 Sekunden. B zeigt die Auswertung der Kurvenpeaks von GRK-Wildtypen und -Mutanten prozentual zur jeweiligen Kontrollmessung mit den entsprechenden nicht-induzierten Zellen (=100%). Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und dem Post-hoc Dunnett's Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen (p -Werte: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

Die Messkurven in Abbildung 25 A zeigen bereits wenige Sekunden nach Bradykininzugabe einen detektierbaren Calciumkonzentrationsanstieg, der ungefähr 10 Sekunden nach Stimulation mit Bradykinin sein Maximum erreicht und anschließend auf den Ausgangswert abfällt. Am deutlichsten ist der Ausschlag bei den nicht mit Tetrazyklin induzierten HEK-293-Zellen ohne GRK-Überexpression. Die Induktion aller Wildtyp-GRKs führte jeweils zu einer starken Reduktion der Calciumfreisetzung nach Rezeptoraktivierung. Abbildung 25 B quantifiziert diesen GRK-Effekt und vergleicht selbigen mit den entsprechenden Kinase-defizienten Mutanten. GRK-HEK-293-Zellen ohne Tetrazyklininduktion (-Tet), die folglich auch keine GRK überexprimieren, werden als Referenz mit 100% gleichgesetzt. Dies ermöglicht es, den Einfluss der GRKs auf das Rezeptor-vermittelte Calciumsignal prozentual darzustellen und verdeutlicht, dass die einzelnen GRK Wildtypen trotz isogener Überexpression einen divergenten Einfluss auf das Calciumsignal haben. GRK3 und 6 beispielsweise konnten eine Reduktion von über 90% erzielen, während GRK4 das Calciumkonzentrationsmaximum um knapp 70% reduzierte. Deutliche Unterschiede ergaben sich für die Kinase-defizienten Mutanten der GRKs. So war der Vergleich zwischen Wildtyp und Kinase-defizienter Mutante bei GRK2 nicht signifikant und auch bei GRK3 zeigte die Kinase-defiziente Mutante noch eine sehr starke Reduktion des Calciumsignals. Bei GRK4-6 hingegen führte die Ausschaltung der GRK-Kinaseaktivität zum vollständigen Funktionsverlust in Bezug auf die Modulation des B2R-Calciumsignals. Für diese GRKs ist die Kinaseaktivität offensichtlich von zentraler funktioneller Relevanz.

F.1.3 Vergleich des Einflusses einer GRK-Überexpression auf das Calciumsignal endogener und überexprimierter Bradykininrezeptoren

Es resultiert die Frage, ob mit obigem experimentellen Ansatz auch der GRK-Einfluss auf Signale von GPCRs untersucht werden könnte, die nicht endogen sondern nur transient transfiziert (über)exprimiert werden. Hierzu wurde der B2R wie in E.2.2.5.2 beschrieben, transient überexprimiert und die erhaltenen Ergebnisse mit denen des endogenen B2R verglichen. Zudem wurde der Bradykinin B1 Rezeptor, der in HEK-293-Zellen endogen nicht nennenswert exprimiert wird, transient in GRK-HEK-293-Zellen transfiziert. Eine Besonderheit des B1 Rezeptors, die bereits in der Einleitung unter C.1.1 dargestellt wurde ist, dass er sehr wahrscheinlich nicht phosphoryliert wird (Leeb-Lundberg et al., 2001). Daher sollte er sich besonders eignen, um eine mögliche Kinase-unabhängige GRK-Regulation des Calciumsignals zu detektieren, wie es für die GRK2-Familie beim endogenen B2R gezeigt werden konnte. Die erfolgreiche Rezeptorüberexpression wurde mittels FACS-Analyse geprüft, wie dies im Methodenteil unter E.2.3.5 erläutert wurde. Abbildung 26 B stellt die neuen Messergebnisse den bereits gezeigten endogenen B2R-Resultaten (Abbildung 26 A identisch mit Abbildung 25 B) gegenüber.

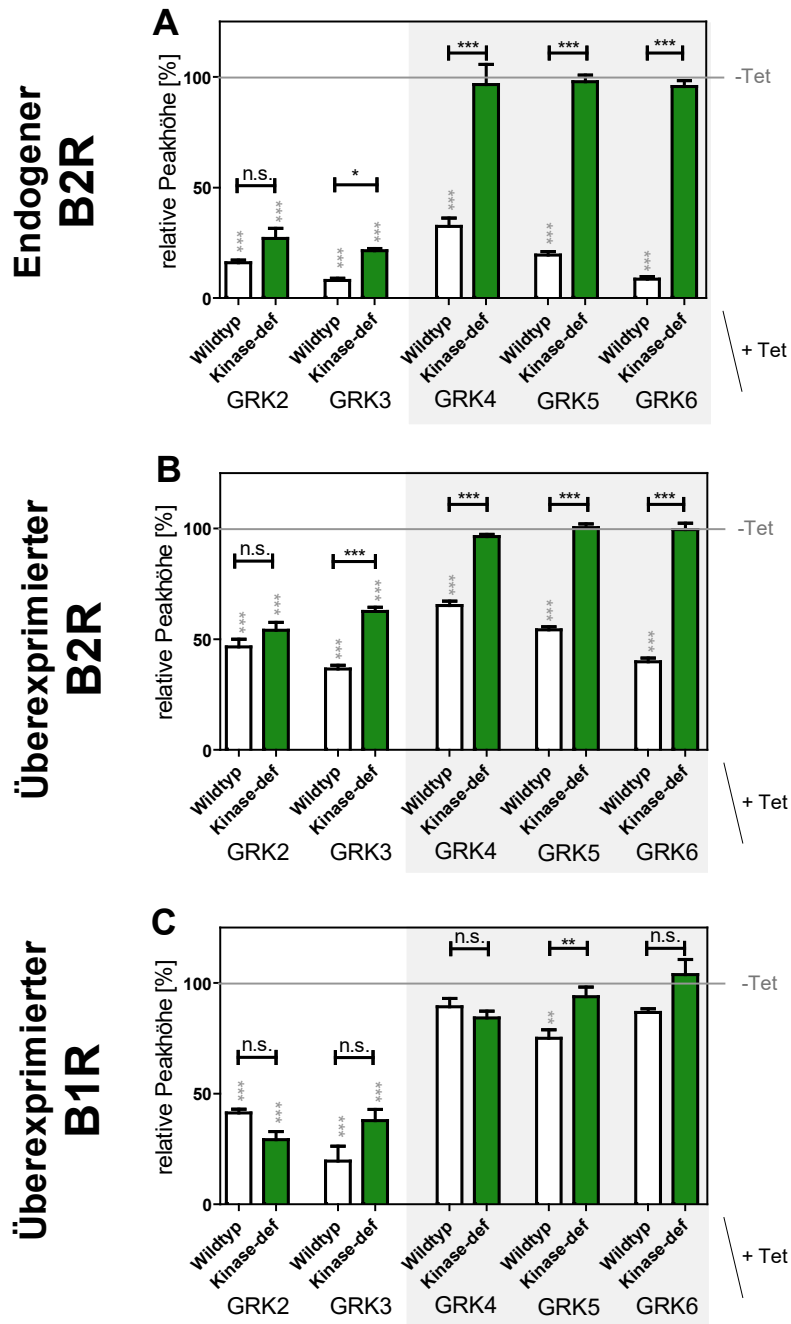


Abbildung 26: Vergleich endogener B2R und überexprimierter B1 und B2 Bradykininrezeptoren

Die Grafik stellt die Resultate des endogenen B2R (A) den überexprimierten B2R (B) und B1R (C) Messungen gegenüber. Die Ergebnisse des endogenen B2R wurden bereits in Abbildung 25 B dargestellt. GRK-HEK-293-Zellen wurden transient mit Bradykininrezeptoren transfiziert und die regulierbare GRK-Überexpression durch Tetracyclinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Kavitäten induziert. Die Rezeptoren wurden mittels 1 μ M BK (B2R) respektive 1 μ M DAK (B1R) stimuliert und die intrazelluläre Calciumkonzentration kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Duplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und dem Post-hoc Dunnett's Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen, vertikal gegenüber der Kontrolle (-Tet) (p-Werte: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Die Daten des B2R verdeutlichen, dass das Potenzial der überexprimierten GRKs zur Calciumsignalreduktion beim überexprimierten B2R deutlich schwächer ausgeprägt ist, als beim endogenen Rezeptor. Qualitativ betrachtet, blieb die Wirkung der einzelnen GRK-Wildtypen und Kinase-defizienten Mutanten jedoch vergleichbar. Für GRK2 war auch bei Überexpression des B2R die Kinasedomäne funktionell nicht von signifikanter Bedeutung. Im Gegensatz hierzu, führte bei GRK3 eine Deletion der Kinaseaktivität zu einer signifikanten Verminderung der GRK-Calciumsignalreduktion beim überexprimierten B2R. Auch die GRKs 4-6 zeigten bei Überexpression des B2R einen reduzierten Effekt auf das Calciumsignal, jedoch blieben die Ergebnisse proportional vergleichbar zu denen des endogenen B2R. So war die Stärke des GRK-Effekts vom GRK6 zum GRK4 Wildtyp hin abnehmend. Für die entsprechenden Kinase-defizienten Mutanten wurde auch beim überexprimierten B2R ein vollständiger Funktionsverlust beobachtet.

Die Ergebnisse des transient exprimierten B1R ergaben, dass sein Calciumsignal durch GRK2 und 3 in vergleichbarem Umfang wie bei B2R reguliert wurde. Gleiches zeigte sich auch bei den Kinase-defizienten Mutanten der GRK2 und 3. Die Regulation der GRKs war, wie schon für B2R beobachtet, auch bei B1R überwiegend Kinase-unabhängig. Im Fall von GRK2 war tendenziell sogar eine stärkere Reduktion des Calciumsignals durch die Kinase-defiziente GRK2 im Vergleich zum GRK2 Wildtyp zu messen.

Aus der GRK4-Familie konnte nur für den GRK5 Wildtyp eine signifikante Reduktion des Calciumsignals nach B1R-Aktivierung gemessen werden, die nach Inaktivierung der GRK-Kinasedomäne nicht mehr beobachtet wurde. Für die GRK4 und GRK6 Wildtypen sowie deren Kinase-defiziente Mutanten konnte kein Effekt beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der experimentelle Ansatz auch für die Untersuchung transient (über)exprimierte GPCRs angewendet werden kann. Quantitativ resultierten zwar geringere Effekte als bei endogen exprimierten Rezeptoren, qualitativ sollten sie jedoch vergleichbar bleiben.

Die Ergebnisse der GRK2-Familie deuten darauf hin, dass für die Regulation des Bradykininrezeptor-Calciumsignals weniger der GRK-Kinase-Domäne als vielmehr den $G\alpha_q$ - und $G\beta\gamma$ -bindenden GRK-Domänen Bedeutung zukommt. Über den konkreten Einfluss letztgenannter Domänen ist bisher jedoch wenig bekannt. Um den gewählten experimentellen Ansatz für die Untersuchung der funktionellen Relevanz der $G\alpha_q$ - und $G\beta\gamma$ -bindenden GRK-Domänen für das Calciumsignal der Bradykininrezeptoren im Konkreten und der GPCRs im Allgemeinen verwenden zu können, wurden entsprechende GRK2- und GRK3-Mutanten erzeugt.

F.1.4 Erzeugen von GRK-Mutanten ohne $G\alpha_q$ - oder $G\beta\gamma$ -Bindungsfähigkeit

Neben der Kinasedomäne bestehen die GRKs der GRK2-Familie aus einer N- und einer C-terminalen Domäne. Erstere ist in der Lage freie $G\alpha_q$ -Untereinheiten zu binden, zweite bindet freies $G\beta\gamma$. Für beide Domänen sind in der Literatur bereits Punktmutationen bekannt, die zu einem entsprechenden Funktionsverlust führen (Tabelle 12). Diese wurden in GRK2 und GRK3 eingebracht.

Bezeichnung	Literaturreferenz
R106A	Sterne-Marr et al. (2003)
R587Q	Carman et al. (2000)

Tabelle 12: Punktmutationen der GRK2-Familie

Neben singulären Punktmutationen wurden auch Doppelmutationen, ergo Mutationen von zwei der drei Funktionsdomänen im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen, um die Funktion und Interaktion der einzelnen Domänen noch besser zu charakterisieren. Das praktische Vorgehen bei der ortsspezifischen Mutagenese wurde im Abschnitt E.2.1.2 umfassend dargestellt. Abbildung 27 visualisiert die entsprechenden Sequenzausschnitte und Punktmutationen inklusive der bereits etablierten Mutation der Kinase-Domäne (in der Grafik grün hinterlegt).

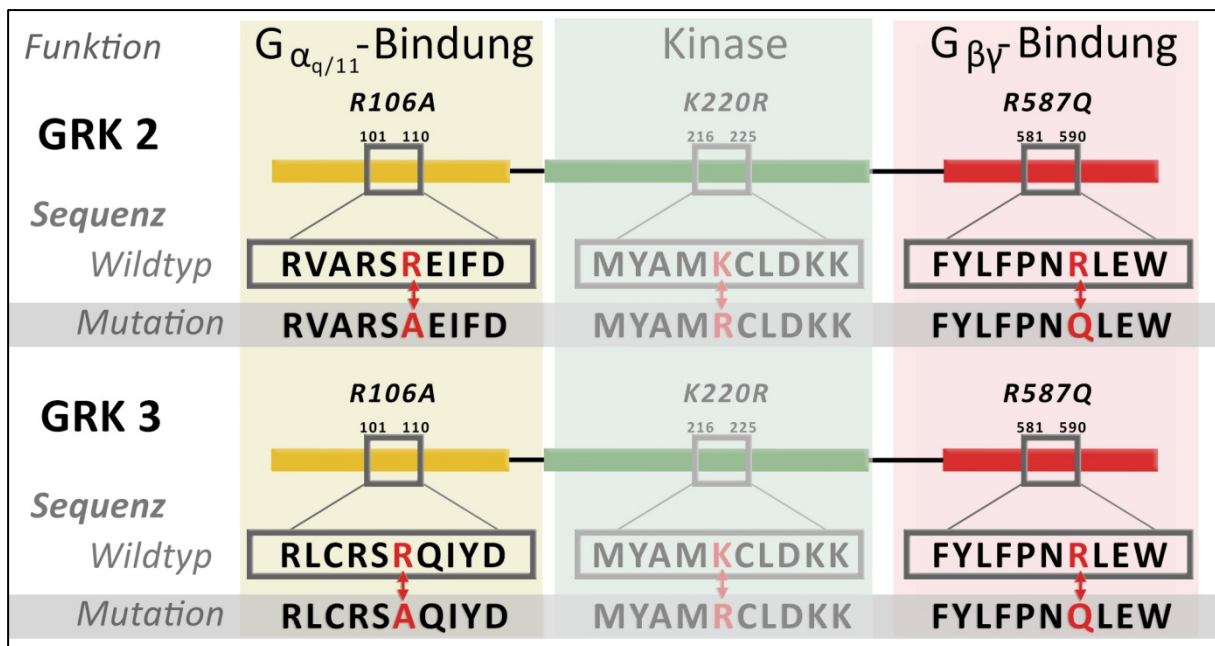


Abbildung 27: Illustration der GRK2/3-Punktmutationen

Die Grafik zeigt die Sequenzausschnitte in denen die Punktmutationen durchgeführt wurden. R106A bedeutet beispielsweise, dass an Aminosäuresequenzposition 106 ein Arginin (R) durch ein Alanin (A) ausgetauscht wurde, wodurch die GRK2/3 $G\alpha_q$ -bindende Domäne ihre Funktion verliert. Analoges gilt für die anderen Mutanten.

Die R106A Mutation führt dazu, dass die GRK nicht mehr in der Lage ist, $G\alpha_q$ zu binden. In den vorliegenden Ergebnissen wird sie daher als $G\alpha$ -defizient ($G\alpha$ -def) bezeichnet. Analog

folgt für R587Q die Bezeichnung $G\beta\gamma$ -defizient oder kurz *G $\beta\gamma$ -def*. GRKs die zwei Punktmutationen enthalten werden gemäß dieser Nomenklatur mit *G α + Kinase-def* bezeichnet, wenn sie weder in der Lage sind $G\alpha_q$ zu binden noch GPCRs zu phosphorylieren. Die vermutlich einzige verbleibende Funktion dieser GRK-Mutante ist die Möglichkeit zur Bindung von freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. Für *Kinase + G $\beta\gamma$ -def* hingegen gilt, dass diese GRK-Mutante freie $G\alpha_q$ -Untereinheiten binden, nicht aber phosphorylieren oder $G\beta\gamma$ -Untereinheiten binden kann.

Auch diese GRK-Mutanten wurden mittels Flp-In T-REx-Expressionssystem in HEK-293-Zellen stabil, induzierbar exprimiert. Die induzierbare Überexpression aller GRK-Mutanten wurde, wie oben beschrieben, mittels Western Blot überprüft.

F.1.5 Bedeutung der GRK $G\alpha_q$ - und $G\beta\gamma$ -Bindung für das Calciumsignal der beiden Bradykininrezeptoren

Die Bedeutung der beiden, die Kinase flankierenden Domänen der GRK2-Familie wurde analog zu den bereits durchgeführten Messungen ermittelt. Zunächst wurde der endogene B2R und nachfolgend der überexprimierte B1R respektive B2R betrachtet. Abbildung 28 zeigt links (A, C) beispielhaft kinetische Messkurven für den endogenen B2R und rechts die Auswertung aller Messungen (B, D).

Zum besseren Verständnis erfolgt eine einheitliche Farbcodierung aller Ergebnisse. Diese Kolorierung entspricht den drei Farben, die auch in Abbildung 27 für die GRK-Domänen genutzt werden. Im Balkendiagramm zeigt die Balkenfärbung die in dieser Messung mutierte GRK-Domäne. Ist der Balken beispielsweise gelb eingefärbt, so ist bei diesem Ergebnis die $G\alpha_q$ -bindende-GRK-Domäne mutiert, folglich liegt die R106A Mutation zu Grunde. Die Balken der Doppelmutanten werden konsistenterweise mit zwei Farben koloriert und die Ergebnisse für die Wildtyp GRKs sind weiß.

Die Fluoreszenzmesskurven (Abbildung 28; A, C) illustrieren, dass analog zu den GRK2- und GRK3-Wildtypen auch bei allen GRK2- und GRK3-Mutanten die Calciumkonzentration nach B2R-Aktivierung rasch anstieg. Das Maximum wurde weniger als 15 Sekunden nach Stimulation mit Bradykinin erreicht und die intrazelluläre Calciumkonzentration sank nachfolgend wieder auf Werte im Ausgangsbereich. Primärer Unterschied der einzelnen GRK-Mutantenkurven war die maximal erreichte intrazelluläre Calciumkonzentration. Auch bei allen nachfolgenden Messungen ergaben sich Unterschiede lediglich in der Ordinatenachse, welche die Fluoreszenzstärke und folglich indirekt die intrazelluläre Calciumkonzentration beschreibt. Daher wurde in der weiteren Ergebnisdarstellung auf Konzentrations-Zeit-Kurven verzichtet.

Endogener B2R

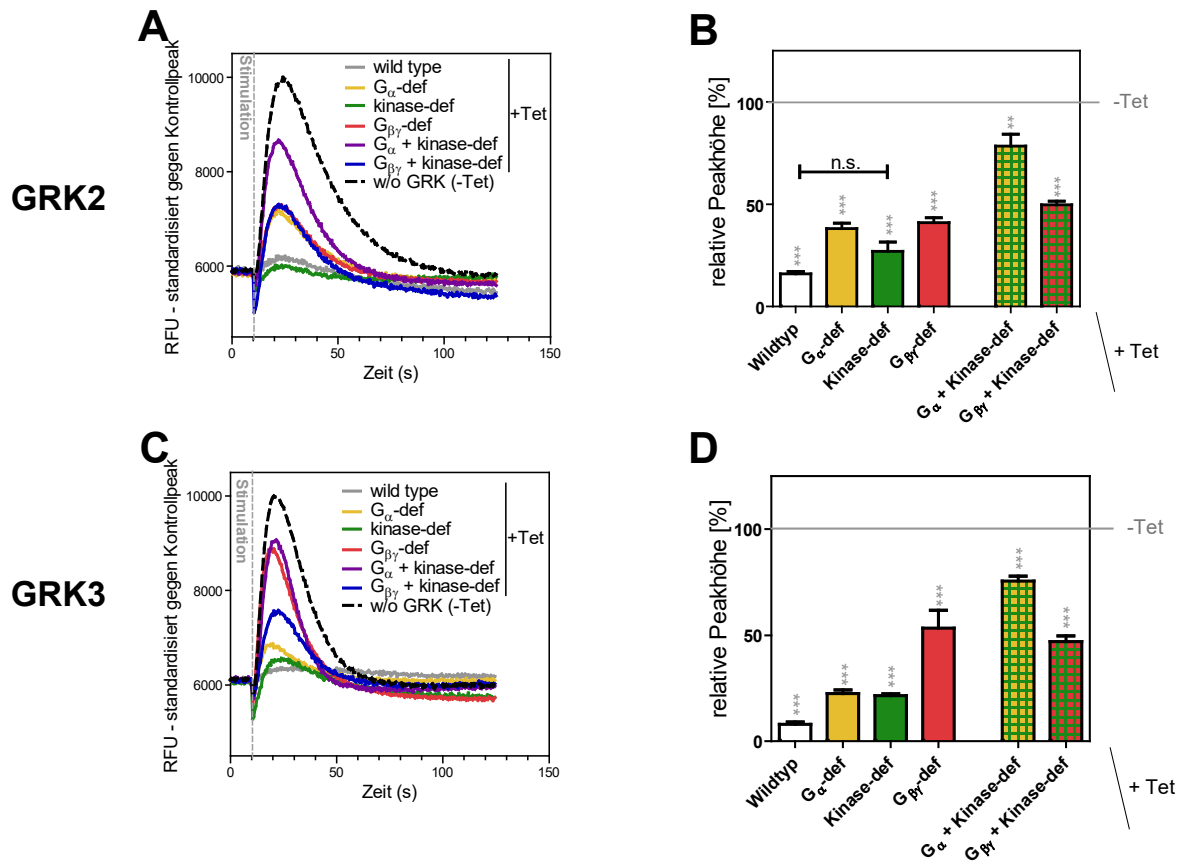


Abbildung 28: Einfluss der GRKs auf das endogene B2R Calciumsignal

In GRK-HEK-293-Zellen wurde die regulierbare GRK-Überexpression durch Tetrazyklinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Kavitäten induziert. Die Rezeptoren wurden mittels 1 μ M Bradykinin stimuliert und die intrazelluläre Calciumkonzentrationskinetik kontinuierlich aufgezeichnet. A und C zeigen exemplarisch die kinetischen Konzentrationskurven im Vergleich zur Kontrolle (-Tet), wobei eine Adaptation der Basalwerte zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte. Die Stimulation mit Bradykinin erfolgte nach 10 Sekunden. B und D zeigen Auswertungen der Maximalkonzentrationen (Peaks) prozentual zur jeweiligen Kontrollmessung.

Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und dem Post-hoc Dunnett's Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen, vertikal gegenüber der Kontrolle (-Tet). Horizontal wurde ausschließlich das Signifikanzniveau ($p > 0.05$) gekennzeichnet (p -Werte: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Die Auswertung der intrazellulären Calciummaximalkonzentration nach endogener B2R-Aktivierung (Abbildung 28; B, D) verdeutlicht die Unterschiede der einzelnen GRK2- und GRK3-Mutanten zum entsprechenden Wildtyp und zur nicht-induzierten Kontrolle (-Tet). Generell vermitteln die GRK2-Daten das Bild, dass keine der drei GRK2-Domänen alleine die GRK-Funktion entscheidend prägt. Jedoch zeigen sie, dass sowohl die $G\alpha_q$ -Bindungsfähigkeit als auch die Bindung von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten von signifikanter Bedeutung für die GRK-Gesamtfunktion sind. Wie bereits oben erwähnt, wies die Kinase-defiziente GRK2 keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf. Für die GRK2-Doppelmutante

hingegen, welche weder $G\alpha_q$ -binden noch GPCRs phosphorylieren konnte, wurde ein starker Funktionsverlust detektiert. Im Gegensatz dazu, zeigte die andere GRK2-Doppelmutante lediglich einen marginal größeren Funktionsverlust, als die $G\beta\gamma$ -bindungsdefiziente GRK-Mutante alleine. Bei GRK3 führte die Deletion der Kinaseaktivität zu einem geringen, aber signifikanten Effekt, einzig die Mutation der $G\beta\gamma$ -Bindedomäne alleine hatte einen deutlichen Effekt. Für die Doppelmutanten der GRK3 galt analoges, was für die GRK2-Doppelmutanten beobachtet werden konnte.

Abbildung 29 stellt die Ergebnisse der beiden (über)exprimierten Bradykininrezeptoren gegenüber.

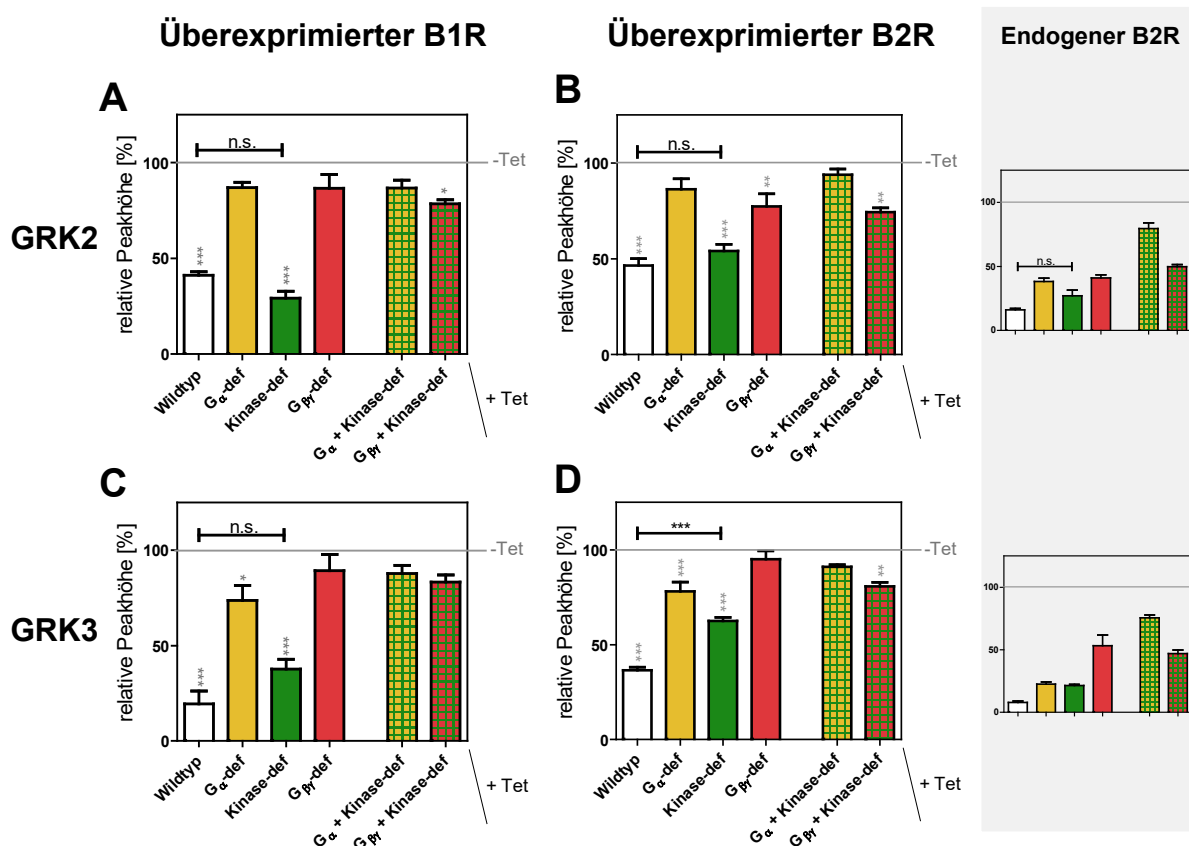


Abbildung 29: Bradykininrezeptor-induziertes Calciumsignal in Abhängigkeit der GRKs

GRK-HEK-293-Zellen wurden transient mit Bradykininrezeptoren transfiziert und die regulierbare GRK-Überexpression durch Tetrazyklinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Kavitäten induziert. Die Rezeptoren wurden mittels 1 μ M BK (B2R) respektive 1 μ M DAK (B1R) stimuliert und die intrazelluläre Calciumkonzentration kontinuierlich aufgezeichnet. Der grau hinterlegte Bereich zeigt nochmals die Daten des endogenen B2R (Details in Abbildung 28) als Vergleich.

Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und dem Post-hoc Dunnett's Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen, vertikal gegenüber der Kontrolle (-Tet). Horizontal wurden nur ausgewählte Signifikanzniveaus angegeben. Keine Angabe ist vertikal mit einem nicht signifikanten Ergebnis gleichzusetzen (p-Werte: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Im Vergleich zu den Ergebnissen des endogenen B2R waren Unterschiede zwischen den Effekten der verschiedenen GRK2- und GRK3-Mutanten bei den (über)exprimierten Bradykininrezeptoren deutlicher auszumachen. Während die Ausschaltung der Kinaseaktivität, mit Ausnahme eines gewissen Effekts für die GRK3 bei B2R, keinen Effekt zeigte, führte die Mutation der $G\alpha_q$ - oder der $G\beta\gamma$ -bindenden GRK-Domäne zu einem beinahe vollständigen Funktionsverlust der GRK-Mutanten und Doppelmutanten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Untersuchungen mit Bradykininrezeptoren darauf hin, dass der Einfluss der GRK2 und 3 auf die intrazelluläre Calciumausschüttung nach Rezeptoraktivierung primär durch die beiden GRK-Funktionsdomänen reguliert wird, die zur Bindung der G-Protein Untereinheiten wichtig sind. Die für GRK namensgebende Kinase-Funktion war bei B2R nur teilweise und bei B1R nicht von Bedeutung.

F.1.6 Bedeutung der GRK-Domänen für das Calciumsignal endogener Protease-aktivierter Rezeptoren

Um zu untersuchen, ob die beschriebenen Effekte – vor allem bezüglich der $G\alpha_q$ -bindenden Domäne von GRK2 und 3 – speziell für Bradykininrezeptoren gelten oder auch auf andere $G\alpha_q$ -gekoppelte GPCRs übertragbar sind, wurden entsprechende Messungen mit den Protease-aktivierten Rezeptoren PAR1 und PAR2 durchgeführt. Diese Rezeptoren werden endogen in HEK-293-Zellen exprimiert und gehören wie die Bradykininrezeptoren zur Gruppe der $G\alpha_q$ -vermittelten GPCRs. Wie in der Einleitung ausgeführt, weisen PARs jedoch auf Grund ihrer irreversiblen Aktivierung durch limitierte Proteolyse wahrscheinlich deutlich divergente Signalterminationsmechanismen auf.

Bei den Messungen der endogenen PARs konnten die Wildtyp GRK2 und GRK3 das Rezeptor-induzierte Calciumsignal in vergleichbarem Verhältnis reduzieren, wie beim endogenen B2R (Abbildung 30). Die weiteren Messungen zeigten jedoch auch erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Protease-aktivierten Rezeptoren im Vergleich zu den Ergebnissen der Bradykininrezeptoren. So war die GRK-Bindung des freien $G\alpha_q$ -Proteins für das PAR1-vermittelte Calciumsignal von großer Bedeutung, für PAR2 jedoch kaum. Ein Funktionsverlust von über 50% im Vergleich zum GRK-Wildtyp ließ sich bei beiden PARs für die Kinase-defiziente GRK-Mutante ermitteln. Bei PAR1 führte die Mutation der GRK2-Kinasedomäne sogar zum vollständigen Verlust der GRK-Funktionalität. Übereinstimmend mit den Ergebnissen für die Bradykininrezeptoren, zeigten auch die PAR-Messungen bei Mutation der C-terminalen $G\beta\gamma$ -Bindung einen fast vollständigen Verlust der GRK2 und GRK3-Funktionalität. Für die GRK-Doppelmutanten konnte, analog zu den Effekten die bereits beim endogenen B2R gezeigt wurden, insbesondere beim PAR2 ein synergistischer Effekt für die $G\alpha_q$ - und Kinase-defizienten GRKs nachgewiesen werden. Aber auch bei PAR1

waren entsprechende Tendenzen erkennbar. Für die Kinase- und G $\beta\gamma$ -defizienten Doppelmutanten waren die Zusatzeffekte sowohl für PAR1 als auch PAR2 im Vergleich zur G $\beta\gamma$ -defizienten GRK eher marginal.

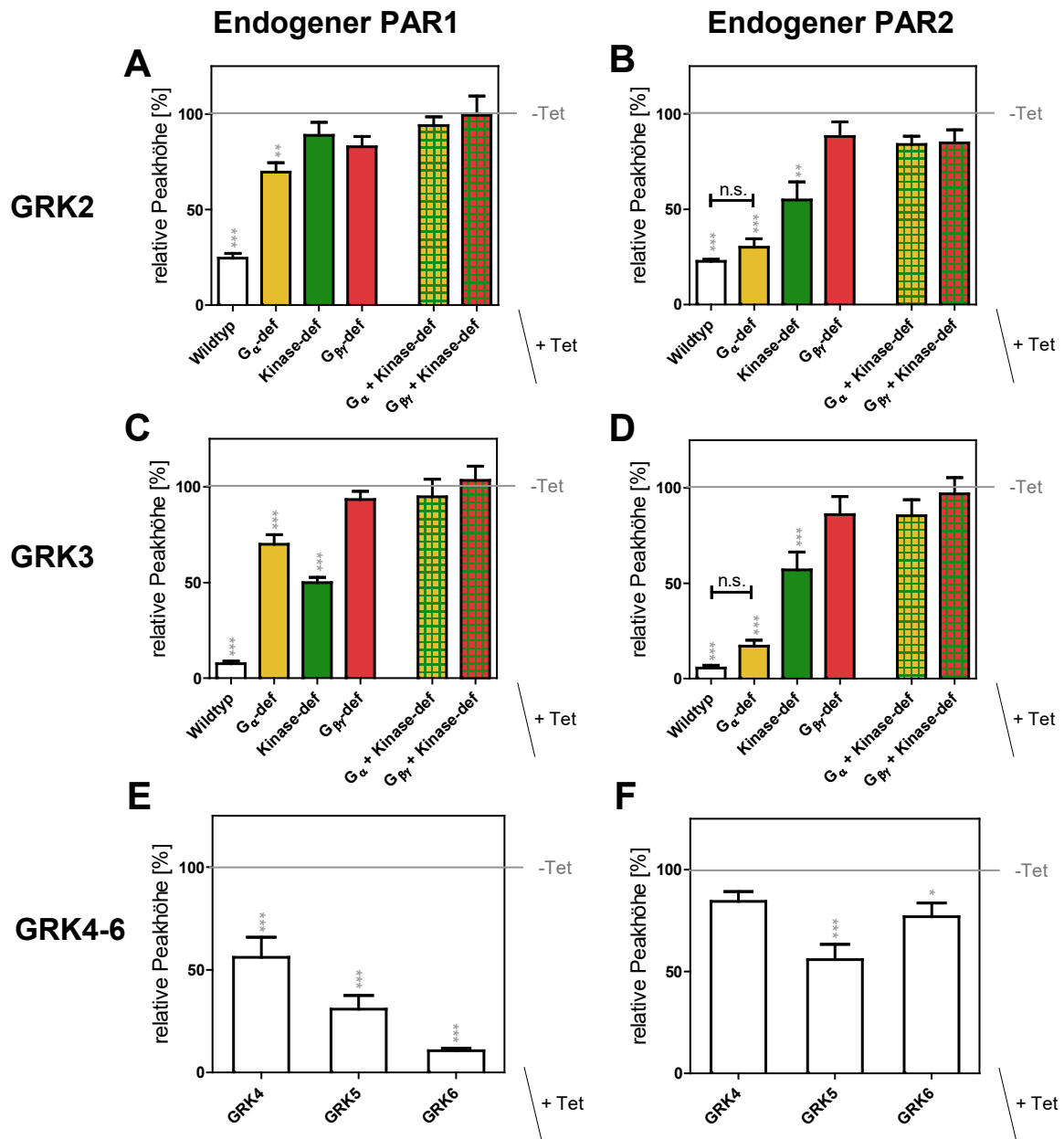


Abbildung 30: PAR-induziertes Calciumsignal in Abhängigkeit der GRKs

In GRK-HEK-293-Zellen wurde die regulierbare GRK-Überexpression durch Tetrazyklinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Kavitäten induziert. Die Rezeptoren wurden mittels 10 μ M TFLLR-NH₂ (PAR1) respektive 1 μ M 2-Furoyl-LIGRLO-NH₂ (PAR2) stimuliert und die intrazelluläre Calciumkonzentrationskinetik aufgezeichnet.

Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und Post-hoc Dunnett's Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen, vertikal gegenüber der Kontrolle (-Tet). Horizontal wurden nur ausgewählte Signifikanzniveaus angegeben. Keine Angabe ist vertikal mit einem nicht signifikanten Ergebnis gleichzusetzen (p-Werte: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Zusammenfassend verdeutlichen die Messungen der PARs im Vergleich mit den Bradykininrezeptoren, dass die für einzelne GPCRs identifizierte Bedeutung der GRK-Funktionsdomänen nicht generalisierbar scheint.

F.2 Bedeutung der GRK2-Domänen für die Regulation des p-ERK1/2-Signals

Um zu eruieren, ob die gezeigten Effekte der GRKs und ihrer Mutanten auf den *second messenger* Calcium limitiert sind oder GRKs auch nachfolgende zelluläre Regulatoren beeinflussen, wurde exemplarisch die Regulation des p-ERK1/2-Signals (*phosphorylierte Extracellular-signal Regulated Kinase1/2*) durch GRK2 und 3 untersucht.

Hierzu wurden die gleichen HEK-293-Zelllinien mit Tetrazyklin-induzierbarer GRK und transient transfizierten Bradykininrezeptoren genutzt, wie bereits für die Calciummessungen beschrieben. Die G_{α_q} -vermittelten Rezeptoren wurden überexprimiert, um ein größtmögliches Calcium- und daraus resultierendes p-ERK1/2-Signal zu generieren. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass im *AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 Assay* ein ausreichend starkes p-ERK1/2 Signal detektiert werden konnte. Das genaue Vorgehen wurde im Methodenteil unter E.2.3.6.1 umfassend erläutert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 zusammengefasst.

Für den Bradykinin B1 Rezeptor zeigten beide GRK Wildtypen in Bezug auf die Reduktion des p-ERK1/2 nach Rezeptoraktivierung vergleichbare Ergebnisse, wie sie auch für das Calciumsignal identifiziert werden konnten. Insgesamt waren die prozentualen Effekte durch die entsprechenden GRKs und ihre Mutanten jedoch stärker ausgeprägt. Die Kinase-defiziente GRK2 zeigte keine signifikante Abweichung von der Wildtypvariante, bei GRK3 war die Signifikanz knapp gegeben ($p=0.044$). Dies deutet darauf hin, dass die Kinasefunktion der GRK für den B1R sowohl für die Beeinflussung des Calciumsignals, als auch nachgeschaltet bei p-ERK1/2 wenig bis keinen Einfluss hat.

Für den Bradykinin B2 Rezeptor waren die Effekte der GRK-Mutanten in Relation zum entsprechenden Wildtyp eher gering ausgeprägt. Bei GRK2 war einzig die Kinase-defiziente Mutante signifikant unterschiedlich und dies auch im zweiseitigen t-Test, im Sinne eines Funktionszuwachses (*gain of function*). Bei GRK3 war, im Unterschied zu den Calciummessungen, die G_{α} -Bindungsfähigkeit für das p-ERK1/2-Signal nicht von Relevanz. Unterschiede zeigten sich bei der $G_{\beta\gamma}$ -defizienten GRK3-Mutante, da durch diese für beide Rezeptoren kein vollständiger Funktionsverlust erreicht wurde.

Insgesamt erscheinen die Ergebnisse der p-ERK1/2 Messung im Vergleich zu den initial bestimmten *second messenger* Daten unspezifischer in Bezug auf die Beurteilung einzelner GRK-Domänen. Daher wurde eine umfassende Untersuchung des GRK-Einflusses auf des p-ERK1/2-Signal aufgrund limitierter Ressourcen zurückgestellt.

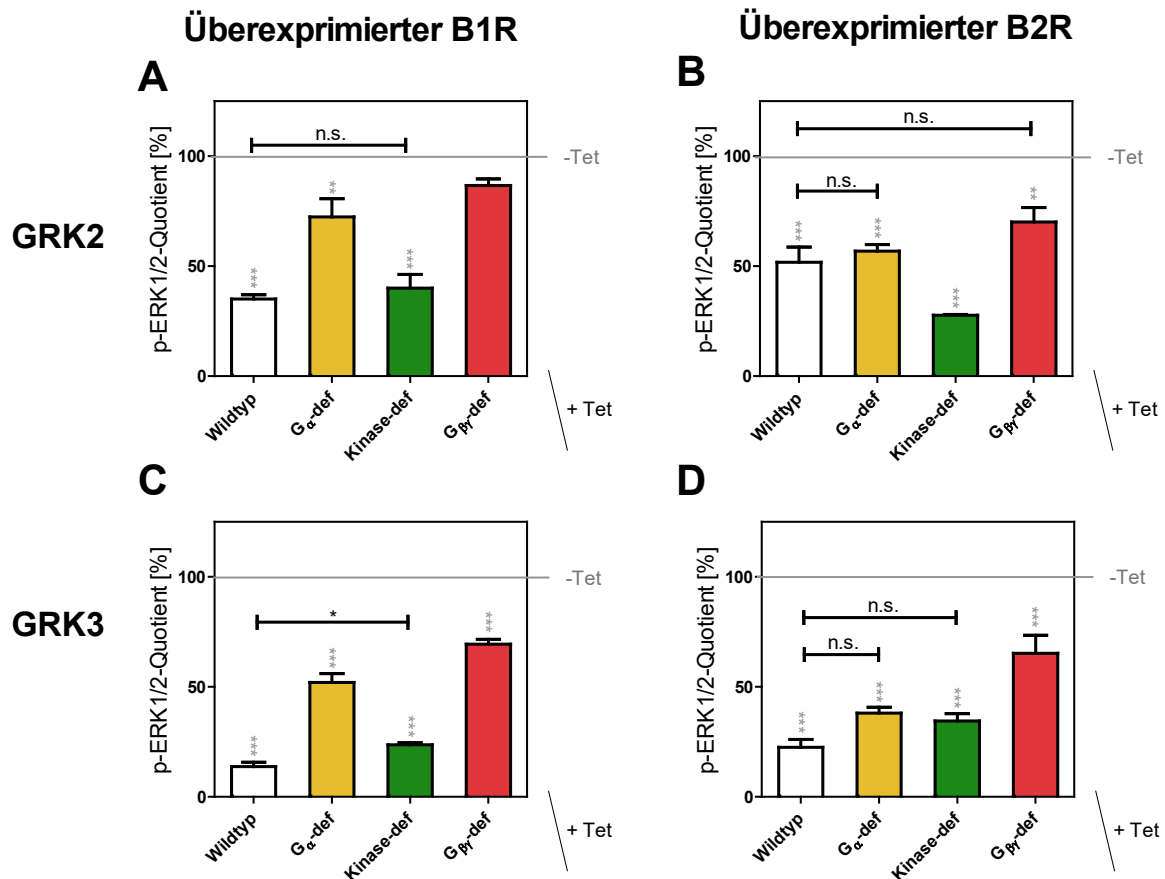


Abbildung 31: GRK-abhängige Regulation des Bradykininrezeptor p-ERK1/2-Signals

GRK-HEK-293-Zellen wurden transient mit Bradykininrezeptoren transfiziert und die regulierbare GRK-Überexpression durch Tetrazyklinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Kavitäten induziert. Die Rezeptoren wurden für 5 Minuten mit 1 μ M BK (B2R) respektive 1 μ M DAK (B1R) stimuliert, gefolgt von sofortiger Zelllyse und Messung von p-ERK1/2.

Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und dem Post-hoc Dunnett's Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen, vertikal gegenüber der Kontrolle (-Tet). Horizontal wurden nur ausgewählte Signifikanzniveaus angegeben. Keine Angabe ist vertikal mit einem nicht signifikanten Ergebnis gleichzusetzen (p-Werte: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

F.3 Bedeutung der GRKs für die β -Arrestin-GPCR-Rekrutierung

Gemäß dem Modell der homologen Desensibilisierung folgt der GPCR-Aktivierung die Rekrutierung von GRKs oder anderen Kinasen, welche den Rezeptor phosphorylieren und dadurch die β -Arrestin-Rezeptorbindung steigern. Folglich wäre zu erwarten, dass eine Überexpression der GRKs zu einer gesteigerten Rezeptorphosphorylierung und damit zu einer gesteigerten Arrestinrekrutierung führen sollte.

Um dieses Konzept zu evaluieren und die tatsächliche funktionelle Bedeutung der verschiedenen GRKs für die β -Arrestinrekrutierung zu bestimmen, wurde der GRK-Einfluss auf die Rezeptorinteraktion mit den β -Arrestinen mittels Biolumineszenz-

Resonanzenergietransfer (BRET) untersucht. Exemplarisch wurde hierfür der Bradykinin B2 Rezeptor ausgewählt.

Konkret wurde für die BRET-Messung ein B2R erzeugt, der C-terminal mit der Luciferase RLucII fusioniert worden war. Das zu untersuchende β -Arrestin 1 oder β -Arrestin 2 wurde N-terminal mit eYFP fusioniert. Anschließend erfolgte die transiente Transfektion jeweils eines Rezeptors und eines β -Arrestins in tetrazyklin-induzierbare GRK-HEK-293-Zellen. Das exakte experimentelle Vorgehen wurde unter E.2.2.7 erläutert.

Neben dem B2R Wildtyp wurde eine Rezeptormutante eingesetzt, bei der drei Serine im C-Terminus zu Alaninen punktmuiert (S->A B2R) worden waren. Das Vorgehen zur Erzeugung der Rezeptorpunktmutationen entspricht dem für die GRK-Mutanten in E.2.1.2 erläuterten. Bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass diese Mutante nicht mehr phosphoryliert wird, obwohl noch zwei Threonine (T342, T345) als potenzielle Substrate für Kinasen vorhanden wären (Abbildung 32). Somit ist diese B2R-Mutante geeignet, die Bedeutung der Phosphorylierung bei der B2R- β -Arrestin-Interaktion noch spezifischer zu eruieren.

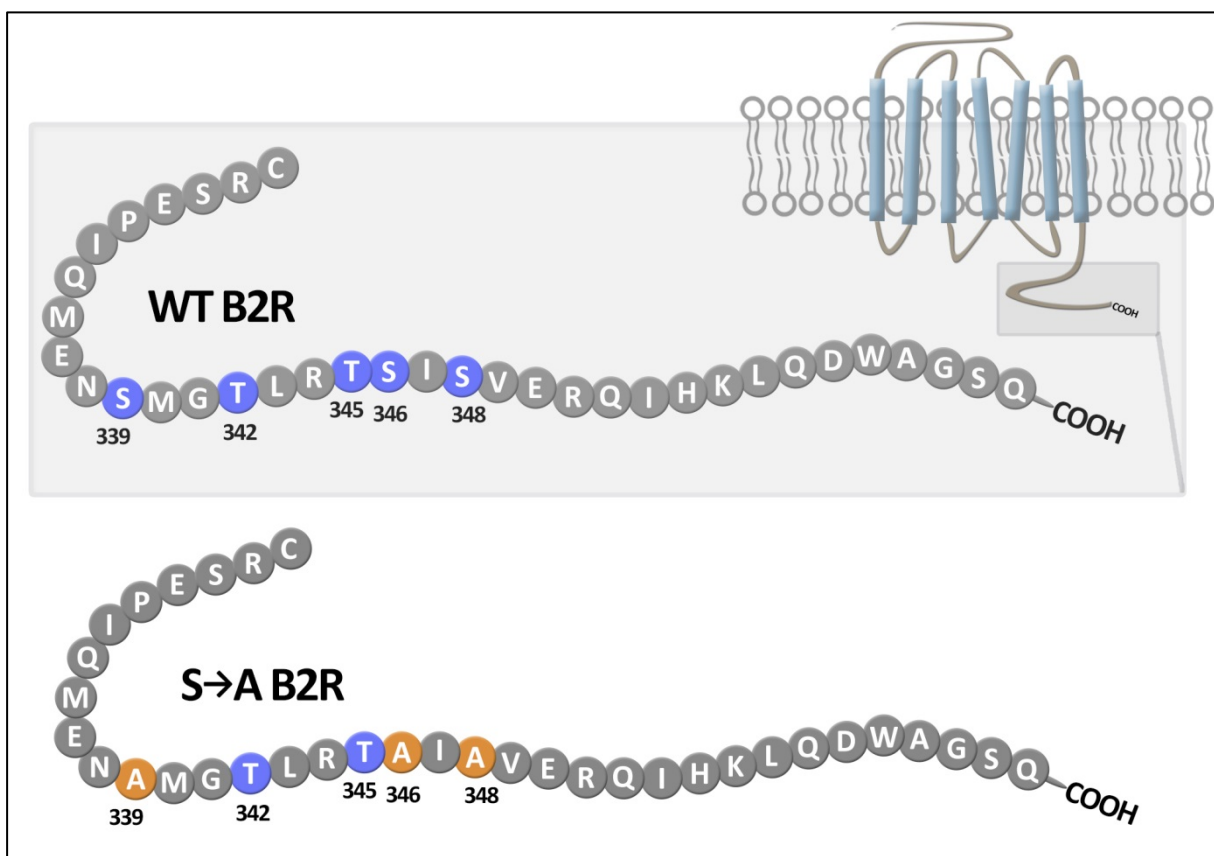


Abbildung 32: Sequenz des B2R C-Terminus und der S->A B2R Mutante

Schematische Darstellung der C-terminalen Sequenz des B2R Wildtyps (WT B2R) unter Markierung der drei Serine (S) die in der S->A B2R zu Alaninen (A) punktmuiert wurden.

Die Ergebnisse der BRET-Messungen in Abbildung 33 zeigen, dass eine Induktion der GRKs weder für β -Arrestin 1 noch für β -Arrestin 2 zu einem verstärkten BRET-Signal führte. Die Induktion der GRK6 resultierte bei beiden β -Arrestinen jedoch in einer deutlichen Reduktion des BRET-Signals, was generell eher auf eine verminderte Interaktion hinweisen würde. Darüber hinaus, war auch eine signifikante Abschwächung des BRET-Signals für β -Arrestin 2 nach Induktion von GRK3 und GRK4 zu beobachten. Die Tatsache, dass diese reduzierenden Effekte bei der C-terminal nicht-phosphorylierbaren B2R-Mutante S->A nicht zu beobachten waren, spricht dafür, dass die Abnahme des BRET-Signals vor allem nach Induktion der GRK6 tatsächlich mit der Phosphorylierung des B2R C-Terminus zu erklären ist. Als weiteren Beleg hierfür können Messungen mit den Kinase-defizienten Mutanten der GRK4-Familie gelten, die keinerlei Effekt auf das BRET-Signal hatten.

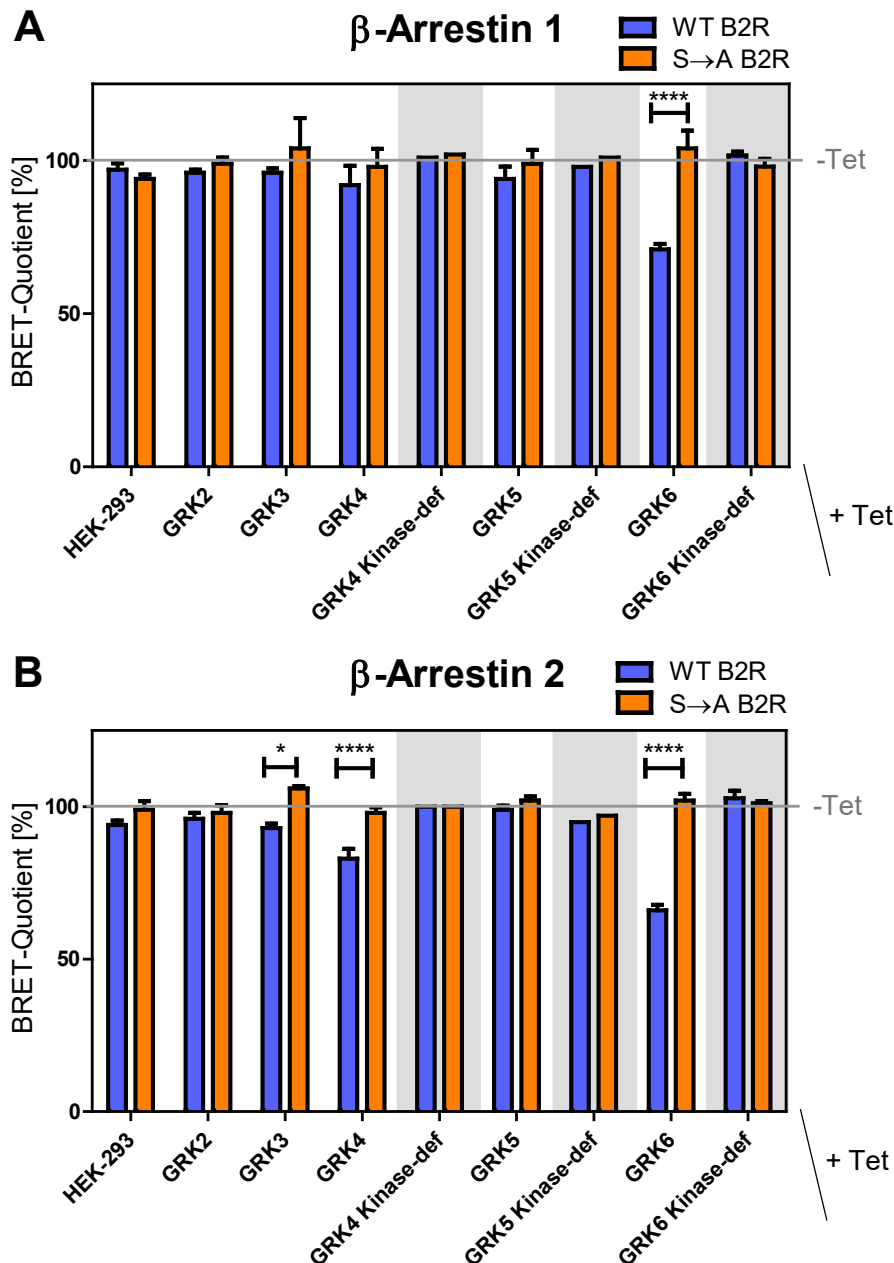


Abbildung 33: Arrestin-BRET-Signal in Abhängigkeit der GRKs und des B2R

GRK-HEK-293-Zellen wurden transient mit RLucII-fusioniertem B2R oder S->A B2R sowie eYFP-fusioniertem β -Arrestin 1 oder β -Arrestin 2 transfiziert. Die regulierbare GRK-Überexpression wurde durch Tetrazyklinzugabe (+Tet) in der Hälfte der Kavitäten induziert. Nach 48h Induktion wurde CTZ-H (15 μ M) zugegeben und der B2R mit 1 μ M BK stimuliert. Bei 23°C wurde das BRET-Signal bestimmt. HEK-293 entspricht der nicht mit GRK-transfizierten HEK-293-Ausgangszelllinie und dient als Referenzmessung. Grau hinterlegt sind die Daten der Kinase-defizienten Mutanten, welche teilweise nur einmalig bestimmt wurden. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test. Horizontal ist die statistische Analyse gegenüber dem jeweiligen Wildtyp aufgetragen, vertikal gegenüber der Kontrolle (-Tet). Keine Signifikanzangabe ist mit einem nicht signifikanten Ergebnis gleichzusetzen (p-Werte: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

G Diskussion

G.1 Einfluss von GRKs auf das GPCR-Calciumsignal

Als zentrale Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen (GRKs) galt bisher die Abschaltung des GPCR-Signals. Gemäß dem Modell der homologen Desensibilisierung erzielen GRKs ihre Wirkung primär durch die Phosphorylierung aktiver, also Agonisten-besetzter GPCRs. Die Phosphorylierung resultiert in einer hochaffinen Bindung von β -Arrestine an den Rezeptor (Lohse et al., 1990). Diese Arrestin-Rezeptor-Bindung blockiert weitere Interaktionen des GPCRs mit G-Proteinen sterisch und resultiert dadurch in einer intrazellulären Signalreduktion (V. V. Gurevich et al., 2019b). Inzwischen ist bekannt, dass Arrestine auch als Gerüstproteine für die Bildung von Proteinkomplexen verschiedener Signalkaskaden dienen und somit wesentlich für die Aktivierung von intrazellulären Regulatoren, wie beispielsweise ERK1/2 mitverantwortlich sein können (V. V. Gurevich et al., 2019a). Ein Aspekt, der die Signalregulation nach Rezeptorstimulation mitbeeinflussen könnte, ist die in den letzten Jahren viel diskutierte „Barcode“-Hypothese. Gemäß selbiger resultieren unterschiedliche Rezeptorphosphorylierungsmuster in Abhängigkeit von der Aktivität einzelner GRKs, die sodann die Rekrutierung und Aktivität der β -Arrestine beeinflussen (Nobles et al., 2011). Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass, außerhalb von Retinazellen, nur fünf GRKs (GRK2-6) für die Regulation von über 800 G-Protein gekoppelten Rezeptoren zur Verfügung stehen (E. V. Gurevich et al., 2012).

Das vorgestellte Modell der β -Arrestinrekrutierung nach GPCR-Phosphorylierung durch GRKs beruht überwiegend auf Untersuchungen am 11-*cis*-Retinal-vermittelten Rhodopsin (Wilden, Hall, et al., 1986) und $G\alpha_s$ -vermittelten β_2 -adrenergen Rezeptor (Komolov et al., 2018). Auch andere wissenschaftliche Arbeiten befassten sich nur mit der Interaktion einer bestimmten GRK mit einem einzigen GPCR und sind methodisch sehr heterogen. Jedoch weisen Untersuchungen, beispielsweise am Histamin H1 Rezeptor oder M3-Acetylcholin-Rezeptor für GRK2 und 3 eine Kinase-unabhängige GRK-Funktion ohne Phosphorylierung des GPCRs nach (Iwata et al., 2005; Luo et al., 2008).

Ob diese Kinase-unabhängigen GRK-Effekte Einzelfälle darstellen und welche Bedeutung den anderen GRK-Domänen bei der GPCR-Signalregulation zuteil wird, ist bisher unzureichend untersucht.

Fokus dieser Arbeit ist es, die Bedeutung verschiedener GRK-Domänen für die Signalregulation unterschiedlicher GPCRs zu quantifizieren und hierdurch das Verständnis über die GRK-Signalregulation zu ergänzen.

Vor diesem Hintergrund galt es zu Beginn ein reliables Messverfahren zu etablieren, das für verschiedene GPCRs die funktionelle Bedeutung der fünf nicht-visuellen GRKs 2-6 und ihrer

einzelnen Domänen quantifizierbar und komparabel macht. Wie bereits erwähnt, konnten Kinaseaktivitäts-unabhängig GRK-Effekte für das Signal einiger $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren gezeigt werden (Luo et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Willets et al., 2004). In dieser Arbeit wurden daher schwerpunktmäßig $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren betrachtet.

G.1.1 Etablierung eines Messverfahrens zur Quantifizierung der GRK-Funktion

Die zu untersuchenden $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren führen über eine $G\alpha_q$ -Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (PLC β) zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und folglich zum intrazellulären Anstieg des *second messengers* Calcium (Raffaello et al., 2016; Sterne-Marr et al., 2003). Eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration lässt sich mittels Fluoreszenzmessungen reliabel quantifizieren. Zur Bestimmung des GRK-Einflusses wurde folglich das Reduktionspotenzial der GRKs in Bezug auf das intrazelluläre Calciumsignal nach GPCR-Aktivierung gemessen. Um eine isolierte Betrachtung der Effekte einzelner GRKs und ihrer Mutanten gewährleisten zu können, erfolgte eine GRK-Überexpression.

Die Auswirkung einer GRK-Überexpression wurde für das Calciumsignal ausgewählter $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren bereits in einzelnen Studien untersucht. Verglichen wurde dabei die Calciumfreisetzung zwischen Kontrollzellen und Zellen mit GRK-Überexpression. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte oder mit leerem-Plasmid transfizierte, sogenannte Mock-Zellen, eingesetzt. Die GRK-Überexpression erfolgte entweder transient, mit vorübergehender, oder stabil, mit dauerhafter Integration und Aktivität an einem zufälligen Ort im Genom (Koller, 2012; Luo et al., 2008). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist bei solchen experimentellen Ansätzen stark limitiert. Erstens, da die Transfektionseffizienz und die Expressionsstärke der GRKs bei den einzelnen Experimenten, wie auch für die verschiedenen GRKs, stark schwanken. Zweitens, da sich die GRK-Expression durch Maßnahmen, wie Western Blots, nur semiquantitativ und meist nicht für jedes einzelne Experiment kontrollieren lassen.

Zur Etablierung eines Verfahrens für die vorliegende Arbeit wurde das Flp-In T-REx-System der Firma Invitrogen genutzt. Dieses garantiert eine stabile Integration der GOI (*gene of interest*)-Sequenz an einer für alle Zellen identischen Stelle im Genom. Diese sogenannte isogene Expression sollte bereits zu einer deutlich verbesserten Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen, da sie sicherstellt, dass alle GRKs gleich stark exprimiert werden. Wie oben beschrieben, sind bisherige Ansätze durch einen von Zelle zu Zelle divergierenden Integrationsort der GRKs charakterisiert, wobei die Position im Genom häufig einen starken Einfluss auf die Expressionsstärke hat.

Neben einer isogenen Expression ist auch die Kontrollzelllinie essentiell für die bestmögliche Vergleichbarkeit der Experimente. In den verwendeten HEK-293-Zellen (Flp-In-TREx-HEK-

293-Zellen) bot die Tetrazyklin-Induzierbarkeit der GRK-Überexpression den direkten Vergleich zwischen Zellen mit und ohne GRK-Überexpression innerhalb einer Zellkohorte ohne weitere Störvariablen. Zwar zeigt der exemplarisch in Abbildung 24 dargestellte Western Blot, dass im nicht-induzierten Zustand die Expression der GRK-Konstrukte in dieser Arbeit tendenziell stärker war, als die der endogenen Wildtypen, jedoch kam es durch Tetrazyklinzugabe zu einer deutlichen Hochregulation der GRK-Expression.

Bezüglich der Unterschiede zwischen den untersuchten endogenen und überexprimierten Rezeptoren lässt sich folgendes festhalten: Das Calciumsignal des transient überexprimierten Bradykinin B2 Rezeptors (B2R) konnte zwar im Vergleich zum endogen exprimierten B2R durch GRKs deutlich weniger reduziert werden, die Ergebnisse jedoch blieben qualitativ überwiegend vergleichbar (Abbildung 26). Der quantitative Unterschied war allerdings auch zu erwarten, da im Fall des endogenen B2R die stark überexprimierten GRKs auf eine deutlich geringere Rezeptorzahl trafen. Im Fall des transient überexprimierten B2R standen sowohl Rezeptor als auch GRK unter Kontrolle eines CMV-Promotors, der in einer starken Überexpression resultierte. Die quantitative Differenz zwischen Rezeptor und GRK fiel somit geringer aus, als dies beim endogenen B2R der Fall war.

Weiterhin ist anzumerken, dass in den meisten bisher durchgeführten Untersuchungen Messverfahren zur Bestimmung der Calciumkonzentration zum Einsatz kamen, die mittels Fura-2 die Fluoreszenzkinetik ermittelten (Koller, 2012; Luo et al., 2008). Entsprechende Fura-2 Protokolle erfordern jedoch wiederholtes Waschen der Zellen nach Farbstoffinkubation. Dies dient dazu überschüssigen extrazellulären Restfarbstoff vor der Messung zu entfernen, um das resultierende Hintergrundfluoreszenzsignal zu minimieren. Manipulationen durch den Waschschrift oder Fluoreszenzfarbstoffrückstände können bei derartigen Verfahren dennoch die Messung beeinflussen (Xin et al., 2007). Das in dieser Arbeit genutzte FLIPR Calcium 5 Assay Kit der Firma Molecular Devices vermeidet diese Problematik durch den Einsatz eines extrazellulären *Quenchers*, welcher potenzielle Hintergrundsignale durch extrazellulären Fluoreszenzfarbstoff maskiert und damit ein Waschen der Zellen nach Inkubation obsolet macht (Abbildung 18).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Messverfahren sehr gut geeignet ist, um die Wirkung von GRKs auf endogene aber auch auf transient überexprimierte GPCRs zu untersuchen. Im Vergleich zu allen bisherigen experimentellen Ansätzen bietet es ein hohes Maß an Standardisierung, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit. Dies belegt auch die Tatsache, dass es inzwischen erfolgreich für den endogenen $G\alpha_s$ -gekoppelten β_2 -adrenergen Rezeptor und den $G\alpha_i$ -gekoppelten CXCR4 Rezeptor eingesetzt wurde (unveröffentlichte Daten; M. Deininger, A. Faußner).

G.1.2 Vergleich des Einflusses der Wildtyp GRKs auf die untersuchten Rezeptoren

Vergleicht man den Effekt, den die Induktion einer der fünf Wildtyp GRKs auf das Calciumsignal der drei endogenen Rezeptoren B2R, PAR1 und PAR2 oder der transient überexprimierten Kininrezeptoren B1R sowie B2R hatte, so lassen sich deutliche Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten aufzeigen.

Die endogenen Rezeptoren B2R und PAR1 wurden von den fünf Wildtyp GRKs (wtGRK) fast identisch stark reguliert, auch der überexprimierte B2R zeigte eine vergleichbare Rangfolge, wenn auch schwächere Effekte. Für alle drei galt die Reihenfolge $\text{wtGRK3} = \text{wtGRK6} > \text{wtGRK2} = \text{wtGRK5} > \text{wtGRK4}$ (Abbildung 26, Abbildung 30). Während wtGRK2 und wtGRK3 auch beim endogenen PAR2 einen starken Effekt auf das Rezeptorcalciumsignal zeigten, war der Einfluss von wtGRK4-6 deutlich schwächer ausgeprägt. Es ergab sich für PAR2 die Rangfolge $\text{wtGRK3} > \text{wtGRK2} > \text{wtGRK5} > \text{wtGRK6}$. wtGRK4 zeigte keine signifikante Abweichung von der nicht-induzierten Kontrollmessung (Abbildung 30). Auch beim überexprimierten B1R spielten die wtGRK4 und 6 so gut wie keine Rolle, nur bei wtGRK5 lag das Calciumsignal signifikant unter dem ohne wtGRK5-Induktion (Abbildung 26). wtGRK2 und 3 hingegen hatten auch bei B1R einen starken Effekt.

Die Identifikation von Ursachen für die divergenten, wie konvergenten Effekte der wtGRKs ist aktuell nicht abschließend möglich. Unter anderem, da ein isolierter Vergleich der Rezeptorproteinsequenzen, ohne klare Konsensus-Sequenzen für die Wildtyp-GRKs, nicht zweckmäßig erscheint. Diskutiert wird jedoch ein Zusammenwirken von unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für verschiedene Liganden-GPCR-Konformationen, das sogenannte *biased signaling* sowie die Bindung und Phosphorylierung von verschiedenen Zielsequenzen des Rezeptors im Sinne der bereits weiter oben skizzierten „Barcode“-Hypothese (V. V. Gurevich et al., 2020). Dies könnte in einer rezeptortypischen und -spezifischen Regulation durch die jeweiligen GRKs resultieren.

G.1.3 Bedeutung der Kinaseaktivität für die Funktion der GRKs

G.1.3.1 Relevanz für die GRK2-Familie

Um die Bedeutung der GRK-Kinaseaktivität für GRK2 und 3 bei den genannten vier Rezeptoren zu evaluieren, wurde die GRK-Kinaseaktivität durch Punktmutation ausgeschaltet. Für den endogenen, wie den überexprimierten B2R ergab sich hierdurch nur eine geringe Abschwächung der Funktionalität, die für GRK2 nicht einmal signifikant war (Abbildung 26). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Untersuchungen von Koller (2012) für den endogenen, wie überexprimierten B2R in Standard-HEK-293-Zellen ohne Flp-In-TRex. Es kam sowohl bei GRK2 als auch deren Kinase-defizienter Mutante zu einer Reduktion des Calciumsignals, wobei in Kollers Arbeit der Unterschied zwischen beiden signifikant war. Seine Untersuchungen erlaubten allerdings, im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, keine

Induktion der GRK-Expression, sondern führten zu einer dauerhaften Überexpression der GRKs in den Zellen. Als Kontrolle wurden nicht transfizierten Zellen genutzt, was die divergenten Ergebnisse begründen könnte.

Auch beim Bradykinin B1 Rezeptor ließ sich für GRK2 und 3 kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Kinase-defizienten GRK-Mutante detektieren (Abbildung 26). Die Messungen bekräftigten somit, was in der Literatur bereits konstatiert wird: Der Rezeptor wird sehr wahrscheinlich nicht phosphoryliert (Leeb-Lundberg et al., 2001).

Dass die Kinaseaktivität von GRK2 und 3 nicht für alle Rezeptoren entbehrlich ist, illustrierten die, in dieser Arbeit erstmals umfassend bezüglich ihrer Calciumsignalregulation untersuchten, Protease-aktivierten Rezeptoren PAR1 und PAR2. Sowohl GRK2 als auch GRK3 wiesen signifikante funktionelle Einbußen von über 50% bei Mutation der entsprechenden Kinasedomäne auf. Besonders deutlich wurde dies beim PAR1 Rezeptor, wo für die Kinase-defiziente GRK2 ein beinahe vollständiger Funktionsverlust resultierte (Abbildung 30). Kongruent mit diesen Erkenntnissen sind Veröffentlichungen zum PAR1 und PAR2. Bei den Publikationen wurde jeweils der Rezeptor C-Terminus so modifiziert, dass dort keine Phosphorylierbarkeit mehr bestand. Für den so mutierten PAR1 Rezeptor konnte keine Calciumregulation mehr durch GRK3 gezeigt werden (Ishii et al., 1994). Übereinstimmend mit diesen Daten, führte auch die C-terminale Mutation des PAR2 Rezeptors zu einer reduzierten Desensibilisierbarkeit (Ricks et al., 2009).

Auch zu anderen $G\alpha_q$ -gekoppelten GPCRs gibt es in der wissenschaftlichen Literatur Untersuchungen, wobei überwiegend der Einfluss der GRK2 auf einzelne GPCRs betrachtet wurde. Beispielsweise konnte in Neuronen des Hippocampus beim muskarinergen M1-Acetylcholinrezeptor für GRK2 Wildtyp und Kinase-defiziente Mutante ein reduzierender Effekt auf das IP_3 -Signal nachgewiesen werden (Willets et al., 2004). Eine ebenfalls GRK2 Kinase-unabhängige IP_3 -Reduktion konnte für die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 in Standard-HEK-293-Zellen (mGluR1) respektive Striatumneuronen (mGluR5) gezeigt werden (Dhami et al., 2002; Ribeiro et al., 2009). Außerdem konnte für GRK2 und dessen Kinase-defiziente Mutante eine äquivalente Reduktion des intrazellulären Calciumsignals nach Aktivierung des endogenen muskarinergen M3-Acetylcholinrezeptors in Standard-HEK-293-Zellen gezeigt werden (Luo et al., 2008).

Anders verhielt es sich bei $G\alpha_i$ - und $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren, wie dem $G\alpha_i$ -gekoppelten muskarinergen M2-Acetylcholinrezeptor, wo eine Mutation der GRK2-Kinasefunktion in Standard-HEK-293-Zellen zur Halbierung der Rezeptordesensibilisierung führte (Pals-Rylandsdam et al., 1995). Auch beim $G\alpha_i$ -gekoppelten metabotropen Glutamatrezeptor 3 war die GRK2 Kinasedomäne für die cAMP-Regulation in Standard-HEK-293-Zellen von wichtiger Bedeutung (Iacovelli et al., 2009). Beim $G\alpha_s$ -gekoppelten TSH-Rezeptor konnte

ebenfalls eine Abhängigkeit der GRK2 von dessen Kinaseaktivität belegt werden (Iacovelli et al., 1999). Konkordant mit diesen Daten sind bisher unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zum endogenen $G\alpha_s$ -gekoppelten β_2 -adrenergen Rezeptor und zum $G\alpha_i$ -gekoppelten CXCR4 Rezeptor, die eine kinase-abhängige GRK-Regulation des cAMP-Signals nach Rezeptoraktivierung zeigten (unveröffentlichte Daten; M. Deininger, A. Faußner).

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass für die Regulation der cAMP-Signalwege von $G\alpha_i$ - und $G\alpha_s$ -gekoppelten GPCRs die Kinaseaktivitäten von GRK2 und 3 von entscheidender Bedeutung zu sein scheint. Für die Mehrzahl der bisher untersuchten $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren gilt hingegen, dass ihre *second messenger* Regulation durch GRK2 und 3 Kinase-unabhängig erfolgen kann. Bezüglich der $G\alpha_q$ -gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren, die in dieser Arbeit erstmals bezüglich ihrer Calciumregulation untersucht wurden, ist ergänzende Forschung, beispielsweise mittels rezeptorseitigen Mutationen notwendig, um die Kinase-abhängige GRK-Regulation abschließend erklären zu können.

GRK2 und GRK3 werden oft nicht differenziert betrachtet und subsumiert als GRK2/3 bezeichnet. In vielen Experimenten, wie oben belegt, wird sogar nur GRK2 untersucht, da sie meistens stärker als GRK3 exprimiert wird (Deshpande et al., 2014; "Human Protein Atlas," 2018). Zwar hat dies eine gewisse Berechtigung, angesichts einer Sequenzidentität von knapp 85% (Daaka et al., 1997). Aber bereits vor mehr als 25 Jahren zeigte Ishii et al. (1994) in *Xenopus* Oozyten, dass GRK3, im Vergleich zur GRK2, zu einer stärkeren Reduktion des Calciumsignals nach Aktivierung des PAR1 führt.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass sich GRK2 und 3 voneinander unterscheiden lassen. GRK3 hatte bei allen hier untersuchten GPCRs immer einen deutlich stärkeren Effekt als GRK2 (Abbildung 26, Abbildung 30). Sowohl beim endogenen als auch überexprimierten B2R wurde die Wirkung zur Calciumsignalreduktion bei GRK3, nicht jedoch bei GRK2, durch die Ausschaltung der Kinaseaktivität gemindert.

Im vorliegenden experimentellen System wurden die Konstrukte der beiden Kinasen mit identischem Ausgangsvektor isogen exprimiert. Folglich muss es sich bei den gezeigten divergenten Effekten um intrinsische Unterschiede der Kinasen handeln, die auf Abweichungen der sonst hochkonservierten GRK-Proteinsequenz beruhen. Der größte Unterschied der GRK-Sequenz lässt sich im Bereich der C-terminalen PH-Domäne feststellen. Diese weist nur eine Sequenzidentität von knapp 52% auf (Daaka et al., 1997; Komolov et al., 2018). Folglich könnte eine höhere Stabilität oder stärkere Interaktion der GRK3 mit dem Rezeptor eine potenzielle Erklärung darstellen und die genannten Ergebnisse mitbedingen. Unter physiologischen Konditionen *in vivo* bedeutet dies, dass es sehr

wahrscheinlich relevant ist, ob in einer Zelle eher GRK2 oder GRK3 exprimiert wird. Bereits *in vitro* ist zu beobachten, dass das Expressionslevel der GRKs in unterschiedlichen Zelllinien divergiert (Atwood et al., 2011). In den in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen beispielsweise, ist das mRNA-Verhältnis GRK2 zu GRK3 3:1 ("Human Protein Atlas," 2018). Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das zelluläre GRK-Expressionslevel neben dem Gewebe auch von Faktoren wie Stress oder Inflammation abhängig ist (E. V. Gurevich et al., 2012). Somit sind beispielsweise unter pathologischen Bedingungen temporäre Verschiebungen des GRK2 und 3-Proteinlevels möglich, die folglich zu einer veränderten Rezeptorregulation beitragen könnten.

G.1.3.2 Relevanz für die GRK4-Familie

Im Gegensatz zu GRK2 und 3 ist die Kinaseaktivität der GRKs 4-6 für alle vier in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren unabdingbar. Eine Inaktivierung der Kinasefunktion führte bei allen drei GRKs der GRK4-Familie zum vollständigen Verlust der Calciumsignalregulation. Auch der oben beschriebene Effekt von wtGRK5 auf das B1R-Signal zeigte sich kinase-abhängig. Dies spricht einerseits für die Validität des Wildtypeeffekts und bedeutet andererseits, dass andere regulatorisch wirkende Proteine statt des nicht-phosphorylierbaren B1-Rezeptors durch GRK5 phosphoryliert wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass derartige Effekte auch bei anderen $G\alpha_q$ -gekoppelten GPCRs einen Beitrag zur Regulation des Calciumsignals leisten.

Im Vergleich zu GRK2 gibt es für die Effekte der GRKs 4-6 bisher deutlich weniger Veröffentlichungen. Folglich sind nur zu einzelnen GPCRs, teilweise widersprüchliche, Erkenntnisse über die Regulation durch diese GRKs bekannt. Die Daten der vorliegenden Arbeit bieten die erste umfassende Untersuchung zu allen drei GRKs der GRK4-Familie. Dennoch bestätigen die meisten Untersuchungen der Literatur zu verschiedenen $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren die Erkenntnisse dieser Arbeit. Für den $G\alpha_q$ -gekoppelten muskarinergen M1-Acetylcholinrezeptor konnte ein Kinase-abhängiger Effekt der GRK6 auf das IP_3 -Signal in hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden. GRK5 hatte interessanterweise keinen Einfluss (Willets et al., 2004). Beim überexprimierten Histamin H1 Rezeptor hingegen wurde für GRK5 ein Kinase-abhängiger Effekt in HEK-293-Zellen belegt (Iwata et al., 2005). Auch in humanen Brustepithelzellen wurde ein Kinase-abhängiger Effekt der GRK5 für das IP_3 - und Calciumsignal des PAR1 Rezeptors nachgewiesen. Im Widerspruch zur vorliegenden Arbeit hatten aber weder GRK2 noch GRK6 einen Einfluss auf das PAR1 Calciumsignal (Tiruppathi et al., 2000). Dies könnte daran liegen, dass eine andere Zelllinie genutzt wurde, die GRKs transient überexprimiert wurden, eine nicht PAR1 selektive Stimulation mittels Thrombin erfolgte und die Calciumkonzentration mittels mikroskopischer Einzelzellmessungen im fünf Sekunden Abstand bestimmt wurde. Eine aktuelle Untersuchung in Megakaryoblasten bestätigt hingegen die Daten dieser Arbeit und

zeigt mittels *GRK-Knockout* eine GRK6 abhängige Phosphorylierung und Calciumsignalregulation für PAR1 (Chen et al., 2020).

Mögliche Ursachen lassen sich aus der, in der Einleitung skizzierten, geometrischen Anordnung und den Intra-GRK-Bindungen dieser GRK-Familie ableiten. So gibt es bisher keinen Hinweis, dass GRKs der GRK4-Familie in der Lage sind aktivierte $G\alpha_q$ -Untereinheiten zu binden (Carman et al., 1999). Der C-Terminus dieser GRK-Familie sichert regelhaft die Bindung der GRK an der Plasmamembran, eine Bindung von $G\beta\gamma$ ist somit eher unwahrscheinlich und in der Wissenschaft bisher nicht belegt (Chuang et al., 1996; Daaka et al., 1997). Für die Regulation des *second messengers* Calcium bleibt folglich die Kinase-Domäne. Die Phosphorylierung des GPCRs scheint damit der entscheidende Schritt in der GRK-Regulation, wobei eine Modulation der Effektstärke durch N-terminale Intra-GRK Bindungen durch die vorliegenden Untersuchungen nicht auszuschließen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den GRKs 4-6 die Regulation der GPCR-Aktivität fast ausschließlich über die Kinasefunktion erfolgt und Kinase-unabhängige Effekte Ausnahmen, wenn nicht sogar Artefakte darstellen.

G.1.4 Bedeutung der $G\alpha_q$ -Bindungsfähigkeit für die GRK2-Familie

Wie in der Einleitung ausgeführt, besitzen GRK2 und 3 eine N-terminale Domäne, die freie $G\alpha_q$ -Untereinheiten binden und somit inaktivieren kann. Außerdem besitzen sie eine C-terminale Domäne die eine Verankerung an der Plasmamembran via Bindung an freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und Phospholipide ermöglicht. Bisher gab es keine Untersuchung, die den Einfluss dieser GRK-Domänen für die Regulation des Calciumsignals unterschiedlicher GPCRs vergleicht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher mittels GRK Mutanten und Doppelmutanten erstmals diese Funktionsdomänen komparativ untersucht. Der Einfluss der GRKs wird für Bradykinin und Protease-aktivierte Rezeptoren getrennt betrachtet.

G.1.4.1 Regulation der Bradykininrezeptoren

Beim endogenen B2R führte lediglich die Inaktivierung der C-terminalen GRK-Domäne zu einem deutlichen Funktionsverlust bezüglich der GPCR-Calciumregulation. Die isolierte Mutation einer der beiden anderen GRK-Funktionsdomänen hatte keine oder nur geringe Funktionseinbußen (Abbildung 28). Auch die zeitgleiche Mutation von zwei GRK-Domänen zeigte weiterhin signifikante Reduktionseffekte auf das Calciumsignal des B2R. Sogar bei der Doppelmutante *Gα + Kinase-def*, welche isoliert an freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten binden kann und dadurch dominant negativ wirken sollte. Durch Bindung an die freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten sollte selbige Doppelmutante in Konkurrenz mit den endogenen GRKs treten, diese verdrängen und dadurch eher eine Steigerung des Calciumsignals bewirken. Eine mögliche Erklärung für die Restfunktion der GRK-Mutanten könnte sich aus dem quantitativen Vergleich der Rezeptoren und GRKs ergeben. Die GRK-Überexpression führt zu einer

zahlenmäßigen Überlegenheit der mutierten GRKs, wodurch eine direkte Bindung mit niedriger Affinität an die zahlenmäßig unterlegenen endogenen B2-Rezeptoren erfolgen und die Aktivierung von $G\alpha_q$ gehemmt werden könnte. Eine solche direkte Interaktion von GRK2 und 3 wurde für den B2R (Feierler et al., 2011) und für andere GPCRs (Dhami et al., 2004) beschrieben. Dhami et al. (2004) konnte außerdem zeigen, dass GRK2 nicht isoliert aktivierte G-Proteinuntereinheiten, sondern zeitgleich auch den aktivierten Rezeptor binden kann. Die so erreichte sterische Bindung einer GRK an den Rezeptor sollte die Aktivierung weiterer G-Proteine verhindern und auch ohne Rezeptorphosphorylierung in einer Signalabnahme resultieren.

Bei beiden überexprimierten Bradykininrezeptoren führte eine Mutation der N-terminalen GRK2 und GRK3-Domäne (*G α -def*) zu einem fast vollständigen Funktionsverlust. Durch die Rezeptorüberexpression konnte hier ein nahezu vollständiger quantitativer Ausgleich gegenüber der GRK-Überexpression intrazellulär hergestellt werden. So konnte auch für die beiden Doppelmutanten *G α + Kinase-def* ein fast vollständiger Verlust der Regulationsfähigkeit in Bezug auf das Calciumsignal beobachtet werden (Abbildung 29). Bei der geringen GRK-Restaktivität handelt es sich am ehesten um ein Artefakt, welches durch die nicht mit B2R transfizierten, nur endogen B2R exprimierenden, GRK-HEK-293-Zellen verursacht wurde.

Publikationen zeigten für GRK2 auch bei anderen Rezeptoren vergleichbare Effekte. Beispielsweise konnte beim muskarinergen M1-Acetylcholinrezeptoren für GRK2 *G α -def* (D110A) und GRK2 *G α + Kinase-def* (D110A-K220R), im Gegensatz zum GRK Wildtyp, kein Effekt auf das IP_3 -Signal in Neuronen des Hippokampus und in der Fibroblastenzelllinie COS-7 detektiert werden (Willets et al., 2005). Auch für den endogenen muskarinergen M3-Acetylcholinrezeptor konnte, im Gegensatz zum Wildtyp, für GRK2 *G α -def* und die Doppelmutanten GRK2 *G α + Kinase-def* kein Effekt auf das Calciumsignal gezeigt werden (Luo et al., 2008). Beim metabotropen Glutamaterezeptor 5 konnte in Neuronen des Striatums für eine GRK2 *G α -def* (D110A) Mutante sogar eine Steigerung des IP_3 -Levels festgestellt werden (Ribeiro et al., 2009), was auf einen dominant-negativen Effekt der Mutante hindeutet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im Einklang mit der Literatur, dass die Regulation des Calciumsignals für die genannten Rezeptoren durch die GRK2-Familie maßgeblich über die Bindung des aktivierten $G\alpha_q$ -Proteins und eine womöglich damit einhergehende GRK-Bindung an den aktivierten Rezeptor erfolgt. Ist diese Bindung von $G\alpha_q$ durch GRK-Mutation nicht möglich, so zeigen die GRK-Doppelmutanten, dass es bei überexprimierten Rezeptoren funktionell beinahe irrelevant ist, ob die GRK-Kinase zusätzlich inaktiviert wurde oder nicht. Einen weiteren Aspekt könnte die trianguläre Struktur der GRK2-

Familie begründen (Lodowski et al., 2003; Penela et al., 2019), da die Kinase durch die beiden anderen Domänen umrahmt wird. Folglich ist es denkbar, dass eine Bindung der GRK an G-Protein-Untereinheiten zu einer geöffneten Konformation der selben führt und durch die Aufhebung der Intra-GRK Bindungen, zu einer gesteigerten Kinasefunktion beiträgt. Umgekehrt würde dies bedeuten, dass die Mutation der N-terminalen Domäne auch die Funktion der Kinasedomäne negativ beeinflussen könnte und dadurch ein insgesamt schwächerer Effekt auf das Calciumsignal gemessen wird, als dem singular durch den Defekt der $G\alpha_q$ -Bindung resultierenden. Funktionell ist dies zweitrangig, für ein detailliertes Verständnis der GRK-Funktion gilt es diesen Aspekt jedoch zu bedenken.

G.1.4.2 Regulation der Protease-aktivierten Rezeptoren

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die $G\alpha_q$ -bindungsdefiziente GRK2 und 3 für den endogenen PAR1 einen deutlichen Funktionsverlust (Abbildung 30). Anders beim PAR2, wo diese GRKs ohne Fähigkeit zur $G\alpha_q$ -Bindung keine signifikante Funktionseinschränkung im Vergleich zum GRK Wildtyp aufwiesen. Die Doppelmutanten von GRK2 und 3, welche weder Kinase- noch $G\alpha_q$ -Bindungsfunktion haben (*Gα + Kinase-def*), führten bei beiden PARs zu einem vollständigen Funktionsverlust der Calciumsignalregulation, aber wirkten auch hier nicht dominant-negativ. Der Aspekt, dass weder eine Mutation der Kinasefunktion noch die $G\alpha_q$ -Bindungsfunktion alleine einen vollständigen Funktionsverlust der GRKs bewirken, wie diese für die entsprechende Doppelmutante gezeigt wurde, verdeutlicht, dass beim PAR2 beide Domänen für die Gesamtfunktion der GRKs von wichtiger Bedeutung sind und ein synergistisches, respektive kompensatorisches Funktionsspektrum der beiden Domänen nicht auszuschließen ist. Auch die bereits erwähnte Intra-GRK-Interaktion und die daraus resultierende funktionelle Beeinflussung einer Domäne durch die jeweils andere ist nicht auszuschließen.

Wie bereits oben angesprochen, scheint generell zu gelten, dass fast alle $G\alpha_q$ -gekoppelten GPCRs eher Kinase-unabhängig durch die GRK2 reguliert werden können, einige jedoch auch die GRK2-Kinasefunktion zur schnellen Regulation ihres Signals benötigen. Angesichts dessen, dass entsprechende Unterschiede in dieser Arbeit unter experimentell identischen Bedingungen gezeigt werden konnten, beruhen sie sehr wahrscheinlich auf unterschiedlichen Sequenzen der Rezeptoren. GRKs phosphorylieren primär im Bereich des Rezeptor-C-Terminus, einschließlich der zytosolischen Helix 8 (Bahouth et al., 2017). Wie die C-Termini, unterscheiden sich auch die Helix 8 Sequenzen für verschiedene Rezeptoren deutlich, so auch bei PAR1 und PAR2 (Sato, 2019). Ein Ansatz um zu untersuchen, ob Sequenzabweichungen die Ursache für die gezeigten Unterschiede in der GRK-Regulation darstellen, könnte durch Tausch der Rezeptor-C-Termini zwischen den beiden PARs erfolgen. Durch Generierung und Expression von Rezeptorchimären mit ausgetauschten C-

Termini könnte ermittelt werden, ob sich rezeptorspezifische Eigenschaften der GRK-Regulation von einem Rezeptor auf einen anderen übertragen lassen.

Einige Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass unterschiedliche Liganden unterschiedliche Konformationsänderungen eines GPCRs bedingen können. Dies kann darin resultieren, dass einzelne aktivierte Liganden-Rezeptorkonformationen im Sinne des *biased signaling* präferenziell gewisse G-Proteine, GRKs oder β -Arrestine binden (V. V. Gurevich et al., 2017). Es ist daher nicht ganz auszuschließen, dass die unterschiedlichen Resultate der Messungen mit PAR1 und 2 auf der Nutzung spezifischer Agonisten beruhen. Diese artifiziellen Agonisten könnten Rezeptorkonformationen induzieren, welche in den oben genannten GRK-Interaktionsmustern resultieren, jedoch möglicherweise von denen eines natürlichen Liganden abweichen.

G.1.5 Bedeutung der G $\beta\gamma$ -Bindungsfähigkeit für die GRK2-Familie

Die Bindung der GRK2-Familie an aktiviertes G $\beta\gamma$ war sowohl für die untersuchten Bradykinin als auch Protease-aktivierten Rezeptoren funktionell von elementarer Bedeutung (Abbildung 29, Abbildung 30). Eine Mutation der C-terminalen GRK-Domäne führte in allen Untersuchungen zum fast vollständigen Verlust der Calciumsignalregulierbarkeit durch GRKs und auch die Kinase- und G $\beta\gamma$ -bindungsdefizienten Doppelmutanten von GRK2 und 3 führten zu keiner Veränderung dieser Situation. Berücksichtigt man bisherige Erkenntnisse, die den C-Terminus der GRK2-Familie für die Rekrutierung an die Membran und spezifisch an aktivierte Rezeptoren verantwortlich machen (Benovic et al., 1989; J. Pitcher et al., 1992), so ist dies mit den Daten dieser Arbeit plausibel zu vereinbaren. Es gibt außerdem Hinweise, dass die Bindung von G $\beta\gamma$ zu einer gesteigerten katalytischen Aktivität der GRK2 beiträgt (Black et al., 2016).

Die G $\beta\gamma$ -bindende GRK-Domäne alleine scheint allerdings funktionslos, wie die Daten der G α_q - und Kinase-defizienten Doppelmutanten dieser Arbeit für alle untersuchten Rezeptoren belegten (Abbildung 29, Abbildung 30). Fragmentuntersuchungen der GRK2 C-terminalen Domäne für den G α_q -gekoppelten metabotropen Glutamatrezeptor 1 (Dhami et al., 2002) oder den muskarinergen M1-Acetylcholinrezeptor (Willems et al., 2005) zeigten ebenfalls keinen Effekt auf das IP₃-Signal. Mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) konnte in HEK-293-Zellen am überexprimierten G α_q -gekoppelten muskarinergen M3-Acetylcholinrezeptor gezeigt werden, dass zwar primär die Bindung an freies G $\beta\gamma$ für die Membranrekrutierung der GRK2 verantwortlich ist, jedoch durch Einsatz einer G α_q - und G $\beta\gamma$ -bindungsdefizienten GRK2 Doppelmutante nachgewiesen werden konnte, dass zu einem kleinen Teil auch die Bindung an G α_q zur GRK-Membranrekrutierung beiträgt (Wolters et al., 2015).

Ein Aspekt der GRK-G β γ -Bindung, der eine Rezeptor-GRK-Affinität und daraus resultierende Unterschiede der GRK-Funktionsstärke begründen könnte, wurde in humanen Zervixkarzinom-Zelllinien gezeigt. Für den muskarinergen M3-Acetylcholin-Rezeptor wurde die GRK2-Membranrekrutierung von den G γ -Subtypen der G β γ -Untereinheit mitbestimmt (Samaradivakara et al., 2018). Auch für verschiedene G β -Untereinheiten konnte in Neuronen eine unterscheidbare GRK-Affinität gezeigt werden (Daaka et al., 1997). Betrachtet man nun, dass sich G-Proteine aus einer Kombination der verschiedenen α , β , γ -Untereinheiten zusammensetzen können, die Zelltyp-, aber auch GPCR-abhängig sind (Oldham et al., 2008), so bietet dies die Möglichkeit für eine GRK-spezifische Rekrutierung an einzelne Rezeptoren.

G.2 Bedeutung der GRK2-Familie für die p-ERK1/2-Regulation

Um den Einfluss der GRKs auf die Rezeptor-Signalregulation zu beurteilen, sind neben dem in dieser Arbeit umfassend untersuchten *second messenger* Calcium, vor allem nachrangige (*downstream*) Effektoren für die zelluläre Antwort auf ein Rezeptorsignal von Relevanz. Daher wurde der Einfluss der GRK2-Familie auf p-ERK1/2 betrachtet.

Eine Beschränkung auf die GRK2-Familie erfolgte, nachdem in unserer Arbeitsgruppe für den B2R bereits nachgewiesen werden konnte, dass eine Überexpression der GRK4-Familie keinen signifikanten Einfluss auf p-ERK1/2 hatte (Feierler et al., 2011). Eine Überexpression der beiden Wildtyp GRKs 2 und 3 führte zur Inhibition des p-ERK1/2-Signalwegs (Wirth, 2011). Bei GRK2-Suppression konnte sowohl in Kolonepithelzellen *in vitro* als auch in murinen Kardiomyozyten *in vivo* eine ERK-Aktivitätssteigerung gezeigt werden (Fu et al., 2013; Steury, Lucas, et al., 2017). Auch in HEK-293-Zellen führte eine GRK-Suppression zum gleichen Ergebnis, jedoch nur für GRK2, 5 und 6, GRK3 führte zu keiner p-ERK1/2-Veränderung (Luo et al., 2008). Ob dies am - im Vergleich zu den anderen GRKs - deutlich geringeren endogenen GRK3 Expressionslevel liegt oder andere Ursachen hat, ist bislang ungeklärt.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur überexprimierten GRK3 mittels semiquantitativer Western Blot Messungen zeigten für den überexprimierten B2R, dass neben dem GRK3 Wildtyp auch dessen Kinase-defiziente Mutante in HEK-293-Zellen zu einer Reduktion des p-ERK1/2 führte. Für die G α_q -, wie auch G β γ -bindenden GRK3 Domänen konnte durch Mutation belegt werden, dass selbige keinen Einfluss auf das p-ERK1/2-Signal nach zehnmütiger Agonistenstimulation hatten (Welte, 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die Erkenntnisse zum GRK3 mittels quantitativer Messmethoden bestätigen, bei der GRK3 ohne G α_q -Bindungsfähigkeit jedoch zeigten die Messungen dieser Arbeit ein dem GRK3 Wildtyp äquivalentes p-ERK1/2-

Reduktionspotenzial und auch für die GRK3 ohne G β -Bindungsfähigkeit konnte die exakte p-ERK1/2-Messung noch eine signifikante Restaktivität im Vergleich zur Kontrolle detektieren. Auch für den GRK2 Wildtyp sowie die G α_q - und G β -bindungsdefiziente Mutante konnte eine deutliche Reduktion des p-ERK1/2 Levels nachgewiesen werden (Abbildung 31). Worauf diese Effekte beruhen, muss in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

Erstmals wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der GRK2-Familie für die Regulation des p-ERK1/2-Signals nach B1R Aktivierung untersucht. Übereinstimmend mit den Messungen des überexprimierten B2R, konnten GRK2 und GRK3 das p-ERK1/2-Signal Kinase-unabhängig reduzieren, die beiden anderen Domänen waren für die Regulation jedoch von entscheidender Bedeutung. Somit ist die Regulation des p-ERK1/2 Signals für diesen Rezeptor konkordant mit der GRK-Calciumregulation. Die p-ERK1/2-Regulation beim B2R gleicht eher dem Calciumsignal des endogenen B2R. Ob eine unzureichende Rezeptorüberexpression Ursache hierfür war, lässt sich retrospektiv nicht sicher ausschließen. In Standard-HEK-293-Zellen konnte allerdings gezeigt werden, dass GRKs, neben der Calciumregulation, nachgeordnet auch das p-ERK1/2-Signal modulieren können (Robinson et al., 2013). GRK2 war dabei phosphorylierungs-unabhängig als Gerüstprotein (*Scaffolding*) für RAF, MEK und ERK2 in die Regulation von p-ERK1/2 involviert. Voraussetzung war die Bindung von RhoA_{GTP} im katalytischen Zentrum der GRK.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass GRKs im artifiziellen Umfeld einer Rezeptor- und GRK-Überexpression primär rezeptorseitig regulatorisch wirksam sind und gezeigte Effekte folglich am ehesten durch Calciumregulation, denn durch Modulation der intrazellulären p-ERK1/2-Kaskade erfolgten. In nativen Zellen kann die Bedeutung der GRKs davon durchaus abweichen.

G.3 Bedeutung der GRK-Kinasedomäne für die β -Arrestin-Rezeptorbindung

Im Modell der homologen Desensibilisierung dient die Rezeptorphosphorylierung durch GRKs unter anderem dazu, dass β -Arrestine an den aktivierten GPCR rekrutiert werden (Barak et al., 1997).

Insgesamt zeigten die Daten dieser Arbeit bisher zahlreiche Kinase-unabhängige GRK-Effekte. Ob dies auch für die β -Arrestin-GPCR Rekrutierung gilt, wurde im letzten Abschnitt untersucht. Hierzu wurden die wtGRKs und für die GRK4-Familie zusätzlich die Kinase-defizienten Mutanten untersucht. Mittels BRET-Messung wurde die Bindung von β -Arrestin 1 oder 2 an den Wildtyp B2R oder eine Rezeptormutante gemessen. Letztere wies C-terminal drei mutierte Phosphorylierungsstellen auf und konnte dort folglich nicht durch GRKs phosphoryliert werden.

Für die überexprimierten GRKs 2-5 konnte sowohl am B2R Wildtyp als auch an der Rezeptormutante, im Vergleich zu den Kontrollzellen, kein Unterschied für die maximale β -Arrestin 1 Rekrutierung gemessen werden. Einzige Ausnahme war GRK6, hier kam es statt der zu erwartenden Steigerung zu einer Reduktion des BRET-Signals (Abbildung 33). Der Effekt war eindeutig phosphorylierungs-abhängig, da sowohl eine Kinase-defiziente GRK6 Mutante als auch der mutierte B2-Rezeptor zu einer Aufhebung des gezeigten Effekts führten. Mit Ausnahme der GRK6 scheint β -Arrestin 1 insgesamt kaum durch die GRKs reguliert zu werden oder die Phosphorylierung der transient exprimierten B2R-RLuclI-Konstrukte durch endogene GRKs ist ausreichend, so dass unerwartet kein deutlicher Effekt durch Überexpression von GRK2-5 beobachtet werden konnte.

In unserer Arbeitsgruppe wurde mittels Rezeptormutation bereits belegt, dass die stabile β -Arrestin 1-Bindung an B2R in HEK-293-Zellen den C-Terminus des Rezeptors benötigt. Mittels Arrestin-Suppression konnte in selbiger Arbeit außerdem gezeigt werden, dass β -Arrestin 2 alleine von größerer Bedeutung für die B2R Internalisation als β -Arrestin 1 ist und darüber hinaus auf den Rezeptor C-Terminus nicht angewiesen war (Feierler et al., 2011).

Folglich wurde auch die Bedeutung der GRKs für β -Arrestin 2 eruiert. Im Unterschied zu β -Arrestin 1 zeigten nun neben GRK6 auch GRK3 und GRK4 signifikante Kinase-abhängige Effekte auf das BRET-Signal (Abbildung 33). In allen Fällen kam es jedoch nicht zu der erwarteten Steigerung des BRET-Signals, sondern zu einer Signalreduktion, die für eine verringerte β -Arrestin-GPCR-Interaktion oder wenigstens für eine Orientierungsänderung der beiden beteiligten Domänen RLuclI und eYFP zueinander spricht.

Eine mögliche Erklärung hierfür konnte am β_2 -adrenergen Rezeptor in HEK-293-Zellen gezeigt werden. Ein GRK2-*Knockdown* führte dort zu einer veränderten β -Arrestin 2 Konformation am aktivierten Rezeptor, quantitativ jedoch konnte keine Abweichung zur Arrestinrekrutierung der Kontrollzellen nachgewiesen werden (Nobles et al., 2011). Betrachtet man die Tatsache, dass die BRET-Signalstärke von der sterischen Nähe des β -Arrestins und des GPCR C-Terminus abhängt (Brown et al., 2015; Namkung et al., 2016), so wäre es denkbar, dass eine Arrestinkonformationsänderung in einem reduzierten BRET-Signal, bei quantitativ unveränderter Arrestin-GPCR-Bindung, resultieren könnte.

Ein zweiter Aspekt, der die Messdaten mitbegründen könnte, wurde in HEK-293-Zellen am β_2 -adrenergen Rezeptor mittels FRET gezeigt. Die β -Arrestinrekrutierung verlief dort in zwei Phasen. Die langsame Phase war phosphorylierungs- und damit GRK-modulierbar, die schnelle Phase war am ehesten mit der direkten β -Arrestinbindung an eine aktive Rezeptorkonformation zu begründen. Modulation der GRK-Expression resultierte in einer veränderten Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung, nicht jedoch in einer Beeinflussung der maximal erreichten β -Arrestin-GPCR-Interaktion. Für einen *Knockdown* der endogenen

GRK6 und 2 konnte eine verzögerte, für die GRK2 Überexpression eine beschleunigte β -Arrestin 2 Rekrutierung gezeigt werden. Kombinierte GRK-Suppressionen illustrierten, dass gewisse kompensatorische Synergismen für den Funktionsverlust einzelner GRKs bestanden (Violin et al., 2006).

Ein Modell, das die kinetischen Unterschiede der einzelnen GRKs für die β -Arrestin Rekrutierung adressiert, ist die, in der Einleitung unter C.7 dargestellte, „Barcode“-Hypothese. Verschiedene GRKs erzeugen demnach ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster an aktivierten GPCRs. Aus diesen divergierenden Phosphorylierungsmustern können verschiedene Affinitäten für beispielsweise die Arrestinaktivität oder -rekrutierung resultieren (Bahouth et al., 2017).

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Daten der BRET-Messungen der B2R- β -Arrestin-Interaktion, eine eher unerwartete phosphorylierungs-abhängige Reduktionen bei einigen GRKs. Die Daten widersprechen für den B2R dem gebräuchlichsten Modell der homologen, phosphorylierungs-abhängigen Rezeptor-Desensibilisierung durch β -Arrestin-Rekrutierung. Potenziell zugrunde liegende Mechanismen wurden skizziert. Um die tatsächliche Bedeutung der Daten zu eruieren, sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

H Resümee und Ausblick

Die Bedeutung der einzelnen GRK-Domänen für die Rezeptorsignalregulation wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig umfassend untersucht. Die hierfür entwickelte Messmethode wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich eingesetzt, um auch für andere – nicht in dieser Arbeit dargestellte – G-Protein-Familien die Bedeutung der GRKs für das Rezeptorvermittelte *second messenger* Signal zu quantifizieren (unveröffentlichte Daten, M. Deininger, A. Faußner). Für Rückschlüsse auf die zelluläre Regulation unter physiologischen Bedingungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass im vorliegenden experimentellen Aufbau eine GRK-Überexpression zur differenzierten Betrachtung notwendig ist. Ein potenzielles Studiendesign, das diese Limitation adressieren könnte und in seiner Struktur seit 2012 bekannt ist, wäre die Nutzung der CRISPR/Cas9-Methode zur Genom-Editierung, welche die Genmodulation von endogenen GRKs erlaubt (Jinek et al., 2012). Auch direkte Messungen der GPCR-GRK-Interaktion könnten weitere Informationen liefern und zukünftig die Frage beantworten, wie nur fünf GRKs hunderte Rezeptoren regulieren. Die vorliegende Arbeit gibt anhand der vier untersuchten Rezeptoren mit divergentem Signalvermittlungsverhalten einen ersten Einblick in die komplexe Regulation der GRK-GPCR-Interaktion.

Die Daten dieser Arbeit illustrieren differenziert die Bedeutung der GRK-G-Protein-Interaktion für die Funktion der GRK2-Familie. So konnte einerseits gezeigt werden, dass für diese GRKs die G $\beta\gamma$ -Bindung essentiell für die Calciumsignalregulation ist, aber andererseits auch die G α_q -Bindung bei vielen der untersuchten Rezeptoren von zentraler Wichtigkeit ist. Gleiches gilt auch für die Regulation von zellulären Effektoren wie p-ERK1/2, wobei hier noch weitere Untersuchungen folgen müssen, um die Bedeutung der einzelnen GRKs für die ERK-Regulation *downstream* der Rezeptorsignaltermination zu untersuchen.

Für die Bradykininrezeptoren belegen die Daten der Arbeit eine kinase-unabhängige Regulation auf Ebene des *second messengers* Calcium und des Effektors p-ERK1/2, aber auch die Wichtigkeit dieser Domäne für PAR1 und 2. Insbesondere der PAR2 bedarf einer noch genaueren Betrachtung, da unter anderem die Relevanz der G α_q -Bindung in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend bestimmt werden konnte. Ebenso sind weitere Untersuchungen für die gezeigten teilweise phosphorylierungs-abhängigen Effekte der GRKs bezüglich der β -Arrestinrekrutierung nötig. Hier geben die Messungen lediglich erste Anhaltspunkte für weitere, umfassende Untersuchungen. Klar scheint jedoch, für die GRK2-Familie ist das Modell der homologen Desensibilisierung durch β -Arrestinrekrutierung in weiten Teilen nicht zutreffend. Für die GRK4-Familie hingegen belegen die Daten eine primär Kinase-abhängige Funktionalität.

Von dieser Arbeit unbeantwortet bleibt die Frage, welche rezeptorseitigen Einflüsse die Funktion und Selektivität der GRKs mitbeeinflussen. Für einzelne Rezeptor-GRK-Paarungen gibt es entsprechende Veröffentlichungen, jedoch gilt, wie auch die teilweise divergenten Daten dieser Arbeit belegen, es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Systematik der GRK-GPCR-Interaktion abschließend zu verstehen.

Insgesamt entsteht der Eindruck, dass die GRK-GPCR-Interaktion sehr rezeptorspezifisch ausgestaltet ist, so dass es schwer sein dürfte entsprechende Vorhersagen zu treffen. Bei den GRKs, so zeigen die vorliegenden Ergebnisse, gibt es verschiedene funktionelle Operatoren, die je nach Rezeptor mehr oder weniger von Bedeutung sind.

Folglich ist mittelfristig ein gezielter therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Krankheiten denkbar, die mit GRK-Dysregulation assoziierten sind. Pharmakologisches Ziel sollten dabei jedoch nicht die GRKs direkt sein, sondern die Interaktion dieser mit einem einzelnen Rezeptor, um Nebenwirkungen zu minimieren. Zum Einsatz kommen könnten beispielsweise *small molecules*, die spezifisch die Interaktion einer GRK mit einem GPCR beeinflussen.

Bereits in den letzten Jahren konnten Untersuchungen im Mausmodell, aber auch in humanen Makrophagen, durch die Behandlung mit Gallein eine Suppression der GRK2-Expression erreichen. Eine zelluläre Dysregulation der GRK2-Expression in Myozyten und Makrophagen wird beispielsweise für den Progress der Herzinsuffizienz und des kardio-renalen Syndroms mitverantwortlich gemacht. (Kamal et al., 2014; Karuppagounder et al., 2018; Rudomanova et al., 2017). Perspektivisch könnte dieser Ansatz ergo dazu dienen, die Herzinsuffizienz zu therapieren oder zumindest deren Progress zu limitieren. Dass GRKs nicht nur als pharmakologisches Ziel, sondern auch zur Krankheitsdetektion - als sogenannte Biomarker - geeignet sind, konnte kürzlich eine Studie an humanen Proben belegen. In Blutzellen wurde die Konzentration von GRK2 bestimmt und als geeigneter Marker für die Diagnostik und Therapiekontrolle der Pulmonalklappeninsuffizienz identifiziert (Rodriguez-Serrano et al., 2019).

Zahlreiche Studien untersuchten in den letzten Jahren die pathophysiologische Bedeutung der GRK-Dysregulation für diverse chronische Erkrankungen und Tumorleiden. Ein fundamentales Verständnis der zugrunde liegenden molekularen GRK-Rezeptor-Regulationsmechanismen, zudem die vorliegende Arbeit einen kleinen Beitrag leistet, könnte zukünftig für die frühzeitige Diagnostik und zielgerichtete Therapie dieser Krankheiten von größerer Bedeutung sein.

I Literaturverzeichnis

1. Alhenc-Gelas, F., Bouby, N., Richer, C., Potier, L., Roussel, R., & Marre, M. Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. *Curr Pharm Des*, 17(25), 2654-2662. (2011).
2. Allen, S. J., Parthasarathy, G., Darke, P. L., Diehl, R. E., Ford, R. E., Hall, D. L., et al. Structure and Function of the Hypertension Variant A486V of G Protein-coupled Receptor Kinase 4. *J Biol Chem*, 290(33), 20360-20373. (2015).
3. Althoff, T. F., & Offermanns, S. G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells - implications for vascular disease. *J Mol Med (Berl)*, 93(9), 973-981. (2015).
4. Antoniak, S., Sparkenbaugh, E. M., Tencati, M., Rojas, M., Mackman, N., & Pawlinski, R. Protease activated receptor-2 contributes to heart failure. *PLoS ONE*, 8(11), e81733. (2013).
5. Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., et al. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem*, 267(25), 17882-17890. (1992).
6. Atwood, B. K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., & Straiker, A. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics*, 12, 14. (2011).
7. Bahouth, S. W., & Nooh, M. M. Barcoding of GPCR trafficking and signaling through the various trafficking roadmaps by compartmentalized signaling networks. *Cell Signal*, 36, 42-55. (2017).
8. Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C., & Hamodrakas, S. J. Interactions of the alpha-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol*, 182(3), 209-218. (2013).
9. Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J., & Caron, M. G. A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*, 272(44), 27497-27500. (1997).
10. Barnes, J. A., Singh, S., & Gomes, A. V. Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol Cell Biochem*, 263(1-2), 227-239. (2004).
11. Benovic, J. L., DeBlasi, A., Stone, W. C., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science*, 246(4927), 235-240. (1989).
12. Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(9), 2797-2801. (1986).
13. Bhatnagar, A., Willins, D. L., Gray, J. A., Woods, J., Benovic, J. L., & Roth, B. L. The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. *J Biol Chem*, 276(11), 8269-8277. (2001).
14. Black, J. B., Premont, R. T., & Daaka, Y. Feedback regulation of G protein-coupled receptor signaling by GRKs and arrestins. *Semin Cell Dev Biol*, 50, 95-104. (2016).
15. 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(18), 6837-6848. (2000).
16. Blaukat, A., Herzer, K., Schroeder, C., Bachmann, M., Nash, N., & Muller-Esterl, W. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry*, 38(4), 1300-1309. (1999).
17. Blaukat, A., Pizard, A., Breit, A., Wernstedt, C., Alhenc-Gelas, F., Muller-Esterl, W., et al. Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem*, 276(44), 40431-40440. (2001).

18. Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G., et al. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, 333(6171), 370-373. (1988).
19. Brown, N. E., Blumer, J. B., & Hepler, J. R. Bioluminescence resonance energy transfer to detect protein-protein interactions in live cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1278, 457-465. (2015).
20. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., & Pouyssegur, J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo j*, 18(3), 664-674. (1999).
21. Carafoli, E., & Krebs, J. Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem*, 291(40), 20849-20857. (2016).
22. Carman, C. V., Barak, L. S., Chen, C., Liu-Chen, L. Y., Onorato, J. J., Kennedy, S. P., et al. Mutational analysis of Gbetagamma and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*, 275(14), 10443-10452. (2000).
23. Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., et al. Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem*, 274(48), 34483-34492. (1999).
24. Carpenter, B., & Tate, C. G. Engineering a minimal G protein to facilitate crystallisation of G protein-coupled receptors in their active conformation. *Protein Eng Des Sel*, 29(12), 583-594. (2016).
25. Cavasotto, C. N., Orry, A. J., & Abagyan, R. A. Structure-based identification of binding sites, native ligands and potential inhibitors for G-protein coupled receptors. *Proteins*, 51(3), 423-433. (2003).
26. Chen, X., Gupta, S., Cooper, M., DeHelian, D., Zhao, X., Naik, M. U., et al. GRK6 regulates the hemostatic response to injury through its rate-limiting effects on GPCR signaling in platelets. *Blood Adv*, 4(1), 76-86. (2020).
27. Chuang, T. T., Paolucci, L., & De Blasi, A. Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem*, 271(45), 28691-28696. (1996).
28. Costa-Neto, C. M., Dillenburg-Pilla, P., Heinrich, T. A., Parreiras-e-Silva, L. T., Pereira, M. G., Reis, R. I., et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int Immunopharmacol*, 8(2), 135-142. (2008).
29. Costanzi, S. Modeling G protein-coupled receptors and their interactions with ligands. *Curr Opin Struct Biol*, 23(2), 185-190. (2013).
30. Daaka, Y., Pitcher, J. A., Richardson, M., Stoffel, R. H., Robishaw, J. D., & Lefkowitz, R. J. Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6), 2180-2185. (1997).
31. de Mendoza, A., Sebe-Pedros, A., & Ruiz-Trillo, I. The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. *Genome Biol Evol*, 6(3), 606-619. (2014).
32. DeBurman, S. K., Ptasienski, J., Benovic, J. L., & Hosey, M. M. G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem*, 271(37), 22552-22562. (1996).
33. Deshpande, D. A., Yan, H., Kong, K. C., Tiegs, B. C., Morgan, S. J., Pera, T., et al. Exploiting functional domains of GRK2/3 to alter the competitive balance of pro- and anticontractile signaling in airway smooth muscle. *FASEB J*, 28(2), 956-965. (2014).
34. 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(28), 25266-25272. (2002).
35. Dhami, G. K., Dale, L. B., Anborgh, P. H., O'Connor-Halligan, K. E., Sterne-Marr, R., & Ferguson, S. S. G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J Biol Chem*, 279(16), 16614-16620. (2004).

36. Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S. A., & Schlessinger, J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, 383(6600), 547-550. (1996).
37. Duc, N. M., Kim, H. R., & Chung, K. Y. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol*, 763(Pt B), 214-222. (2015).
38. Faussner, A., Bathon, J. M., & Proud, D. Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology*, 45(1-3), 13-20. (1999).
39. 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(5), 2617-2623. (1998).
40. Feierler, J., Wirth, M., Welte, B., Schussler, S., Jochum, M., & Faussner, A. Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B(2) receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem*, 286(50), 43282-43293. (2011).
41. Fernandez, N., Gottardo, F. L., Alonso, M. N., Monczor, F., Shayo, C., & Davio, C. 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(33), 28697-28706. (2011).
42. Flaumenhaft, R., & De Ceunynck, K. Targeting PAR1: Now What? *Trends Pharmacol Sci*, 38(8), 701-716. (2017).
43. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2), 55-75. (1948).
44. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63(6), 1256-1272. (2003).
45. Fu, X., Koller, S., Abd Alla, J., & Qwitterer, U. Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biol Chem*, 288(11), 7738-7755. (2013).
46. Goldsmith, Z. G., & Dhanasekaran, D. N. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26(22), 3122-3142. (2007).
47. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, 383(6599), 447-450. (1996).
48. Guo, S., Carter, R. L., Grisanti, L. A., Koch, W. J., & Tilley, D. G. Impact of paroxetine on proximal beta-adrenergic receptor signaling. *Cell Signal*, 38, 127-133. (2017).
49. 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*, 133(1), 40-69. (2012).
50. Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *Int J Mol Sci*, 18(12). (2017).
51. Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol*, 10, 125. (2019a).
52. Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. The structural basis of the arrestin binding to GPCRs. *Mol Cell Endocrinol*, 484, 34-41. (2019b).
53. Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. Biased GPCR signaling: Possible mechanisms and inherent limitations. *Pharmacol Ther*, 107540. (2020).
54. Heckman, K. L., & Pease, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*, 2(4), 924-932. (2007).
55. Heng, B. C., Aubel, D., & Fussenegger, M. An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnol Adv*, 31(8), 1676-1694. (2013).
56. Human Protein Atlas. *data available from v18.proteinatlas.org*. (2018).
57. Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolia, D., & De Blasi, A. Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2

- in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, alpha(1B)-adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses. *Mol Pharmacol*, 56(2), 316-324. (1999).
58. Iacovelli, L., Molinaro, G., Battaglia, G., Motolese, M., Di Menna, L., Alfiero, M., et al. Regulation of group II metabotropic glutamate receptors by G protein-coupled receptor kinases: mGlu2 receptors are resistant to homologous desensitization. *Mol Pharmacol*, 75(4), 991-1003. (2009).
 59. Ishii, K., Chen, J., Ishii, M., Koch, W. J., Freedman, N. J., Lefkowitz, R. J., et al. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem*, 269(2), 1125-1130. (1994).
 60. Iwata, K., Luo, J., Penn, R. B., & Benovic, J. L. Bimodal regulation of the human H1 histamine receptor by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*, 280(3), 2197-2204. (2005).
 61. Jacobson, K. A. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem Pharmacol*, 98(4), 541-555. (2015).
 62. Jimenez-Sainz, M. C., Murga, C., Kavelaars, A., Jurado-Pueyo, M., Krakstad, B. F., Heijnen, C. J., et al. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell*, 17(1), 25-31. (2006).
 63. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. (2012).
 64. Kamal, F. A., Mickelsen, D. M., Wegman, K. M., Travers, J. G., Moalem, J., Hammes, S. R., et al. Simultaneous adrenal and cardiac g-protein-coupled receptor-gbetagamma inhibition halts heart failure progression. *J Am Coll Cardiol*, 63(23), 2549-2557. (2014).
 65. Karuppagounder, V., Bajpai, A., Meng, S., Arumugam, S., Sreedhar, R., Giridharan, V. V., et al. Small molecule disruption of G protein $\beta\gamma$ subunit signaling reprograms human macrophage phenotype and prevents autoimmune myocarditis in rats. *PLoS ONE*, 13(7), e0200697. (2018).
 66. Katz, A., Wu, D., & Simon, M. I. Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature*, 360(6405), 686-689. (1992).
 67. Kennedy, J. E., & Marchese, A. Regulation of GPCR Trafficking by Ubiquitin. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 132, 15-38. (2015).
 68. Koller, S. D. Kinase-dependent and kinase-independent functions of G-Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). Dissertation, ETH Zürich (2012).
 69. Komolov, K. E., & Benovic, J. L. G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. *Cell Signal*, 41, 17-24. (2018).
 70. Komolov, K. E., Du, Y., Duc, N. M., Betz, R. M., Rodrigues, J., Leib, R. D., et al. Structural and Functional Analysis of a beta2-Adrenergic Receptor Complex with GRK5. *Cell*, 169(3), 407-421.e416. (2017).
 71. 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(18), 13084-13087. (1994).
 72. 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).
 73. Lancellotti, P., Ancion, A., D'Orio, V., Gach, O., Marechal, P., & Krzesinski, J. M. Bradykinin and cardiovascular protection. Role of perindopril, an inhibitor of angiotensin conversion enzyme. *Rev Med Liege*, 73(4), 197-205. (2018).
 74. Lazari, M. F., Liu, X., Nakamura, K., Benovic, J. L., & Ascoli, M. Role of G protein-coupled receptor kinases on the agonist-induced phosphorylation and internalization of the follitropin receptor. *Mol Endocrinol*, 13(6), 866-878. (1999).
 75. Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L., & Hosey, M. M. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*, 273(21), 12967-12972. (1998).

76. Lee, S. M., Booe, J. M., & Pioszak, A. A. Structural insights into ligand recognition and selectivity for classes A, B, and C GPCRs. *Eur J Pharmacol*, 763(Pt B), 196-205. (2015).
77. Leeb-Lundberg, L. M., Kang, D. S., Lamb, M. E., & Fathy, D. B. The human B1 bradykinin receptor exhibits high ligand-independent, constitutive activity. Roles of residues in the fourth intracellular and third transmembrane domains. *J Biol Chem*, 276(12), 8785-8792. (2001).
78. 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(1), 27-77. (2005).
79. Lefkowitz, R. J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(25), 6366-6378. (2013).
80. Leschner, J., Ring, L., Feierler, J., Dinkel, K., Jochum, M., & Faussner, A. Fever-like temperature modification differentially affects in vitro signaling of bradykinin B(1) and B(2) receptors. *Biol Chem*, 392(11), 1021-1029. (2011).
81. Li, L., Homan, K. T., Vishnivetskiy, S. A., Manglik, A., Tesmer, J. J., Gurevich, V. V., et al. G Protein-coupled Receptor Kinases of the GRK4 Protein Subfamily Phosphorylate Inactive G Protein-coupled Receptors (GPCRs). *J Biol Chem*, 290(17), 10775-10790. (2015).
82. Lodowski, D. T., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J., & Tesmer, J. J. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science*, 300(5623), 1256-1262. (2003).
83. Lodowski, D. T., Tesmer, V. M., Benovic, J. L., & Tesmer, J. J. The structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)-6 defines a second lineage of GRKs. *J Biol Chem*, 281(24), 16785-16793. (2006).
84. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248(4962), 1547-1550. (1990).
85. Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M., & Lohse, M. J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 15(1), 75-83. (2009).
86. Lu, M., & Wu, B. Structural studies of G protein-coupled receptors. *IUBMB Life*, 68(11), 894-903. (2016).
87. Luo, J., Busillo, J. M., & Benovic, J. L. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol*, 74(2), 338-347. (2008).
88. Mak, D. O., & Foskett, J. K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*, 58(1), 67-78. (2015).
89. Marceau, F., Bachelard, H., Bouthillier, J., Fortin, J. P., Morissette, G., Bawolak, M. T., et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. *Int Immunopharmacol*, 82, 106305. (2020).
90. Mayor, F., Jr., Cruces-Sande, M., Arcones, A. C., Vila-Bedmar, R., Briones, A. M., Salaiques, M., et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as an integrative signalling node in the regulation of cardiovascular function and metabolic homeostasis. *Cell Signal*, 41, 25-32. (2018).
91. McGuire, J. J., Saifeddine, M., Triggle, C. R., Sun, K., & Hollenberg, M. D. 2-furoyl-LIGRLO-amide: a potent and selective proteinase-activated receptor 2 agonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 309(3), 1124-1131. (2004).
92. Miao, Y., & McCammon, J. A. G-protein coupled receptors: advances in simulation and drug discovery. *Curr Opin Struct Biol*, 41, 83-89. (2016).
93. Mihara, K., Ramachandran, R., Saifeddine, M., Hansen, K. K., Renaux, B., Polley, D., et al. Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Mol Pharmacol*, 89(5), 606-614. (2016).
94. Moore, C. A., Milano, S. K., & Benovic, J. L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69, 451-482. (2007).

95. Moreau, M. E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N. J., Marceau, F., & Adam, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci*, 99(1), 6-38. (2005).
96. Morgan-Boyd, R., Stewart, J. M., Vavrek, R. J., & Hassid, A. Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca²⁺ dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol*, 253(4 Pt 1), C588-598. (1987).
97. Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., DeSantiago, J., Domeier, T. L., Mikoshiba, K., et al. The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res*, 107(5), 659-666. (2010).
98. Namkung, Y., Le Gouill, C., Lukashova, V., Kobayashi, H., Hogue, M., Khoury, E., et al. Monitoring G protein-coupled receptor and beta-arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun*, 7, 12178. (2016).
99. Neer, E. J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249-257. (1995).
100. Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., et al. Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal*, 4(185), ra51. (2011).
101. Noguez, L., Palacios-Garcia, J., Reglero, C., Rivas, V., Neves, M., Ribas, C., et al. G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in tumorigenesis and cancer progression: GPCR regulators and signaling hubs. *Semin Cancer Biol*, 48, 78-90. (2018).
102. Oldham, W. M., & Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 60-71. (2008).
103. Pals-Rylaarsdam, R., Xu, Y., Witt-Enderby, P., Benovic, J. L., & Hosey, M. M. Desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor are directed by independent mechanisms. *J Biol Chem*, 270(48), 29004-29011. (1995).
104. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183. (2001).
105. Penela, P., Ribas, C., Sanchez-Madrid, F., & Mayor, F., Jr. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a multifunctional signaling hub. *Cell Mol Life Sci*, 76(22), 4423-4446. (2019).
106. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., & Bouvier, M. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *Embo j*, 22(15), 3816-3824. (2003).
107. Phagoo, S. B., Reddi, K., Anderson, K. D., Leeb-Lundberg, L. M., & Warburton, D. Bradykinin B1 receptor up-regulation by interleukin-1beta and B1 agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(1), 77-85. (2001).
108. Pinto, M. C., Kihara, A. H., Goulart, V. A., Tonelli, F. M., Gomes, K. N., Ulrich, H., et al. Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal*, 27(11), 2139-2149. (2015).
109. Pitcher, J., Inglese, J., Higgins, J., Arriza, J., Casey, P., Kim, C., et al. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science*, 257(5074), 1264-1267. (1992).
110. Pitcher, J. A., Freedman, N. J., & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*, 67, 653-692. (1998).
111. Raake, P. W., Zhang, X., Vinge, L. E., Brinks, H., Gao, E., Jaleel, N., et al. Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca²⁺ handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, 125(17), 2108-2118. (2012).
112. Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem Sci*, 41(12), 1035-1049. (2016).
113. Rajagopal, S., & Shenoy, S. K. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal*, 41, 9-16. (2018).
114. Ramos, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(12), 2707-2719. (2008).

115. Rankin, M. L., Marinec, P. S., Cabrera, D. M., Wang, Z., Jose, P. A., & Sibley, D. R. The D1 dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4. *Mol Pharmacol*, 69(3), 759-769. (2006).
116. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383-387. (2007).
117. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549-555. (2011).
118. Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A., & Gobeil, F. J. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol*, 348(1), 1-10. (1998).
119. Rengo, G., Pagano, G., Filardi, P. P., Femminella, G. D., Parisi, V., Cannavo, A., et al. Prognostic Value of Lymphocyte G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 Protein Levels in Patients With Heart Failure. *Circ Res*, 118(7), 1116-1124. (2016).
120. Rens-Domiano, S., & Hamm, H. E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J*, 9(11), 1059-1066. (1995).
121. Ribeiro, F. M., Ferreira, L. T., Paquet, M., Cregan, T., Ding, Q., Gros, R., 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(35), 23444-23453. (2009).
122. Ricks, T. K., & Trejo, J. Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J Biol Chem*, 284(49), 34444-34457. (2009).
123. Robinson, J. D., & Pitcher, J. A. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is a Rho-activated scaffold protein for the ERK MAP kinase cascade. *Cellular signalling*, 25(12), 2831-2839. (2013).
124. Rodriguez-Serrano, M., Rueda, J., Buendia, F., Monto, F., Agüero, J., Osa, A., et al. beta2-Adrenoceptors and GRK2 as Potential Biomarkers in Patients With Chronic Pulmonary Regurgitation. *Front Pharmacol*, 10, 93. (2019).
125. Rose, B. A., Force, T., & Wang, Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev*, 90(4), 1507-1546. (2010).
126. Roux, B. T., & Cottrell, G. S. G protein-coupled receptors: what a difference a 'partner' makes. *Int J Mol Sci*, 15(1), 1112-1142. (2014).
127. Rudomanova, V., & Blaxall, B. C. Targeting GPCR-Gβγ-GRK2 signaling as a novel strategy for treating cardiorenal pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 1883-1892. (2017).
128. 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(4), 826-831. (2000).
129. Sallese, M., Salvatore, L., D'Urbano, E., Sala, G., Storto, M., Launey, T., et al. The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J*, 14(15), 2569-2580. (2000).
130. Samaradivakara, S., Kankanamge, D., Senarath, K., Ratnayake, K., & Karunarathne, A. G protein γ (Gγ) subtype dependent targeting of GRK2 to M3 receptor by Gβγ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(1), 165-170. (2018).
131. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467. (1977).
132. Sato, T. Conserved 2nd Residue of Helix 8 of GPCR May Confer the Subclass-Characteristic and Distinct Roles through a Rapid Initial Interaction with Specific G Proteins. *Int J Mol Sci*, 20(7). (2019).
133. Schlegel, P., Reinkober, J., Meinhardt, E., Tscheschner, H., Gao, E., Schumacher, S. M., et al. G protein-coupled receptor kinase 2 promotes cardiac hypertrophy. *PLoS ONE*, 12(7), e0182110. (2017).

134. Schumacher, S. M., Gao, E., Zhu, W., Chen, X., Chuprun, J. K., Feldman, A. M., et al. Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci Transl Med*, 7(277), 277ra231. (2015).
135. Seger, R., & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9(9), 726-735. (1995).
136. Sharma, R., Randhawa, P. K., Singh, N., & Jaggi, A. S. Bradykinin in ischemic conditioning-induced tissue protection: Evidences and possible mechanisms. *Eur J Pharmacol*, 768, 58-70. (2015).
137. Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*, 32(9), 521-533. (2011).
138. Smith, J. S., & Rajagopal, S. The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem*, 291(17), 8969-8977. (2016).
139. Srivastava, A., Gupta, B., Gupta, C., & Shukla, A. K. Emerging Functional Divergence of beta-Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends Endocrinol Metab*, 26(11), 628-642. (2015).
140. Steinberg, S. F. The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Mol Pharmacol*, 67(1), 2-11. (2005).
141. Sterne-Marr, R., Tesmer, J. J., Day, P. W., Stracquatano, R. P., Cilente, J. A., O'Connor, K. E., 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(8), 6050-6058. (2003).
142. Steury, M. D., Lucas, P. C., McCabe, L. R., & Parameswaran, N. G-protein-coupled receptor kinase-2 is a critical regulator of TNFalpha signaling in colon epithelial cells. *Biochem J*, 474(14), 2301-2313. (2017).
143. Steury, M. D., McCabe, L. R., & Parameswaran, N. G Protein-Coupled Receptor Kinases in the Inflammatory Response and Signaling. *Adv Immunol*, 136, 227-277. (2017).
144. Strotmann, R., Schrock, K., Boselt, I., Staubert, C., Russ, A., & Schoneberg, T. Evolution of GPCR: change and continuity. *Mol Cell Endocrinol*, 331(2), 170-178. (2011).
145. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol*, 428(19), 3850-3868. (2016).
146. Tarrant, T. K., Rampersad, R. R., Esserman, D., Rothlein, L. R., Liu, P., Premont, R. T., et al. Granulocyte chemotaxis and disease expression are differentially regulated by GRK subtype in an acute inflammatory arthritis model (K/BxN). *Clin Immunol*, 129(1), 115-122. (2008).
147. Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., & Tesmer, J. J. Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science*, 310(5754), 1686-1690. (2005).
148. Tiruppathi, C., Yan, W., Sandoval, R., Naqvi, T., Pronin, A. N., Benovic, J. L., et al. G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13), 7440-7445. (2000).
149. Trejo, J. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(2), 437-442. (2003).
150. Trejo, J., Hammes, S. R., & Coughlin, S. R. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13698-13702. (1998).
151. Tscharre, M., Michelson, A. D., & Gremmel, T. Novel Antiplatelet Agents in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 25(3), 191-200. (2020).
152. Tutunea-Fatan, E., Caetano, F. A., Gros, R., & Ferguson, S. S. GRK2 targeted knock-down results in spontaneous hypertension, and altered vascular GPCR signaling. *J Biol Chem*, 290(8), 5141-5155. (2015).
153. 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(2), 454-463. (1993).

154. Violin, J. D., Ren, X. R., & Lefkowitz, R. J. G-protein-coupled receptor kinase specificity for beta-arrestin recruitment to the beta2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 281(29), 20577-20588. (2006).
155. von Kriegsheim, A., Baiocchi, D., Birtwistle, M., Sumpton, D., Bienvenut, W., Morrice, N., et al. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1458-1464. (2009).
156. Vroon, A., Kavelaars, A., Limmroth, V., Lombardi, M. S., Goebel, M. U., Van Dam, A. M., et al. G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 174(7), 4400-4406. (2005).
157. Welte, B. Rolle der Rezeptorkinasen GRK-2 und GRK-3 für die Regulation des humanen B2 Bradykinin Rezeptors. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2013).
158. 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(5), 1174-1178. (1986).
159. Wilden, U., Wüst, E., Weyand, I., & Kühn, H. Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. *FEBS Lett*, 207(2), 292-295. (1986).
160. Willets, J. M., Challiss, R. A., & Nahorski, S. R. Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci*, 24(12), 626-633. (2003).
161. Willets, J. M., Nahorski, S. R., & Challiss, R. A. Roles of phosphorylation-dependent and -independent mechanisms in the regulation of M1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 280(19), 18950-18958. (2005).
162. 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(17), 4157-4162. (2004).
163. Wirth, M. Bedeutung der beta-Arrestine und der G-Protein gekoppelten-Rezeptor Kinasen für die Regulation des humanen Bradykinin B2 Rezeptors. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2011).
164. Wolters, V., Krasel, C., Brockmann, J., & Bunemann, M. Influence of galphaq on the dynamics of m3-acetylcholine receptor-g-protein-coupled receptor kinase 2 interaction. *Mol Pharmacol*, 87(1), 9-17. (2015).
165. Wortzel, I., & Seger, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*, 2(3), 195-209. (2011).
166. Xin, H., Wang, Y., Todd, M. J., Qi, J., & Minor, L. K. Evaluation of No-Wash Calcium Assay Kits: Enabling Tools for Calcium Mobilization. *Journal of Biomolecular Screening*, 12(5), 705-714. (2007).
167. Yoon, S., & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21-44. (2006).
168. Yu, S., Sun, L., Jiao, Y., & Lee, L. T. O. The Role of G Protein-coupled Receptor Kinases in Cancer. *Int J Biol Sci*, 14(2), 189-203. (2018).
169. Zhou, X. E., He, Y., de Waal, P. W., Gao, X., Kang, Y., Van Eps, N., et al. Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, 170(3), 457-469.e413. (2017).

J Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alexander Faußner für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung. Es gelang ihm eine ausgewogene Balance zwischen experimentellem Freiraum und strategischer Unterstützung zu gewähren und mich dadurch bestmöglich wissenschaftlich zu fordern und zu fördern. Bei Fragen oder Herausforderungen stand er allzeit als kompetenter Ansprechpartner zur Verfügung und trug Dank seiner wissenschaftlichen Expertise, seines Engagements und seiner Forschungsbegeisterung entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Christian Weber danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren.

Danken möchte ich auch der Leiterin unserer Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. Sabine Steffens für die Unterstützung, die kritische Auseinandersetzung mit meinem Thema und die wertvollen Impulse, die zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann danke ich stellvertretend für die Organisation des Promotionsstudiengangs "Molekulare Medizin" im Rahmen des Programms "Förderung für Forschung und Lehre" der medizinischen Fakultät der LMU München.

Herzlich danken möchte ich dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Kamyar Hadian und Frau Dr. Jara Brenke von der *Assay Development and Screening Platform* des Helmholtz Zentrums München für die gute Zusammenarbeit und Kooperation im Rahmen der p-ERK1/2 Messungen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rainer Haas des Max von Pettenkofer-Instituts danke ich für die Bereitschaft, mir uneingeschränkt die Nutzung ihres Plateraders zu gestatten und dadurch den Fortgang meiner Doktorarbeit zu sichern.

Frau Dr. Larissa Ring, Frau Dr. Martina Rami und Frau Cornelia Seidl danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit. Ihre Geduld, Unterstützung und Hilfsbereitschaft haben mir bei meiner experimentellen Arbeit sehr geholfen. Danke auch für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Ich danke meinem Mitdoktoranden Herrn Dr. Maximilian Schloss der gemeinsam mit mir die Tage und auch manche Nacht im Labor verbrachte und Frau Dr. Giovanna Leoni für die unkomplizierte Hilfe, falls unser Fluoreszenzfarbstoff einmal zur Neige ging.

Außerdem danke ich dem ganzen Team der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christian Sommerhoff und von Herrn Prof. Dr. Christian Ries. Besonders danke ich Frau Dr. Virginia Egea und Herrn Dr. Donato Santovito, die nicht nur als Labornachbarn eine hilfsbereite und herzliche Atmosphäre geschaffen haben, sondern auch für Fragen und Sorgen jederzeit ein offenes Ohr hatten.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten für die gute Zusammenarbeit.

Darüber hinaus danke ich ganz besonders meinen Eltern, Karola und Herbert Deininger, für ihre stetige Unterstützung weit über diese Arbeit hinaus, ihren Einsatz für mich und ihre Beharrlichkeit.

Abschließend danke ich allen, die mich auf meinem Weg unterstützt, bestärkt und gefördert haben, ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

K Publikationen

Publikationen

Im Zusammenhang mit dieser Dissertationsarbeit sind zwei Publikationen mit den Titeln

Kinase dependent and independent regulation of receptor signaling through G protein-coupled receptor kinases

und

Poly-lysine and poly-ethylenimine promoted cell adherence: a simple alternative to plate pre-coating

als Manuskripte vor der Einreichung.

Vorträge

TranslaTUM Mini-Symposium 2019: From the frying pan into the fire: proteases and receptors in disease
(12.03.2019, München).

Vortragstitel: Regulation of B1 and B2 bradykinin receptors by G protein-coupled receptor kinases

KININ 2018: International Kinin Meeting
(17.06. – 20.06.2018, Cleveland, Ohio, USA).

Vortragstitel: Regulation of differentially coupled G protein-coupled receptors through non-visual G protein-coupled receptor kinases

Poster

KININ 2015: International Meeting on Kinin System and Peptide Receptors
(28.06. – 01.07.2015, São Paulo, Brasilien).

Deininger M, Brenke JK, Steffens S, Weber C, Hadian K, Faussner A.

Kinase dependent and independent regulation of GPCR signaling through G protein-coupled receptor kinases

Posterpreis - DoktaMed 2015: Doktorarbeitstage Medizin der LMU München
(20.06.2015, München).

Deininger M, Brenke JK, Steffens S, Weber C, Hadian K, Faussner A.

Kinase dependent and independent regulation of GPCR signaling through G protein-coupled receptor kinases