

# Mechanismen der agonist-selektiven Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Somatostatin-Rezeptoren



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Diplom-Biologin Andrea Kliever**

Geboren am 14.01.1984 in Jena

Jena, am 11. November 2013

**Gutachter:****1. Prof. Dr. Stefan Schulz**

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Schiller Universität, Jena

**2. Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer**

Institut für Molekulare Zellbiologie, Friedrich-Schiller Universität, Jena

**3. Prof. Dr. Günter Stalla**

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

**Tag der öffentlichen Disputation: 13.02.2014**

*Für meine Eltern  
Garnet und Jürgen Kliewer*

„Ein Element des Erfolges, egal in welchem Beruf, ist die Lust am Handwerk, aber ich glaube, das gilt besonders für die wissenschaftliche Arbeit. Die Wissenschaft hat darin etwas mit der Kunst gemein: Wissen und Intelligenz, ohne Liebe zur Forschung, machen noch keinen Gelehrten, so wie natürlich vorhandenes Talent samt Studium keinen Künstler aus demjenigen machen, der ohne Liebe zur Kunst ist.“

*Irène Joliot-Curie (1897-1956), Nobelpreis für Chemie 1936*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren</b>	<b>5</b>
2.1.1	Liganden und G-Proteine	7
2.1.2	Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren: De- und Resensibilisierung	9
2.1.3	$\beta$ -Arrestine	12
2.1.4	Dephosphorylierung desensibilisierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	15
<b>2.2</b>	<b>Somatostatin und seine Rezeptoren</b>	<b>18</b>
2.2.1	Somatostatin	18
2.2.2	Stabile Somatostatin-Analoga	19
2.2.2.1	Octreotid	20
2.2.2.2	Pasireotid	21
2.2.2.3	Weiter klinisch relevante Somatostatin-Analoga	22
2.2.3	Somatostatin-Rezeptoren	22
2.2.4	Somatostatin-Rezeptor $sst_2$ : Phosphorylierung und Dephosphorylierung	24
2.2.5	Somatostatin-Rezeptor $sst_5$ : Phosphorylierung und Dephosphorylierung	27
<b>2.3</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MANUSKRIPTE</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Manuskript I</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Manuskript II</b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Manuskript III</b>	<b>67</b>

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>96</b>
<b>4.1</b>	<b>Agonist-selektive Somatostatin-Rezeptor-Phosphorylierung</b>	<b>96</b>
4.1.1	Agonist-selektive Phosphorylierung durch verschiedene Somatostatin-Analoga	96
4.1.2	Physiologische Relevanz	98
<b>4.2</b>	<b>Regulation der Dephosphorylierung von Somatostatin-Rezeptoren</b>	<b>101</b>
4.2.1	Spezifität der Proteinphosphatase 1	101
4.2.2	Die Rolle von $\beta$ -Arrestin1 und $\beta$ -Arrestin2 bei der sst <sub>2</sub> -Rezeptor-Dephosphorylierung	105
4.2.3	Physiologische Relevanz	108
<b>4.3</b>	<b>Offene Fragen</b>	<b>109</b>
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerung und Hypothese</b>	<b>110</b>
<b>5</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHER BEITRAG</b>	<b>137</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>140</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) stellt die größte Gruppe der Signalproteine dar und zählt zu den wichtigsten Zielstrukturen in der heutigen Arzneimittelwelt. Die Entwicklung neuer Medikamente gegen GPCRs ist getrieben von der Suche nach Verbindungen welche nanomolare und subnanomolare Bindungsaffinitäten aufweisen. Immer mehr deutet darauf hin, dass für viele GPCRs mehrere aktive Konformationen existieren und somit selektiv spezifische Signalwege aktiviert werden können. Die Desensibilisierung des GPCR Signals ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Viele GPCRs werden agonist-abhängig über die Phosphorylierung von intrazellulären Serin- und Threoninresten im C-Terminus des Rezeptors koordiniert. Diese Phosphorylierung erleichtert die Bindung von  $\beta$ -Arrestin und führt zur Desensibilisierung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion.  $\beta$ -Arrestin dient darüber hinaus als *Scaffold*- und Adapterprotein und ist somit in der Lage die Rezeptor-Internalisierung zu erleichtern und eine zweite Welle der Signaltransduktion auszulösen.

Die Entwicklung neuer Pan-Somatostatin-Analoga war bisher darauf gerichtet, Substanzen zu entwickeln, die möglichst hohe Affinitäten zu mehr als einem der fünf Somatostatin-Rezeptoren haben ( $sst_1$ - $sst_5$ ). Die für den klinischen Einsatz neu entwickelten Somatostatin-Analoga Pasireotid (SOM230), Octreotid und Somatoprim (DG3173) sind Multirezeptor-Liganden und wurden bis jetzt nur durch ihr Bindungsprofil charakterisiert. Ihre Fähigkeit einzelne Somatostatin-Rezeptorsubtypen zu aktivieren wurde bis jetzt noch nicht direkt untersucht. Um die Rezeptoraktivierung der einzelnen Somatostatin-Rezeptoren messen zu können wurde der C-Terminus des  $sst_2$ -Rezeptors mit dem von anderen Rezeptor-Subtypen ausgetauscht. Dieses Vorgehen erlaubte die Verwendung der phospho- $sst_2$  Antikörper zur Messung der  $sst_5$ - und  $sst_3$ -Aktivierung. Unsere Untersuchungen ergaben unerwartet neue Wirkungsprofile von Pasireotid, Octreotid und Somatoprim. Pasireotid zeigte eine hohe agonistische Aktivität am  $sst_3$ - und  $sst_5$ -Rezeptor aber nur schwache partialagonistische Eigenschaften am  $sst_2$ -Rezeptor. Octreotid hingegen ist ein voller Agonist am  $sst_2$ -Rezeptor und zeigte keine sichtbare agonistische Aktivität am  $sst_5$ -Rezeptor. Folglich wurde Pasireotid als bevorzugter  $sst_5$ - und Octreotid als bevorzugter  $sst_2$ -Liganden identifiziert. Im Gegensatz dazu ist

---

Somatoprim einzigartig, da es ein potenter Agonist an  $sst_2$ - und  $sst_5$ -Rezeptoren ist. Daraus resultiert, dass der  $sst_2$ -C-Terminus als Phosphorylierungssonde zur direkten Messung der GPCR-Aktivierung eingesetzt werden kann und somit weitere pharmakologisch wichtige Somatostatin-Analoga charakterisiert werden können.

Kürzlich konnten durch die Kombination von phospho-spezifischen Antikörpern, chemischen Proteinphosphatase-Inhibitoren und siRNA *knock down-Screening*, die GPCR-Proteinphosphatase PP1 $\beta$  für die Dephosphorylierung des  $sst_2$ -Rezeptor und die PP1 $\gamma$  für den  $sst_5$ -Rezeptor identifiziert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für verschiedene GPCRs spezifische PP1-Isoformen existieren, welche mit bemerkenswerter Selektivität rekrutiert werden. So wurde erstmals beschrieben, dass ein C-terminaler Austausch zwischen Rezeptoren der Klassen A und B nicht nur zu einer Umkehr der PP1-Spezifität, sondern auch der  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung und der damit einhergehenden Internalisierung führt. Hierbei stellen die C-terminalen Bereiche der GPCRs wichtige Determinanten für die Selektivität der PP1 dar. Diese unterschiedliche Rekrutierung hat wiederum tiefgreifende Konsequenzen für die Dynamik der Dephosphorylierung und das *Trafficking* von GPCRs.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig  $\beta$ -Arrestin1 als eine potentielle regulatorische Untereinheit der PP1 identifiziert werden, welche die schnelle PP1 $\beta$ -vermittelte Dephosphorylierung an GPCRs katalysiert. Die durch den  $\beta$ -Arrestin1/PP1 $\beta$ -Komplex vermittelte Dephosphorylierung ist ein streng regulierter Prozess, der unmittelbar nach der Rezeptoraktivierung und Phosphorylierung eingeleitet wird. Die schnelle GPCR Dephosphorylierung durch PP1 ist ein entscheidender Schritt für eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Funktionen, einschließlich (I) Rezeptor-Resensibilisierung, (II) Beendigung des  $\beta$ -Arrestin-Signals sowie (III) Einleitung der endosomalen G-Protein-Signaltransduktion.

Diese Arbeit trägt zum tiefgreifenden Verständnis der molekularen Mechanismen von De- und Resensibilisierung vieler GPCRs sein.



---

## Summary

G protein-coupled receptors (GPCRs) family are the largest group of signaling proteins and today one of the most important targets in pharmaceutical industry. The development of new drugs targeting GPCRs is primarily focused on the discovery of compounds with nanomolar and subnanomolar binding affinities. Accumulating evidence suggests that more than one active conformation exists for many GPCRs and that many compounds selectively stimulate specific signaling pathways. Desensitization of GPCR signals is essential for the maintenance of cellular homeostasis. Many GPCRs are coordinated via the agonist-dependent phosphorylation of intracellular serine and threonine residues in the C-terminus of the receptor. This phosphorylation facilitates the binding of  $\beta$ -arrestin and leads to desensitization of G protein-dependent signaling. In addition,  $\beta$ -arrestin serves as a scaffold and adapter protein, which is able to facilitate receptor internalization and to initiate a second wave of signaling.

The development of novel pan-somatostatin analogs has previously primarily focused on the discovery of compounds with high affinities to more than one of the five somatostatin receptors ( $sst_1$ - $sst_5$ ). The newly developed multireceptor somatostatin analogs pasireotide (SOM230), octreotide and somatoprim (DG3173), which were developed for clinical use, have, until now, primarily been characterized according to their binding profiles. However, their ability to activate individual somatostatin receptor subtypes has not been directly investigated so far. In order to be able to measure the receptor activation for the individual somatostatin receptor, the C-terminal of the  $sst_2$  receptor was transplanted into other somatostatin receptors. When this occurs, a set of three  $sst_2$  phosphosite-specific antibodies can be used to measure receptor activation of the  $sst_3$  and  $sst_5$  receptors. Our analysis revealed unexpected new efficacy profiles for pasireotide, octreotide and somatoprim. Pasireotide showed potent agonistic activity at the  $sst_3$  and  $sst_5$  receptor but only weak partial agonistic properties at the  $sst_2$  receptor. However, Octreotide, on the other hand, is a full agonist at the  $sst_2$  receptor but exhibited no visible agonistic activity at the  $sst_5$  receptor. Consequently, Pasireotide was identified as  $sst_5$ -preferring ligand and octreotide as a  $sst_2$ -preferring ligand. In contrast, somatoprim is unique in that it is a potent agonist at both  $sst_2$  and  $sst_5$  receptors. As a result of that

---

the sst<sub>2</sub> C-terminus can be used as a phosphorylation probe for direct assessment of GPCR activation and thus further important pharmacological somatostatin analogs can be characterized.

We have recently identified, by using a combination of phosphosite-specific antibodies, chemical phosphatase inhibitors and siRNA knock down screening, a GPCR protein phosphatase PP1 $\beta$  for dephosphorylation of the sst<sub>2</sub> receptor and PP1 $\gamma$  of the sst<sub>5</sub> receptor. In this work it could be shown that for different GPCRs may exist specific PP1 isoforms, which are recruited with remarkable selectivity. Our findings suggest that swapping the C-terminal tails between class A and B receptors led not only to reversal of the PP1 specificity but also to complete reversal of the  $\beta$ -arrestin recruitment and internalization. This GPCR phosphatase selectivity is primarily determined by C-terminal receptor domains. Recruitment of different GPCR phosphatases has in turn profound consequences for the dephosphorylation dynamics and trafficking patterns of GPCRs.

In the present work,  $\beta$ -arrestin1 could be identified as the first PP1 targeting subunit required for rapid PP1 $\beta$ -mediated GPCR dephosphorylation. GPCR dephosphorylation by the  $\beta$ -arrestin1-PP1 $\beta$  complex is a highly regulated process that is initiated immediately after receptor activation and phosphorylation. We propose that rapid GPCR dephosphorylation by PP1 is a crucial step in a variety of distinct interdependent cellular functions including (I) receptor resensitization, (II) termination of  $\beta$ -arrestin signaling and (III) initiation of endosomal G protein signaling. This work contributes to understanding of the molecular mechanisms of de- and resensitization for many GPCRs.

---

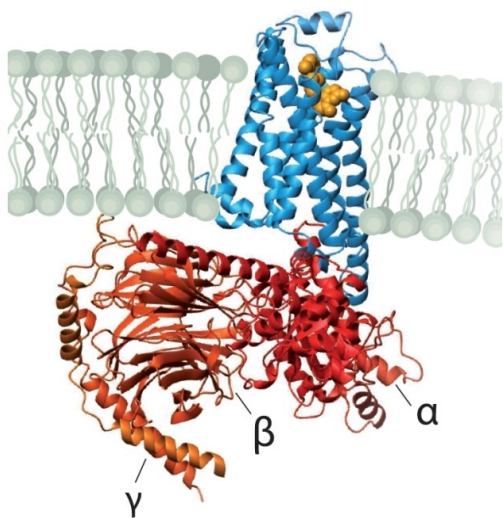
## 2 Einleitung

### 2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Im Jahr 2012 ging der Nobelpreis für Chemie „*for studies of G protein-coupled receptors (GPCRs)*“ gemeinsam an zwei amerikanische Wissenschaftler – Robert J. Lefkowitz von der Duke University in Durham, North Carolina und Brian K. Kobilka von der Stanford University School of Medicine in Palo Alto, California. Die wissenschaftliche Leistung von Lefkowitz und Kobilka erlaubte der Pharmazeutischen Industrie durch ein besseres Verständnis der Signalmechanismen endogener Substanzen wie Adrenalin, Serotonin, Histamin, Dopamin und vielen anderen Hormonen und Neurotransmittern neue und selektive Medikamente zu entwickeln mit der Hoffnung auf geringere Nebenwirkungen. Dies stellte nicht nur einen Meilenstein in der Erforschung der pharmakologisch bedeutendsten Proteingruppe dar, sondern eröffnete auch neue Möglichkeiten der Arzneimittelforschung. So zählen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zu den wichtigsten Zielstrukturen in der heutigen Arzneimittelwelt. Sie sind die Zielstruktur von annähernd 40% aller klinisch angewandten pharmazeutischen Wirkstoffe (Brink et al., 2004; Millar and Newton, 2009; Wise et al., 2002; Overington et al., 2006).

Die Familie der GPCRs stellt mit mindestens 100 kodierten Genen (Säugetiere) die größte Gruppe der Signalproteine dar (Kohout and Lefkowitz, 2003; Shukla et al., 2008). Innerhalb der membrangebundenen Rezeptoren zeigen sie die größte Diversität und treten in Vertebraten, Pflanzen, Pilzen und Protozoen auf (Bockaert and Pin, 1999). Als Rezeptoren reagieren sie auf eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli, wie z.B. Hormone, Pheromone, Chemokine, Calcium-Ionen oder Neurotransmitter und sind auch sensorische Rezeptoren für verschiedene Geruchs- und Geschmacksstoffe oder Photonen (Ferguson, 2001). GPCRs bilden eine große Superfamilie mit bisher ca. 800 bekannten Vertretern und werden nach ihrer Funktion in sechs Hauptfamilien eingeteilt. Die umfangreichsten sind hierbei die Rhodopsin-Familie (Klasse A), die Sekretin-Familie (Klasse B) und die Glutamat-Familie (Klasse C), gefolgt von drei kleineren Familien: den Pilz-Rezeptoren (Klasse D), den

zyklischen-AMP-Rezeptoren (Klasse E) und den Frizzled/Taste2-Rezeptoren (Klasse F) (Millar and Newton, 2009; Park et al., 2008; Latek et al., 2012). Ein alternatives System der Klassifizierung der humanen GPCRs wurde basierend auf den phylogenetischen Untersuchungen vorgeschlagen und als GRAFS Klassifizierung oder Fredriksson-System bezeichnet (Schiøth and Fredriksson, 2005). Diesem System zufolge werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in fünf Hauptgruppen unterteilt: in die Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Gruppe (Schiøth and Fredriksson, 2005; Latek et al., 2012). Gemeinsam ist allen der homologe Aufbau mit einem extrazellulären Amino- (N-) und einem intrazellulären Carboxyl-Terminus (C-Terminus), sowie sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, welche jeweils durch drei intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Lohse, 1993; Heilker et al., 2009) (Abb. 1). Aus diesem Grund werden GPCRs auch Siebentransmembranrezeptoren (7TM) genannt.



**Abb. 1: Aufbau von GPCRs am Beispiel des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors.**

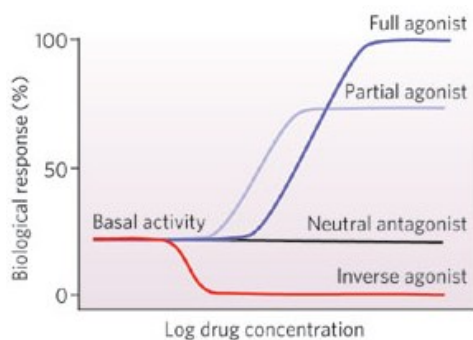
Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors, wie sie von Brian K. Kobilka kristallisiert wurde (blau). In Orange ist ein Ligand dargestellt, der an der N-terminalen Seite des Rezeptors gebunden ist. Die rote Struktur stellt das heterotrimere G-Protein dar (aus The Royal Swedish Academy of Sciences).

Der extrazellulär liegende N-Terminus dient durch seine Glykosylierungsmuster und Disulfidbrücken der Bindung von Liganden, die von einfachen Molekülen wie Ionen bis zu komplexen Substanzen wie Polypeptiden reichen. Die Transmembrandomänen dienen hauptsächlich der Verankerung des Rezeptors in der Membran, ermöglichen die Bildung von Oligomeren und sorgen für die Weiterleitung des durch Konformationsänderung erzeugten Signals auf die zytosolische Seite. Die Membranständigkeit wird zusätzlich durch die Interaktion mit verschiedenen Gerüstproteinen wie Spinophilin, Homer, Actin-bindendes Protein 280/Filamin A, Protein 4.1, Muskelin und Postsynaptische-Dichte-95 erreicht (Tan et

al., 2004). Der C-Terminus als intrazelluläre Domäne aktiviert spezielle Signalkaskaden. Die größte strukturelle Divergenz zwischen den verschiedenen GPCR-Untergruppen liegt dabei in den extrazellulären Schleifen und der Liganden-Bindungs-Domäne (Krauss 4th Edition; Rosenbaum et al., 2009).

### 2.1.1 Liganden und G-Proteine

Die spezifische Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor ist die Voraussetzung für die meisten Pharmakonwirkungen. Hierbei muss die Zelle viele extrazelluläre Stimuli in intrazelluläre Signale umwandeln und daraus biologische Antworten generieren. GPCRs können nach spezifischer Bindung eines Liganden eine Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden innerhalb der Zelle auslösen. Nach ihren Effekten auf die Signaltransduktion können Liganden dabei in 1) Vollagonisten mit einer maximalen Rezeptorstimulation, 2) Partialagonisten mit nicht kompletter Aktivierung selbst in gesättigten Konzentrationen, 3) neutrale Antagonisten ohne Wirkung auf die Aktivierung und 4) inverse Agonisten, die das basale Level der Aktivierung ohne Agonisten weiter senken, eingeteilt werden (Rosenbaum et al., 2009) (Abb. 2). Zusätzlich wurde in den letzten Jahren für die GPCRs der Begriff *biased agonism* oder *ligand bias* eingeführt. Es beschreibt die funktionelle Selektivität eines Liganden, der nach Bindung an den Rezeptor bevorzugt einen oder mehrere mögliche Signaltransduktionswege aktivieren kann (Violin and Lefkowitz, 2007; Rajagopal et al., 2011; Reiter et al., 2012). Dabei kann er *biased* in Bezug auf die G-Protein- (*G Protein-biased*) oder  $\beta$ -Arrestin-vermittelte ( *$\beta$ -arrestin-biased*) Signaltransduktion sein (Whalen et al., 2010).



**Abb. 2: Wirkungsstärke von Liganden.**

Viele GPCRs bilden eine basale, Agonisten-unabhängige Aktivität aus. Der inverse Agonist inhibiert diese Aktivität und ein neutraler Antagonist hat keinen Effekt darauf. Ein Vollagonist und Partialagonist stimuliert die biologische Antwort über das Level der basalen Aktivität hinaus (Rosenbaum et al., 2009).

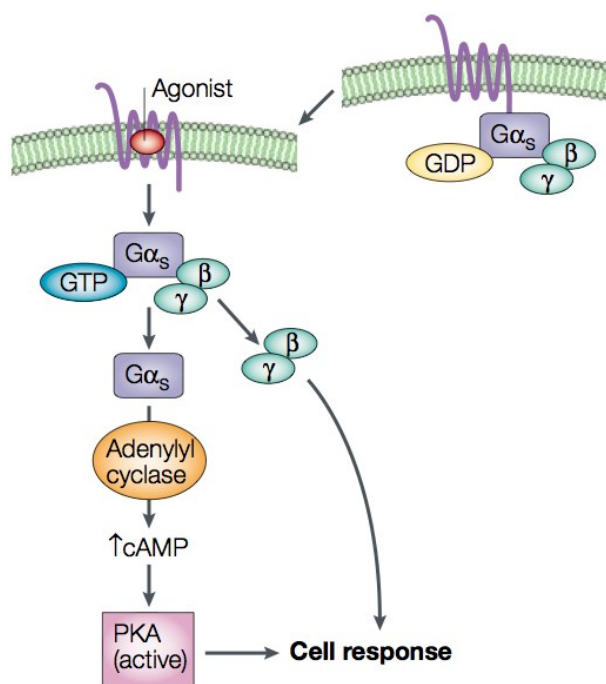
Ursprünglich wurden GPCRs als Rezeptoren entdeckt, welche spezifisch an heterotrimere Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) koppeln können und extrazelluläre Signale an intrazelluläre Effektoren weiterleiten (Abb. 1). Inzwischen wurden auch G-Protein-unabhängige Signalwege über proto-onkogene (c-Src) und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) nachgewiesen (Rajagopal et al., 2005; Ferguson, 2001; Lefkowitz et al., 2006; Luttrell, 2008). Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (Pierce et al., 2002). Bis heute sind 21 verschiedene  $G\alpha$ -, 5  $G\beta$ - und 12  $G\gamma$ -Untereinheiten bekannt (Wettschureck and Offermanns, 2005), welche selektiv an entsprechend aktivierte GPCRs binden (Wess, 1998) und eine für den Rezeptor spezifische Signaltransduktion hervorrufen (Oldham and Hamm, 2008; Neves et al., 2002; Park et al., 2008). Für die Signaltransduktion ist insbesondere die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins von großer Bedeutung und dient gleichzeitig auch als molekularer Schalter (Tab. 1). Das  $\beta\gamma$ -Dimer ist ebenfalls in der Lage Signalwege zu kontrollieren (Clapham and Neer, 1997).

**Tab. 1: Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine (in Anlehnung an Pierce et al., 2002).**

Klasse	Untereinheiten	Signaltransduktion
$G_s$	$G\alpha_s, G\alpha_{olf}$	- Aktivierung der Adenylatzyklase (AC)
$G_{i/o}$	$G\alpha_1, G\alpha_{i2}, G\alpha_{i3}, G\alpha_o, G\alpha_z,$ $G\alpha_t$	- Hemmung der AC - Aktivierung der zyklischen Guanosinmonophosphat Phosphodiesterase (cGMP PDE)
$G_{q/11}$	$G\alpha_q, G\alpha_{11}, G\alpha_{14}, G\alpha_{15},$ $G\alpha_{16}$	- Aktivierung der Phospholipase C $\beta$ (PLC $\beta$ )
$G_{12/13}$	$G\alpha_{12}, G\alpha_{13}$	- Aktivierung der Rho-GDP
$G\beta\gamma$	$G\beta\gamma$	- Aktivierung der AC, PLC $\beta$ , Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K $\gamma$ )

Heterotrimere G-Proteine werden nach Agonistenbindung an den GPCR und die dadurch ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors aktiviert. Der GPCR dient dabei als sogenannter GTP-Austauschfaktor (GEF), welcher GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat) der  $G\alpha$ -Untereinheit austauscht und damit das G-Protein aktiviert. Dieses teilt sich in eine  $G\alpha$ -GTP-Untereinheit und ein  $\beta\gamma$ -Dimer auf, welche jeweils neue Signalwege einleiten (Pierce et al., 2002). Die Hydrolyse von GTP zu GDP wird durch die Regulatoren der G-

Protein-Signalweitergabe (RGS) katalysiert. Die intrinsische GTPase Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit führt zur Hydrolyse von GTP zu GDP und somit zur Reassoziierung von  $G\alpha$ -GDP und des  $\beta\gamma$ -Dimers, was zur Terminierung des Signals und des Aktivierungszyklus führt (De Vries et al., 2000). GPCRs sind jedoch auch in der Lage nicht nur ein spezifisches G-Protein sondern mehrere zu aktivieren (Abb. 3) (Latek et al., 2012).



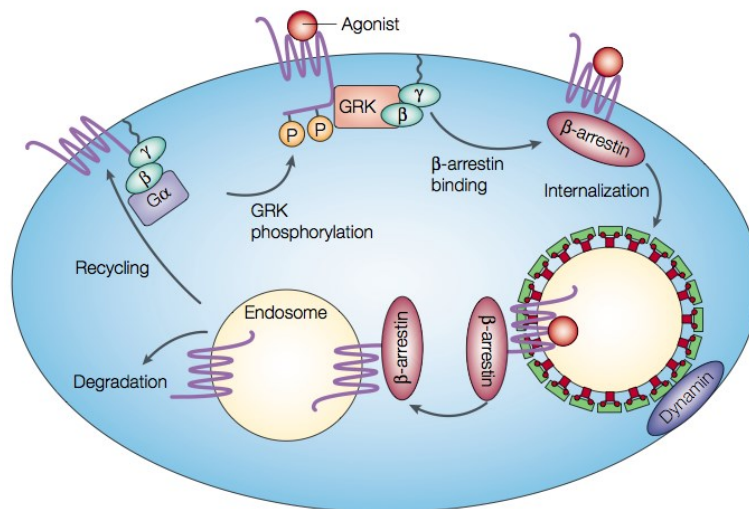
**Abb. 3: G-Protein-Aktivierung und Signaltransduktion.**

In Abwesenheit vom Agonisten, hier am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors, befindet sich der Rezeptor im inaktiven Zustand. In dieser Konformation bindet GDP an die  $G\alpha$ -Untereinheit. GDP wird nach Bindung des Agonisten durch GTP ausgetauscht, wodurch eine Konformationsänderung des Rezeptors ausgelöst wird. Das G-Protein dissoziiert vom Rezeptor ab und teilt sich in die  $G\alpha$ -Untereinheit und das  $\beta\gamma$ -Dimer auf, die weitere Signalwege aktivieren. Als Beispiel dafür ist hier das  $G\alpha_s$  gezeigt, das die Adenylatcyclase aktiviert, den cAMP-Spiegel erhöht und dadurch die Proteinkinase A aktiviert (Pierce et al., 2002).

### 2.1.2 Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren: De- und Resensibilisierung

Eine vielfältige Regulation der Signalweitergabe findet auch auf der Ebene des Rezeptors statt. Nach Agonistenbindung und Konformationsänderung werden die Rezeptorproteine durch Desensibilisierung, Internalisierung und Downregulation beeinflusst. Der initiale Schritt für diese Prozesse ist die agonist-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors (Abb. 4). Diese wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) oder auch heterolog durch *second-messenger*-aktivierte

Kinasen wie Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase C (PKC) vermittelt (Krupnick and Benovic, 1998; Pierce et al., 2002; Marchese et al., 2008; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008).



**Abb. 4: Regulation der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.** Die Aktivierung des GPCRs durch Ligandenbindung führt zur Dissoziation des G-Proteins. Daraufhin kommt es durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) zur Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste in der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus des Rezeptors.  $\beta$ -Arrestin bindet an das Phosphat-Cluster und der Rezeptor wird über Clathrin-beschichtete Vesikel internalisiert (Desensibilisierung). Im sauren Milieu der frühen Endosomen wird der Ligand vom Rezeptor abgespalten. Anschließend wird der Rezeptor dephosphoryliert und entweder zur Plasmamembran zurücktransportiert (Resensibilisierung) oder proteolytisch abgebaut (Downregulierung) (Pierce et al., 2002).

Die GRKs gehören zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen, bestehen aus 7 Mitgliedern und besitzen untereinander hoch konservierte Aminosäuresequenzen und Strukturmerkmale (Penela et al., 2006; Ferguson, 2001). GRK 2, 3, 5 und 6 weisen im Körper die höchsten Expressionslevel auf und spielen eine wesentliche Rolle bei der GPCR-Phosphorylierung. Die GRKs 2 und 3 befinden sich im basalen Zustand im Zytosol und translozieren erst nach Agonisten-Bindung zur Zellmembran, wo sie an die  $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine koppeln (Pitcher et al., 1992). GRK 5 und 6 hingegen translozieren ständig zur Membran, was bei GRK 6 durch einen Palmityl-Anker (Stoffel et al., 1994) und bei GRK 5 durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem basischen C-Terminus und den Phospholipiden der Plasmamembran vermittelt wird (Pitcher et al., 1992). GRKs phosphorylieren



---

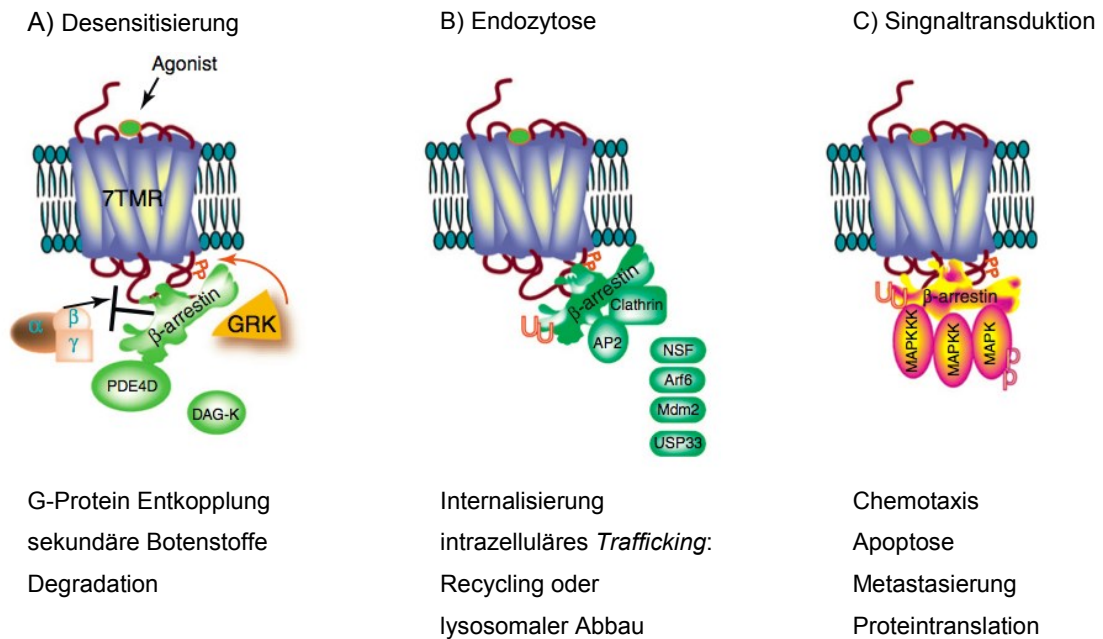
dabei sehr schnell intrazelluläre Serin- und Threonin-Reste im C-Terminus und der dritten intrazellulären Schleife der GPCRs (Hipkin et al., 2000). In den letzten Jahren wurde im Zusammenhang mit der GRK-induzierten Phosphorylierung der Begriff „Barcode“ geprägt (Reiter et al., 2012; Nobles et al., 2011). Hierbei kommt es je nach Aktivierung des Rezeptors zu einem GRK-abhängigen Phosphorylierungsmuster der Serin- und Threoninreste am C-Terminus des Rezeptors, was die Stärke der  $\beta$ -Arrestin Rekrutierung und somit das intrazelluläre *Trafficking* vieler GPCRs reguliert (Reiter and Lefkowitz, 2006; Kim et al., 2005; Oakley et al., 2001; Oakley et al., 2000; Shenoy et al., 2006). Die Phosphorylierung des Rezeptors bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Bindung von  $\beta$ -Arrestin, was zur Entkopplung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion führt und somit die Desensibilisierung und Internalisierung einleitet (Premont and Gainetdinov, 2007; Kohout and Lefkowitz, 2003) (Abb. 4). Dabei entspricht die Desensibilisierung der Inhibition der Signalweitergabe, die bis zu einer Verringerung von 80% des G-Protein-vermittelten Signals führen kann (Kohout and Lefkowitz, 2003; Lohse, 1993). Die Internalisierung entspricht der Endozytose des Rezeptors, welche über Adaptorprotein-2 (AP-2) (Laporte et al., 2000), Clathrin (Goodman et al. 1996), zelluläre proto-onkogene Tyrosinkinase (c-Src) (Ahn et al., 1999) und der GTPase Dynamin (Damke et al., 1994) vermittelt wird. Auf diese Weise wird der Rezeptor von der Membran gelöst, durch Endozytose internalisiert und der endosomalen Sortierung zugeführt (Hanyaloglu and von Zastrow, 2008). Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit einer Interaktion zwischen  $\beta$ -Arrestin, AP-2 und Clathrin, die unabhängig vom gebundenen Rezeptor stattfindet. Eine konstitutive Rezeptor-Internalisierung kann ebenfalls beobachtet werden, welche jedoch wesentlich schwächer ausfällt als in Anwesenheit eines Agonisten. So beträgt die durchschnittliche Dauer der Zellmembranlokalisation für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta_2$ -AR) nach Agonistengabe zehn Minuten, hingegen ohne Agonist mehr als eine Stunde (von Zastrow and Kobilka, 1994). Weitere Mechanismen für eine Rezeptor-Internalisierung, neben der hauptsächlich Clathrin-vermittelten Endozytose, sind über Caveolae und nicht-Protein-beschichtete Vesikel (Claing et al., 2002). Nach Internalisierung des Rezeptors kann dieser recycelt oder degradiert werden (Abb. 4). Beim Recycling wird der Rezeptor nach Entfernung des Agonisten, im sauren Milieu des Endosoms, wieder aktivierbar an die Membran zurück transportiert, wodurch das Rezeptor-vermittelte Signal in der funktionellen Resensibilisierung endet. Kommt es zum Abbau des Rezeptors, auch als

---

Downregulation bezeichnet, wird der Rezeptor zum Lysosom transportiert, degradiert und es folgt eine langfristige Inhibierung des Signals. Hierbei scheint zusätzlich eine vorangegangene Ubiquitinierung bei einigen GPCRs eine entscheidende Rolle zu spielen (Hanyaloglu and von Zastrow, 2008; Marchese and Benovic, 2001). Innerhalb der GPCRs gibt es Rezeptoren, wie z.B. den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor, den Neurokinin-1 Rezeptor oder den  $\mu$ -Opioid-Rezeptor (MOR), die nach Ligandenbindung sehr effizient recycled werden, während Rezeptoren wie der  $\delta$ -Opioid-Rezeptor und der CKC-Motive-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) sehr stark degradiert werden (Pierce et al., 2002; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008; Latek et al., 2012). So scheint die Entscheidung, ob ein Rezeptor recycled oder degradiert wird, sehr früh im Endosom getroffen zu werden und ist möglicherweise von den Sequenzen innerhalb des C-Terminus der Rezeptoren abhängig (Trejo and Coughlin, 1999). Diese Unterschiede in den Signalkaskaden nahe verwandter Rezeptoren macht die große Komplexität der GPCRs aus.

### 2.1.3 $\beta$ -Arrestine

Die Arrestine wurden erstmals in den späten 1980er Jahren, durch ihre Fähigkeiten die Aktivität von GPCRs im visuellen Rhodopsin- und im  $\beta$ -adrenergen-System zu regulieren, entdeckt (DeWire et al., 2007). Insgesamt sind 4 verschiedene Arrestine bekannt, die eine hoch konservierte Aminosäuresequenz mit ähnlicher Struktur besitzen. Arrestin-1, auch bezeichnet als visuelles oder Stäbchen-Arrestin, und Arrestin-4, auch Zäpfchen-Arrestin genannt, werden überwiegend im Auge exprimiert und binden mit hoher Selektivität an den Rhodopsin-Rezeptor (Gurevich et al., 2011). Arrestin-2 und Arrestin-3, auch bekannt als  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 oder nicht-visuelle Arrestine, werden hingegen ubiquitär exprimiert (Palczewski, 1994).  $\beta$ -Arrestin1 befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus,  $\beta$ -Arrestin2 dagegen ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Die nicht-visuellen Arrestine binden die meisten GPCRs und sind an deren Desensibilisierung über GRKs beteiligt (Marchese et al., 2003). Sie binden über AP-2 an Clathrin und den Rezeptor, welcher daraufhin über Clathrin-beschichtete Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt und internalisiert wird (Goodman et al., 1996) (Abb. 5).



**Abb. 5: Vielfältige Funktionen der β-Arrestine.** A) Desensibilisierung: Die Agonistenbindung an den GPCR führt zur Aktivierung und schnellen Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs, worauf es zur β-Arrestin-Rekrutierung kommt. B) Endozytose: Nach Aktivierung des GPCRs kommt es zur Internalisierung durch Interaktion von AP-2 und Clathrin mit den β-Arrestinen. C) Signaltransduktion: Die β-Arrestine dienen als Scaffoldproteine und rekrutieren Signalproteine zum Rezeptor, die eine G-Protein-unabhängige Signaltransduktion auslösen (in Anlehnung an Shenoy et al., 2011).

Durch spezifische Rekrutierung von β-Arrestin1 oder β-Arrestin2 an den Rezeptor sowie der unterschiedlichen Affinität in der Arrestin-Rezeptor-Bindung und Dauer der Interaktion ergibt sich eine zusätzliche Klassifizierung. Bei den Klasse A-GPCRs, wie dem β<sub>2</sub>-adrenergen Rezeptor, dem μ-Opioid-Rezeptor und dem Dopamin-D1-Rezeptor (D<sub>1</sub>-Rezeptor), sind kaum Serin- oder Threoninreiche Cluster im C-Terminus zu finden. β-Arrestin2 wird hier nur transient aber mit höherer Affinität als β-Arrestin1 rekrutiert und dissoziiert sofort nach der Endozytose wieder vom Rezeptor ab, wodurch es nicht mit internalisiert wird und der Rezeptor wieder sehr schnell an die Membran zurück transportiert werden kann. Klasse B-GPCRs, wie der Angiotensin-Typ1A-Rezeptor (AT1AR), der Neurotensin-1-Rezeptor oder der Vasopressin-2-Rezeptor (V2R) rekrutieren hingegen β-Arrestin1 und β-Arrestin2 mit gleichermaßen hoher Affinität und internalisieren zusammen in einem stabilen Komplex (Ahn et al., 2003; Ahn et al., 2004; (Marchese et al., 2003).

Auch innerhalb der Recycling-Mechanismen scheint es eine unterschiedliche Regulation zu geben. Der β<sub>2</sub>-adrenerge Rezeptor recycelt sehr schnell innerhalb von 30 bis 90 Minuten, wobei β-Arrestin2 mit dem Rezeptor eine transiente Bindung

---

einzugehen scheint (Gagnon et al., 1998; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008). Diese wiederum könnte womöglich die schnelle Resensibilisierung in der Nähe der Zellmembran ermöglichen, wie es oft bei Klasse A-GPCRs der Fall ist. Bei langsam resensibilisierenden Klasse B-GPCRs, wie dem V2R, findet eine Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 statt, die auch nach der Internalisierung bestehen bleibt. Der Rezeptor wird erst nach über 4 Stunden recycelt (Innamorati et al., 1998; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008).

Eine weitere Funktion der  $\beta$ -Arrestine ist ihre Beteiligung an der Ubiquitinierung und der damit einhergehenden Regulation des *Traffickings* von GPCRs. So führt auf der einen Seite eine transiente Ubiquitinierung der  $\beta$ -Arrestine zu einem schnellen Rezeptor-Recycling und eine stabile Ubiquitinierung auf der anderen Seite zur Rezeptor-Endozytose (Shenoy et al., 2007; Shenoy et al., 2009).

Die  $\beta$ -Arrestine sind nicht nur an der Desensibilisierung und Internalisierung von Rezeptoren beteiligt, sondern interagieren auch mit anderen intrazellulären Proteinen und beeinflussen die Signaltransduktion (Abb. 5). Dadurch sind sie in der Lage eine zweite Signalwelle, die unabhängig vom G-Protein ist, zu aktivieren, was die Theorie des *biased agonism* untermauert. Die  $\beta$ -Arrestine fungieren hierbei als multifunktionelle *Scaffold*- oder Adapterproteine, welche Signalproteine wie die extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), JNK, p38, Akt und PI3-Kinase in die Nähe der GPCRs bringen (Shukla et al., 2008; Lefkowitz and Shenoy, 2005; Beaulieu et al., 2008; DeWire et al., 2007; DeWire et al., 2008). Beispielsweise wechselwirken sie mit dem Proto-Onkogen c-Src und aktivieren hierüber die ERK oder rekrutieren andere Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase wie Hck, Fgr und Yes (Barlic et al., 2000; Imamura et al., 2001). Durch die Interaktion der  $\beta$ -Arrestine mit vielen Proteinpartnern (Xiao et al., 2007) und Proteinkinasen kommt es auch zur Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Zielproteine (Xiao et al., 2010). Zu den  $\beta$ -Arrestin-vermittelten Signalwegen zählen u. a. die RhoA-abhängige Faserbildung (Barnes et al., 2005), die Hemmung der Genexpression des nukleären Faktors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) durch Stabilisierung von I $\kappa$ B (Wetherow et al., 2004; Gao et al., 2004), die durch Proteinphosphatase 2A (PP2A)-vermittelte Dephosphorylierung von Akt, wodurch es zur Aktivierung der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und einer Steigerung des dopaminergen Verhaltens kommt (Beaulieu et al., 2005), die ERK-abhängige Induktion der Proteintranslation (DeWire et al., 2008) und apoptotischen Effekten (Ahn et al., 2009), die PI3K-vermittelte Phospholipase A2 (PLA2)

---

Aktivierung und der damit einhergehenden Steigerung der Vasodilation durch GPR109A (Walters et al., 2009), sowie das Kif3A-abhängige *Trafficking* und die Aktivierung des Smoothed (SOM) Protein in primären Zilien (Kovacs et al., 2008). Je nach GPCR sind  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 gemeinsam oder aber auch nur eines von beiden an der Signaltransduktion beteiligt, wobei sich auch beide  $\beta$ -Arrestine gegenseitig regulieren können (DeWire et al., 2007).

Daraus ergibt sich ein vielfältiges Bild der  $\beta$ -Arrestine, wobei noch lange nicht alle Funktionen aufgeklärt und entdeckt sind.

### **2.1.4 Dephosphorylierung desensitierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

In den letzten Jahrzehnten wurde die Desensitisierung von GPCRs in Bezug auf die G-Proteine, die GRKs und die Arrestine an vielen Rezeptormodellen intensiv untersucht. Dabei blieb lange unbeachtet, wie die GRK vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors wieder entfernt wird, bezeichnet als Dephosphorylierung.

Zu den bekanntesten Proteinphosphatasen (PPs) zählen die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen 1-7 (Moorhead et al., 2007; Brautigan et al., 2013). Die Proteinphosphatasen sind für die Dephosphorylierung von Phospho-Serin und – Threonin zuständig. Im menschlichen Genom sind ca. 40 Serin/Threonin-Proteinphosphatasen kodiert, wobei die PP1 und PP2A die am häufigsten vorkommenden sind (Bollen et al., 2012; Moorhead et al., 2007). Sie sind multimere Enzyme und bestehen aus einer katalytischen und einer oder mehreren regulatorischen Untereinheiten. Die katalytische Untereinheit ist hoch konserviert (Ceulemans and Bollen, 2004; Barford et al., 1998), wird von nur fünf Genen kodiert und besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher Zielstrukturen (Bollen et al., 2012). Während die katalytische Untereinheit die direkte enzymatische Funktion am Zielsubstrat determiniert, besitzt die regulatorische Untereinheit die Kontrollfunktionen, wie die Regulation der Aktivität der Proteinphosphatase und die Spezifität zum jeweiligen Substrat (Ceulemans and Bollen, 2004; Bollen et al., 2012). Es sind wenige katalytische und mehrere hundert regulatorische Untereinheiten bekannt. Zu den letzteren zählen u. a. Spinophilin und A-Kinase-Ankerprotein 79

---

(AKAP79), die möglicherweise als Adapterproteine den Kontakt zwischen Proteinphosphatase und Substrat herstellen (Le et al. 2011; Hu et al., 2007). Regulatorische Untereinheiten besitzen eine Vielzahl von Funktionen an den katalytischen Domänen der Proteinphosphatasen. Erst durch diese Regulation kann eine sehr spezifische Kontrolle des jeweiligen Substrats erfolgen. Dazu zählt u. a. die Translokation zum Substrat oder auch inhibitorische Effekte auf die Untereinheit selbst (Le et al.; Bollen et al., 2012).

Die Dephosphorylierung wurde lange Zeit als passiv ablaufender Mechanismus betrachtet, obwohl bereits 1992 in *Drosophila melanogaster* eine Proteinphosphatase (Retinale Degeneration C, RDGC), die für die Rhodopsin-Dephosphorylierung notwendig ist, identifiziert wurde (Vinos et al., 1997; Steele et al., 1992). RDGC weist im Bereich der katalytischen Domäne eine hohe Sequenzhomologie mit den Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen 1 (PP1), 2A (PP2A) und 3 (PP3/PP2B) auf (Steele et al., 1992; Vinos et al., 1997; Byk et al., 1993). Kommt es zum Verlust der RDGC wird der Abbruch der Weiterleitung des Lichtes gestört und es kommt zur lichtabhängigen retinalen Degeneration (Vinos et al., 1997).

Für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor wurde eine PP2A-verwandte Proteinphosphatase entdeckt, die nur im sauren Milieu der Endosomen dephosphorylieren kann und ebenfalls mit der vesikulären Membran assoziiert ist. Sie wurde als G-Proteingekoppelte Rezeptor Phosphatase (GRP) bezeichnet (Krueger et al., 1997; Pitcher et al., 1995). Diese Daten würden erklären warum der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor internalisiert werden muss, um zu resensibilisieren (Krueger et al., 1997). Später wurde jedoch gezeigt, dass sich bei Hemmung der Internalisierung, durch eine dominant-negative Dynamin-Mutante oder eine hypertone Saccharose-Lösung, die Dephosphorylierungsrate nicht verändert (Zhang et al., 1999). Das trifft sowohl für die PKA-phosphorylierten Serine in der dritten intrazellulären Schleife als auch für die GRK-phosphorylierten Serine am C-Terminus zu (Kelly, 2006; Iyer et al., 2006).

Untersuchungen am  $D_1$ -Rezeptor konnten die These einer für die Dephosphorylierung notwendigen Rezeptor-Internalisierung ebenfalls nicht bestätigen (Gardner et al., 2001). Auch hier konnte die Rezeptor-Dephosphorylierung nicht gehemmt werden, wenn die Rezeptor-Internalisierung durch Behandlung mit dem pflanzlichen Lectin Concanavalin A sowie Saccharose blockiert wurde (Gardner et al., 2001). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei Anwendung der Proteinphosphatase-Inhibitoren Okadasäure (OA), welche die GRP-Aktivität blockt,

---

sowie Calyculin A, welches ebenfalls die Dephosphorylierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors inhibiert (Pippig et al., 1995; Pitcher et al., 1995; Krueger et al., 1997; Gardner et al., 2001).

Die Dephosphorylierung ist ein schnell ablaufender Prozess und scheint daher nicht in speziellen Kompartimenten, welche durch pH-Veränderungen eine Destabilisierung der kovalenten Bindung zwischen Phosphatrest und Rezeptor verursachen könnten, stattzufinden (Doll et al., 2012; Poll et al., 2011; Petrich et al., 2013). In neueren Arbeiten wurden für bestimmte GPCRs Proteinphosphatase-abhängige Regulationsmechanismen entdeckt, die aber teilweise noch nicht komplett verstanden oder deren zelluläre Kontrolle nicht identifiziert ist. Die PP2A scheint an der Resensibilisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (Krueger et al., 1997; Vasudevan et al., 2011) und an der Signalweitergabe des  $D_2$ -Rezeptors beteiligt zu sein (Beaulieu et al., 2005). Für die Dephosphorylierung des Thromboxan-Rezeptors (TP) wurde in Inhibitor-Studien PP1, PP2A und verwandte Proteinphosphatasen postuliert (Spurney, 2001). Inzwischen wurden für den  $\beta_2$ -adrenergen,  $D_1$ -, den Parathormon (PTH)- und den  $V1a$ -Vasopressin-Rezeptor weitere Proteinphosphatasen beschrieben. Jedoch konnte bisher kein genauer Kandidat identifiziert werden (Chauvin et al., 2002; Iyer et al., 2006; Innamorati et al., 1998; Gardner et al., 2001; Tran et al., 2007).

In neueren Arbeiten wird die PP1 als die entscheidende Proteinphosphatase, mit unterschiedlichen Aktivitäten in der katalytischen Untereinheit, für die Dephosphorylierung der Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 sowie des  $\mu$ -Opioid-Rezeptors postuliert (Poll et al., 2010; Petrich et al., 2013; Doll et al., 2012).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein siRNA *knock down* von PP1 $\alpha$  die Dephosphorylierung des Thyreotropin-releasing Hormon-Rezeptors (TRHR) hemmt (Gehret and Hinkle, 2013). Jedoch führte ein siRNA *knock down* aller drei katalytischen Untereinheiten zu einer stärkeren Hemmung der Dephosphorylierung als PP1 $\alpha$  allein. Das deutet daraufhin, dass die verschiedenen PP1 Isoformen auch redundant funktionieren können (Gehret and Hinkle, 2013).

---

## 2.2 Somatostatin und seine Rezeptoren

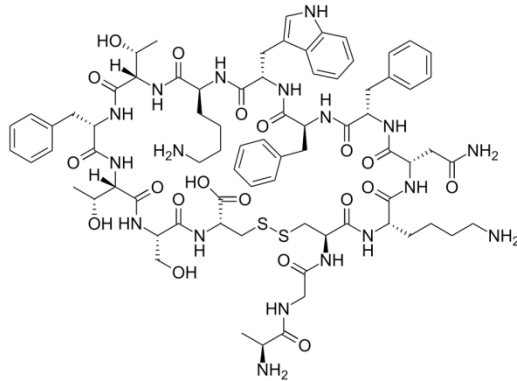
### 2.2.1 Somatostatin

Somatostatin ist ein zylopeptidisches Hormon, welches aus dem Vorläufer Prosomatostatin prozessiert wird. Es existieren zwei bioaktive Isoformen, ein kürzeres aus 14 Aminosäuren (SS-14) bestehendes Peptid und eine um 14 Aminosäuren N-terminal verlängerte Form (SS-28) (Ben-Shlomo and Melmed, 2010) (Abb. 6). Somatostatin bindet mit gleicher Affinität an alle Somatostatin-Rezeptor Subtypen (sst<sub>1</sub>-sst<sub>5</sub>). Zahlreiche Neurotransmitter, Peptide und Steroide, wie z.B. Corticotropin-releasing Hormon, Dopamin, Glukagon, Glukokortikoide, Noradrenalin und Vasoaktives Peptid (VIP), stimulieren die Somatostatin-Sekretion, wohingegen Acetylcholin und Arginin inhibitorisch auf Somatostatin wirken. 1973 wurde Somatostatin erstmals als Inhibitor der Wachstumshormonfreisetzung im Hypothalamus entdeckt (Reichlin, 1983; Brazeau et al., 1973). Neben weiteren endokrinen Zellen wird Somatostatin auch von gastrointestinalen Zellen, Immunzellen, zentralen und peripheren neuronalen Zellen und einigen Tumoren produziert (Ferjoux et al., 2000; Csaba et al., 2011). Somatostatin ist ein wichtiger Regulator der endokrinen und exokrinen Sekretion und beeinflusst die Freisetzung vieler nachgeschalteter Hormone wie Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), Wachstumshormon (GH), Thyreotropin/Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), sowie Glucagon, Insulin, Gastrin und Sekretin. Seine neuroendokrine Wirkung kommt durch die ausschließlich inhibitorische Wirkung auf die Wachstumshormonfreisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen sowie durch die indirekte Wirkung auf die Sekretion des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1) aus Leber, Herz und Nieren zustande (Serri et al., 1992). Im ZNS fungiert Somatostatin als Neuromodulator und Neurotransmitter (Epelbaum, 1986). Somatostatin ist somit an der Neurotransmission, dem Zellwachstum, der Regulation im Verdauungstrakt, dem Metabolismus und der Kontraktion glatter Muskelzellen beteiligt (Reichlin, 1983; Patel, 1999; Elliott et al., 1998; Blum et al., 1992; Stumm et al., 2004; Weckbecker et al., 2003). Ein wichtiger klinischer Aspekt ist, dass

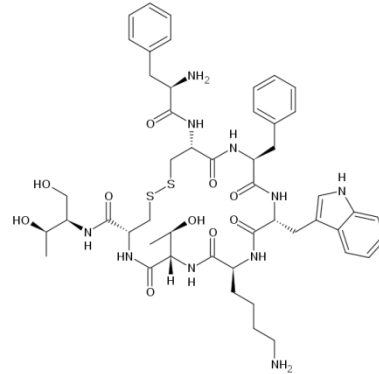


Somatostatin auch einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum neuroendokriner Tumore hat.

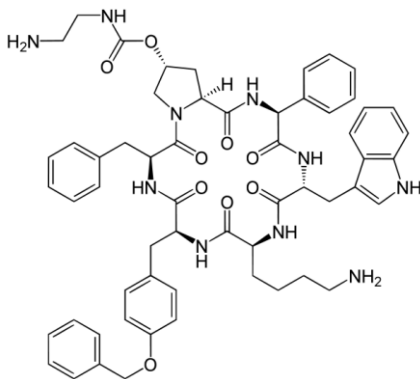
SS-14



Octreotid



Pasireotid



**Abb. 6: Strukturformel von SS-14, Octreotid und Pasireotid.** Dargestellt sind die Strukturformeln des natürlichen Liganden Somatostatin (SS-14) (oben links) und der beiden synthetisch hergestellten Somatostatin-Analoga Octreotid (oben rechts) und Pasireotid (unter links) (in Anlehnung an IUPHAR Database).

## 2.2.2 Stabile Somatostatin-Analoga

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zählen heute zu den wichtigsten Zielstrukturen in der Arzneimittelwelt. Somatostatin-Rezeptoren, insbesondere der  $sst_2$ , stellen aufgrund ihrer Expression auch auf pankreatischen, gastrointestinalen und pulmonalen neuroendokrinen Tumoren (NETs), Hypophysenadenomen, Mammakarzinomen, Meningeomen, Neuroblastomen, Medulloblastomen, Phäochromozytomen und Paragangliomen eine bedeutende pharmakologische Zielstruktur dar (Fischer et al., 2008; Weckbecker et al., 2003). Somatostatin selber ist für die klinische Anwendung wegen seiner ausschließlich intravenösen Verabreichung, einer kurzen Halbwertszeit von weniger als drei Minuten im Blutkreislauf und der postinfusionalen Hypersekretion von Hormonen, wie Insulin,

---

Wachstumshormon und Glukagon, nicht zur Therapie geeignet (Lamberts et al., 1996). Darüber hinaus koexistieren oft viele Somatostatin-Rezeptor Subtypen in den gleichen Zellen, was eine Krankheitsbild spezifische Behandlung erschwert. Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahrzehnten stabile Somatostatin-Analoga entwickelt, die für eine klinische Tumor-Bildgebung und –Behandlung eingesetzt werden können (Weckbecker et al., 2003; Fischer et al., 2008). Für das Drugdesign von petidischen Agonisten wurden am N- und C-Terminus Peptidsequenzen angefügt um die metabolische Stabilität zu erhöhen. Durch die Einführung von D-Aminosäuren, Tyrosinresten hingegen eignen sich die Somatostatin-Analoga nach Iodierung als Radioliganden für Bindungsstudien (Prevost et al., 1992). Es handelt sich hierbei um Octreotid und Lanreotid, welche mit hoher Affinität an den  $sst_2$ -Rezeptor binden (Patel and Srikant, 1994; Reisine and Bell, 1995; Bruns et al., 1996). Als Somatostatin-Analoga, auch Pan-Somatostatin-Analoga genannt, die eine höhere Affinität zu mehr als einem  $sst$ -Subtyp besitzen, wurden Pasireotid, Somatoprim und KE108 synthetisiert (Poll et al., 2010; Lewis et al., 2003; Cescato et al., 2010; Kao et al., 2011; Liu et al., 2005; Plockinger et al., 2012; Feelders et al., 2009).

### 2.2.2.1 Octreotid

Das Somatostatin-Analogon Octreotid ist ein zyklisches Oktapeptid welches von Novartis Pharmaceuticals als Sandostatin® seit 1987 in der BRD vertrieben wird (Abb. 6). Es ist Mittel der ersten Wahl für die medikamentöse Behandlung von neuroendokrinen Tumoren (NETs) wie dem GH-produzierenden Hypophysenadenom, beim Krankheitsbild der Akromegalie, und bei Karzinoiden (Casarini et al., 2009; Oberg, 2005; Donangelo and Melmed, 2005). Octreotid bindet mit hoher Affinität an den  $sst_2$ -Rezeptor, mit moderater Affinität an den  $sst_3$ - und  $sst_5$ -Rezeptor und zeigt eine sehr geringe Bindung am  $sst_1$ - und  $sst_4$ -Rezeptor (Patel and Srikant, 1994; Reisine and Bell, 1995; Bruns et al., 1996; Lesche et al., 2009; Poll et al., 2010). Die Halbwertszeit von Octreotid liegt bei drei Stunden und die Bioverfügbarkeit kann durch Bindung an ein spezielles Biopolymer verbessert werden (Lancranjan et al., 1996). Die Behandlung von neuroendokrinen Tumoren mit Octreotid führt bei 50-70% aller Fälle zu einer signifikanten Hemmung der GH-Produktion (Freda et al., 2005; Jallad et al., 2005; Freda, 2002). Somit werden die

---

durch hormonelle Überproduktion hervorgerufenen Symptome wie Diarrhö oder Flush-Symptomatik bei etwa 90% der Patienten kontrolliert (Freda et al., 2005; Jallad et al., 2005). Bei chronischer Anwendung, über ein Jahr, entwickeln sich bei 50% der Patienten ein Escape-Phänomen, welches zur Entwicklung einer Therapieresistenzen führt (Saslow et al., 1997; Oberg, 2005; Asnacios et al., 2008; Lesche et al., 2009; Vezzosi et al., 2008; Lamberts et al., 2002; Petersenn et al., 2000; Petersenn et al., 2002). Beim Krankheitsbild der Akromegalie hängt die Wirksamkeit von Octreotid stark von der  $sst_2$ -Rezeptor Expression ab. Diese nimmt im Lauf der Behandlung ab, während die Expression des  $sst_5$ -Rezeptors stabil bleibt (Plockinger et al., 2008). Aus diesem Grund normalisiert Octreotid bei Akromegalie das Wachstumshormonlevel nur bei 65% der Patienten. Keine senkende Wirkung auf die ACTH Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen zeigt Octreotid beim zentralen Cushing-Syndrom (Invitti et al., 1990), da auf den sekretierenden Zellen hauptsächlich der  $sst_5$ -Rezeptor exprimiert wird (Lesche et al., 2009; van der Hoek et al., 2004). Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Radiodiagnostik und das Imaging von NETs, wofür ein Indium-markiertes DTPA-Derivat (Octreoscan) von Octreotid eingesetzt wird. Durch die schnelle Internalisierung des  $sst_2$ -Rezeptors kommt es zur Anreicherung des Radiopharmakon im Zielgewebe und macht somit eine bildgebende Diagnostik möglich (Koenig et al., 1997; Breeman et al., 1998). Dieses Verfahren eröffnet neue Möglichkeiten für das Einschleusen von zytotoxischen Verbindungen oder radioaktiven Isotopen in das Tumorgewebe (Schally and Nagy, 1999).

#### **2.2.2.2 Pasireotid**

Pasireotid (SOM230) wurde als Nachfolgesubstanz von Octreotid zur Behandlung von Akromegalie, Cushing-Syndrom, Karzinoid- und Octreotid-resistenten Tumoren entwickelt (Boscaro et al., 2009). Im Juni 2012 wurde es von Novartis Pharmaceuticals unter dem Handelsnamen Signifor<sup>®</sup> zugelassen und wird in Deutschland zur Behandlung des Cushing-Syndroms, falls eine chirurgische Therapie nicht möglich ist, eingesetzt (Colao et al., 2012; Feelders and Hofland, 2013). Pasireotid ist ein metabolisch sehr stabiles Zykhexapeptid mit einer Halbwertszeit von 12-24 Stunden (Abb. 6). Es wird hauptsächlich in unveränderter Form biliär und nur zu einem geringen Teil über die Niere eliminiert (Ma et al., 2005;

---

Schmid and Silva, 2005). Pasireotid wurde entwickelt um durch höhere metabolische Stabilität die Bindungsaffinitäten des SS-14 besser zu imitieren. Es ist ein Multirezeptor-Ligand und bindet mit hoher Affinität an alle Somatostatin-Rezeptoren, bis auf den  $sst_4$ -Rezeptor (Bruns et al., 2002; Lewis et al., 2003). Im Gegensatz zu Octreotid bindet es mit subnanomolarer Affinität (40-fach höher) an den  $sst_5$ -Rezeptor (Ma et al., 2005). Diese Selektivität erklärt auch die Wirksamkeit von Pasireotid beim Cushing-Syndrom. Corticotrope Adenomzellen exprimieren vorwiegend den  $sst_5$ -Rezeptor, worüber es zu einer Senkung der ACTH-Sekretion und der damit einhergehenden Cortisol-Freisetzung durch Pasireotid kommt (Boscaro et al., 2009).

### 2.2.2.3 Weitere klinisch relevante Somatostatin-Analoga

Neben Pasireotid befinden sich weitere Somatostatin-Analoga wie z. B. Somatoprim, KE108 und Dopastatin, in klinischer und präklinischer Erprobung. Somatoprim (DG3173, Develogen, Göttingen) hat erfolgreich die Phase I der klinischen Testung passiert und besitzt ein einzigartiges Bindungsprofil, in dem es mit hoher Affinität an  $sst_2$ -,  $sst_4$ -,  $sst_5$ - jedoch nicht an  $sst_1$ - und  $sst_3$ -Rezeptor bindet (Plockinger et al., 2012; Shimon et al., 2004). KE108 bindet alle fünf Somatostatin-Rezeptoren und wurde von Biomeasure (Ipsen, Milford, MA) unter der Bezeichnung BIM-23A779 entwickelt, nachdem die klinische Testung von Dopastatin (BIM 23A760) gestoppt wurde (Kao et al., 2011; Cescato et al., 2010). Dopastatin hat eine hohe Affinität zum  $sst_2$ - und  $sst_5$ -Rezeptor sowie zum Dopamin-D2-Rezeptor (Gruszka et al., 2012). In der klinischen Testung zeigte sich jedoch, dass die Substanz überwiegend dopaminerge Effekte aufwies und somit nicht zur Therapie von NETs geeignet ist (Culler, 2011).

## 2.2.3 Somatostatin-Rezeptoren

Somatostatin vermittelt seine physiologischen Effekte über fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren,  $sst_1$ - $sst_5$  (Maurer and Reubi, 1985), wobei vom  $sst_2$ -Rezeptor bei Maus und Ratte zwei Spleißvarianten,  $sst_{2A}$  und  $sst_{2B}$  existieren. Der  $sst_{2B}$ -Rezeptor (332

---

AS) ist eine C-terminal um 37 Aminosäuren (AS) verkürzte Version des  $sst_{2A}$ -Rezeptors (369 AS). Im Menschen wurde bislang nur die längere Variante nachgewiesen (Fischer et al., 2008; Liu et al., 2008), wobei die C-terminalen Abweichungen zwischen humanem- und Ratten- $sst_2$ -Rezeptor sehr gering sind. So gibt es lediglich Abweichungen in den Positionen 335 und 336 ( $sst_2$ : TD;  $rsst_{2A}$ : AE) der intrazellulären Domäne. Alle Somatostatin-Rezeptorsubtypen haben eine große Sequenzhomologie mit einer Länge zwischen 362 und 428 Aminosäuren und wurden ursprünglich als SRIF (Somatostatin Releasing Inhibitory Factor) bezeichnet (Patel and Srikant, 1994; Hoyer et al., 1995). Für jeden Subtyp ergibt sich ein charakteristisches, wenngleich auch oftmals überlappendes Expressionsmuster im Organismus, welches auch von Spezies zu Spezies variieren kann (Patel, 1999). Alle diese Rezeptoren binden hochaffin (im Sub-nanomolaren Bereich) SS-14, das vergleichsweise schwächer exprimierte, SS-28 und das eng verwandte Cortistatin (Lahlou et al., 2004; Broglio et al., 2007). Sie aktivieren inhibitorische  $G\alpha_i$ -Proteine, was primär zu einer Hemmung der Adenylatcyclase führt und darauf folgend zu einer Verringerung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) im Zytoplasma (Koch and Schonbrunn, 1984). Dies wiederum führt dazu, dass die PKA nicht mehr aktiviert wird und somit verschiedene Signalwege über spannungsabhängige  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle sowie Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Ben-Shlomo and Melmed, 2010). Die antiproliferativen Eigenschaften werden durch die Aktivierung der Phosphotyrosinphosphatasen, Src-homologe Phosphatase Typ 1 und 2 (SHP-1/2), density-enhanced Phosphatase 1 (DEP-1/PTP $\eta$ ) und der Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) vermittelt (Florio et al., 1999). Zusätzlich steuern die einzelnen Rezeptor-Subtypen sehr unterschiedliche Agonisten-spezifische Signaltransduktionswege (Schonbrunn, 2008; Pierce et al., 2002; Lahlou et al., 2004). Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeiten der Somatostatin-Rezeptoren gibt es je nach Subtyp, Spezies, Agonist und untersuchtem Zelltyp eine große Variabilität in der physiologischen Regulation. Unterschiede sind insbesondere in Bezug auf die  $\beta$ -Arrestin-Mobilisierung und der damit verbundenen endosomalen Sortierung zu finden (Tulipano et al., 2004). Der  $sst_2$ -Rezeptor verhält sich wie ein Klasse B-GPCR und internalisiert Clathrin-abhängig sehr stark mit  $\beta$ -Arrestin1 und 2 nach Phosphorylierung, kann aber wieder sehr schnell komplett resensibilisiert werden (Jacobs and Schulz, 2008; Liu et al., 2005; Lesche et al., 2009; Tulipano et al., 2004). Eigenschaften der Klasse A-GPCR weisen hingegen der  $sst_3$  und  $sst_5$  auf, da

---

es zu einer transienten, instabilen  $\beta$ -Arrestin2-Bindung in der Nähe der Membran kommt und keine gemeinsame Clathrin-abhängige Internalisierung stattfindet (Tulipano et al., 2004). Der  $sst_3$ -Rezeptor wird nur zu einem geringen Teil recycled, wohingegen der größte Teil Ubiquitin-abhängig im Lysosom degradiert und abgebaut wird (Tulipano et al., 2004). Für den Ratten  $sst_3$ -Rezeptor wurden bis jetzt drei Serin- und ein Threoninrest im C-Terminus als entscheidende Phosphorylierungsstellen identifiziert (Roth et al., 1997). Diese Phosphorylierungen könnten für die kürzlich postulierte C-terminal-abhängige Apoptose nach Aktivierung des humanen  $sst_3$ -Rezeptors verantwortlich sein. Als einziger Subtyp zeigt der humane und Ratten  $sst_5$ -Rezeptor eine höhere Affinität zu SS-28 als zu SS-14. SS-14 und SS-28 sind beide in der Lage den Rezeptor, wenn auch nicht vollständig, zu internalisieren (Tulipano et al., 2004; Petrich et al., 2013; Kliewer et al., 2012; Cescato et al., 2006). Der  $sst_1$ -Rezeptor der Ratte weist im Vergleich zum humanen keine Agonisten-abhängige  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung auf (Patel, 1999; Tulipano et al., 2004; Tulipano and Schulz, 2007). Gezeigt wurde ebenfalls, dass die Phosphorylierung des  $sst_1$ -Rezeptors unabhängig von der Signalgebung des Rezeptors ist (Liu and Schonbrunn, 2001). Auch der Ratten  $sst_4$ -Rezeptor wird nach Somatostatin-Stimulation nicht phosphoryliert und es kommt zu keiner  $\beta$ -Arrestin-Mobilisierung und Internalisierung (Tulipano et al., 2004).

#### **2.2.4 Somatostatin-Rezeptor $sst_2$ : Phosphorylierung und Dephosphorylierung**

Der humane sowie der Ratten  $sst_2$ -Rezeptor ist der am besten untersuchteste Somatostatin-Rezeptor. Seine Expression ist im Gewebe sowie in Tumoren im Vergleich zu den anderen Subtypen am stärksten ausgeprägt (Guillermet-Guibert et al., 2005; Cescato et al., 2006). Mit Hilfe von radioaktiven Ganz-Zell-Phosphorylierungs-Assays konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass der  $sst_2$ -Rezeptor heterolog über PKC und homolog agonist-induziert phosphoryliert werden kann (Hipkin et al., 2000; Elberg et al., 2002) Bei der agonist-induzierten Phosphorylierung kommt es zu einer schnellen und robusten Phosphorylierung der C-terminalen Serin- und Threoninreste (Liu et al., 2008). Mittels Trunktions- und

---

Punktmutanten des Ratten  $ss_2$ -Rezeptor konnte ein Cluster von vier Threoninresten, T353, T354, T356 und T359, im C-Terminus identifiziert werden (Poll et al., 2010). Die Phosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$  Motivs ist essentiell für die  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Internalisierung des  $ss_2$ -Rezeptors (Liu et al., 2008; Poll et al., 2010; Tulipano et al., 2004). Um die genaue räumliche und zeitliche Dynamik der einzelnen agonist-induzierten Phosphorylierungsstellen zu untersuchen, wurde in den letzten Jahren von zwei unterschiedlichen Gruppen phospho-spezifische Antikörper gegen die Stellen Serin 341, Serin 343, Serin 348, Threonin 353, Threonin 354, Threonin 356 und Threonin 359 generiert (Nagel et al., 2011; Poll et al., 2010; Liu et al., 2008). Mit Hilfe der Antikörper konnte gezeigt werden, dass alle Stellen sehr schnell phosphoryliert (<1 min) werden, wobei die agonist-induzierte Phosphorylierung der S341/343 Voraussetzung für die Phosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$  Motivs sind (Nagel et al., 2011; Poll et al., 2010; Schonbrunn, 2008). Mutationen in den Serin- oder Threoninresten führen zu einer stark verzögerten aber nicht reduzierten Phosphorylierung der übrigen Phosphorylierungsstellen. In Gegenwart von Phorbolestern kommt es zu einer selektiven Phosphorylierung des S343, was wiederum ein Substrat für die heterologe PKC-vermittelte Phosphorylierung ist (Liu et al., 2008).

Unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper gegen die Serin- und Threoninreste des  $ss_2$ -Rezeptors konnten auch die Kinasen, welche die agonist-induzierte Phosphorylierung vermitteln, identifiziert werden. Die Hemmung der GRK 2 und GRK 3 Expression durch siRNAs, führte zu einer signifikanten Reduzierung der SS-14-induzierten T356/T359 Phosphorylierung in HEK293-Zellen (Nagel et al., 2011; Poll et al., 2010). Dabei wird die durch Octreotid oder Pasireotid-induzierte Phosphorylierung der S341/S343 über GRK 3 vermittelt. In CHO-Zellen wird diese Phosphorylierung am Ratten  $ss_2$ -Rezeptor wiederum über GRK 2 vermittelt (Liu et al., 2008). Eine Hemmung von GRK 5 und GRK 6 hingegen hat keine signifikante Auswirkung auf die  $ss_2$ -Rezeptor-Phosphorylierung (Nagel et al., 2011). Somit hängt das Ausmaß und das Muster der  $ss_2$ -Rezeptor-Phosphorylierung stark von der zellulären Ausstattung mit GRK 2 und GRK 3 ab.

Im Fokus der letzten Jahre stand neben der  $ss_2$ -Rezeptor-Phosphorylierung nun auch die Dephosphorylierung und es wurden unterschiedliche zeitliche und räumliche Muster der  $ss_2$ -Rezeptor-Dephosphorylierung beschrieben (Ghosh and Schonbrunn, 2011). Nach kurzzeitiger Stimulation, wenn die meisten Rezeptoren

---

noch an der Zellmembran sind, kommt es nur zu einer Dephosphorylierung von T353/T354, nicht aber von S341/S343. Im Gegensatz dazu führt eine Langzeitstimulation, bei der es zur Rezeptor-Internalisierung kommt, zu einer schnellen Dephosphorylierung sowohl von S341/S343 als auch T353/T354. Die Dephosphorylierung von T353/T354 konnte weder von hypertoner Saccharose oder *Dynasore*, welches die Rezeptor-Internalisierung blockiert, beeinflusst werden. Jedoch war die Dephosphorylierung in CHO-Zellen, an den Positionen T353/T354, sensitiv auf Okadasäure.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $sst_2$ -Rezeptor-Dephosphorylierung sowohl durch die Dauer der Agonisten-Stimulation als auch von der Kompartiment-spezifischen Enzymaktivität bestimmt wird. Jedoch führten diese Studien nicht zur Identifizierung einer spezifischen Proteinphosphatase für die  $sst_2$ -Rezeptor-Dephosphorylierung. In Poll et al. (2011) konnten, durch die Kombination von phospho-spezifischen Antikörpern, chemischen Proteinphosphatase-Inhibitoren und siRNA *knock down-Screening*, eine GPCR-Proteinphosphatase, welche die schnelle Dephosphorylierung von T353, T354, T356, T359 am  $sst_2$ -Rezeptor katalysiert, erstmals identifiziert werden (Poll et al., 2011). Innerhalb von 30 Minuten nach Agonist-Stimulation kommt es zu einer kompletten Dephosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$  Motivs. In HEK293-Zellen konnte die Proteinphosphatase-Aktivität konzentrationsabhängig nur durch Calyculin A, nicht aber durch Okadasäure gehemmt werden. Sowohl Calyculin A als auch Okadasäure können effektiv die Aktivität von PP2, PP4 und PP5 blockieren (Poll et al., 2011). Im Gegensatz zu Okadasäure ist Calyculin A auch ein potenter Inhibitor der PP1-Aktivität, was darauf hindeutet, dass das  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$  Motiv des  $sst_2$ -Rezeptors nur durch PP1 dephosphoryliert werden kann. PP1 besitzt drei verschiedene katalytische Untereinheiten, welche mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden. Eine gleichzeitige Hemmung aller drei katalytischen Untereinheiten bestätigte die PP1-selektive Dephosphorylierung am  $sst_2$ -Rezeptor. Eine selektive Hemmung von PP1 $\alpha$  und PP1 $\gamma$ , zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung. Im Gegensatz dazu führte eine Hemmung der PP1 $\beta$  zu einer Verstärkung der  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$  Phosphorylierung in Anwesenheit des Agonisten und zu einer verzögerten Dephosphorylierung nach dem Auswaschen des Agonisten. Keinen Einfluss zeigte die Hemmung der PP2 $\alpha$ , PP2 $\beta$ , PP4 oder PP5. Diese Untersuchungen identifizierten



---

erstmalig PP1 $\beta$  als GPCR-Proteinphosphatase für die  $\beta$ -Arrestin-Akzeptorstellen des sst<sub>2</sub>-Rezeptors.

### 2.2.5 Somatostatin-Rezeptor sst<sub>5</sub>: Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Der humane sst<sub>5</sub>-Rezeptor stellt ebenfalls eine wichtige Zielstruktur für das Somatostatin-Analogon Pasireotid dar. Im Vergleich zum sst<sub>2</sub>-Rezeptor ist hier sehr wenig über die C-terminale agonist-selektive Phosphorylierung bekannt. Aus den Untersuchungen der Primärstruktur des C-Terminus ergeben sich zwei potentielle Phosphorylierungsstellen, Threonin 333 und Threonin 347, welche mit der phosphorylierungssensitiven Domäne des sst<sub>2</sub>-Rezeptors korreliert. Mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern gegen T333 und T347 konnte gezeigt werden, dass T333 sehr schnell agonist-abhängig und T347 konstitutiv unabhängig von Agonisten phosphoryliert werden (Petrich et al., 2013). Mutationen von T333 führten zu einer stark reduzierten Internalisierung des sst<sub>5</sub>-Rezeptors. Eine reduzierte Rezeptor-Internalisierung wurde auch nach Mutationen in den Stellen S242 und T247 in der dritten intrazellulären Schleife hervorgerufen (Peverelli et al., 2008). Diese Stellen scheinen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des sst<sub>5</sub>-Rezeptors zu spielen. Daraufhin konnte GRK 2 für die Phosphorylierung von T333 identifiziert werden, was zur  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung führt (Peverelli et al., 2008). Im Gegensatz zum sst<sub>2</sub>-Rezeptor kommt es zu einer schnellen Dissoziation des  $\beta$ -Arrestin-Rezeptor-Komplexes, woraufhin der sst<sub>5</sub>-Rezeptor ohne  $\beta$ -Arrestin im frühen Endosom internalisiert wird. Nach 30 Minuten sind 30% der sst<sub>5</sub>-Rezeptoren internalisiert. Beim sst<sub>2</sub>-Rezeptor führt eine durch SS-14-induzierte Internalisierung unter gleichen Bedingungen zu einer 80%igen Internalisierung (Peverelli et al., 2008; Tulipano et al., 2004).

Vergleichende Untersuchungen am sst<sub>2</sub>- und sst<sub>5</sub>-Rezeptor zeigten überraschenderweise unterschiedliche Muster in der Dephosphorylierung und im Recycling. Während der sst<sub>5</sub>-Rezeptor schnell am T333 phosphoryliert und dephosphoryliert wird, kommt es beim sst<sub>2</sub>-Rezeptor aufgrund seiner langsamen Dephosphorylierung zu einem verzögerten Recycling (Petrich et al., 2013). Auch hier

---

fürten Untersuchungen mit chemischen Inhibitoren und einem siRNA *knock down-Screening* zu dem Ergebnis, dass die T333-Dephosphorylierung konzentrationsabhängig durch Calyculin A, nicht aber durch Okadasäure gehemmt werden kann. siRNA Experimente zeigten, dass PP1 $\gamma$  die Dephosphorylierung am sst<sub>5</sub>-Rezeptor vermittelt (Petrich et al., 2013). Im Gegensatz dazu hatte eine Hemmung von PP1 $\beta$  und PP1 $\alpha$  keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die GPCR-Proteinphosphatase PP1 $\gamma$  für die schnelle T333-Dephosphorylierung am sst<sub>5</sub>-Rezeptor verantwortlich ist. Somit wurde neben PP1 $\beta$  für den sst<sub>2</sub>-Rezeptor, eine weitere GPCR-Proteinphosphatase identifiziert.

---

## 2.3 Zielstellung der Arbeit

GPCRs regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen und gehören zu den wichtigsten Zielstrukturen in der heutigen Arzneimittelwelt. Immer mehr deutet darauf hin, dass für viele GPCRs mehrere aktive Konformationen existieren und diese selektiv spezifische Signalwege aktivieren können. Dabei ist die Beendigung der Signalweitergabe aktivierter GPCRs essentiell für die zelluläre Homöostase. Die Desensibilisierung des GPCR-Signals hat ein verringertes Ansprechen des Rezeptors auf wiederholte oder dauerhafte Reize zur Folge. Durch die agonist-induzierte Phosphorylierung kommt es zur  $\beta$ -Arrestin-Bindung an den GPCR, worauf eine Desensibilisierung des G-Protein-Signals erfolgt und der GPCR internalisiert wird. Für viele GPCRs sind die unterschiedlichen agonist-induzierten Phosphorylierungsmuster jedoch bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Weitgehend unklar sind auch die molekularen Mechanismen und funktionellen Konsequenzen der GPCR-Dephosphorylierung.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des  $sst_2$ -Rezeptors bemerkenswerterweise agonist- und spezie-abhängig ist. SS-14 und Octreotid fördern die Phosphorylierung von allen sechs C-terminalen Serin- und Threoninresten sowohl in der Ratte als auch im Menschen (Nagel et al., 2011). Im Gegensatz dazu zeigt Pasireotid keine wesentliche Phosphorylierung und Internalisierung am Ratte  $sst_2$ -Rezeptor, ist aber am humanen  $sst_2$ -Rezeptor in der Lage die zwei C-terminalen Serinreste selektiv zu phosphorylieren und den Rezeptor teilweise zu internalisieren (Nagel et al., 2011). Eine zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob die beobachtete agonist-selektive Regulation des  $sst_2$ -Rezeptors durch Pasireotid generell auch für andere Pan-Somatostatin-Analoga zutrifft. Im Weiteren soll geklärt werden, inwiefern diese funktionelle Selektivität auch für andere klinisch relevante Somatostatin-Rezeptoren, wie dem  $sst_3$ - und  $sst_5$ -Rezeptor, existiert (**Manuskript I**). Der  $sst_2$ -Rezeptor ist ein prototypischer Klasse B-Rezeptor, wohingegen der  $sst_5$ -Rezeptor zu den prototypischen Klasse A-Rezeptoren gezählt wird. Sie weisen eine große Homologie innerhalb der Transmembrandomänen auf, mit einem jedoch stark divergierenden C-terminalen Bereich. Daraus ergeben sich nicht nur unterschiedliche Phosphorylierungsmuster sondern auch Unterschiede in der Geschwindigkeit der

---

Dephosphorylierung und Rekrutierung der entsprechenden PP1-Isoformen. Die Identifikation unterschiedlicher PP1-Isoformen, PP1 $\beta$  für den sst<sub>2</sub>-Rezeptor und PP1 $\gamma$  für den sst<sub>5</sub>-Rezeptor, deuten darauf hin, dass ein bestimmter GPCR selektiv eine spezifische PP1-Isoform für die Dephosphorylierung rekrutiert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, durch welche Mechanismen die PP1-Selektivität und -Spezifität reguliert werden kann. Es ist möglich, dass entweder C-terminale Phosphorylierungsmuster, spezifische Sequenzen innerhalb der intrazellulären Schleifen des Rezeptors oder aber auch  $\beta$ -Arrestine für die Auswahl der richtigen Proteinphosphatase nötig sind (**Manuskript II**).

Im Weiteren wird in dieser Arbeit der zentralen Frage nachgegangen, wie die katalytische Untereinheit der PP1 zur phosphorylierten Sequenz des sst<sub>2</sub>-Rezeptor gelangt und reguliert wird (**Manuskript III**).

---

## 3 Manuskripte

### 3.1 Manuskript I

#### A Transplantable Phosphorylation Probe for Direct Assessment of G Protein-Coupled Receptor Activation

---

Andrea Kliewer, Anika Mann, Aline Petrich, Florian Pöll, Stefan Schulz

PLoS ONE 7(6): e39458. doi:10.1371/journal.pone.0039458

#### Autorenschaft

Erstautor

#### Beitrag der Autoren

Der experimentelle Teil wurde von Stefan Schulz, Florian Pöll und Andrea Kliewer entworfen. Andrea Kliewer führte alle Experimente durch und analysierte die Daten. Andrea Kliewer und Stefan Schulz schrieben das Manuskript. Anika Mann half beim etablieren der Immuncytochemie und Aline Petrich testete die phospho-spezifischen Antikörpern des sst<sub>5</sub>-Rezeptors.

---

## Zusammenfassung

Diese Publikation beschäftigt sich mit der Charakterisierung der neu entwickelten Somatostatin-Analoga Pasireotid (SOM230), Octreotid und Somatoprim (DG3173). Hierfür wurde das C-terminale Phosphorylierungsmotiv des  $sst_2$ -Rezeptors auf andere Somatostatin-Rezeptoren übertragen, um die Rezeptorphosphorylierungen, die als Maß für die Rezeptoraktivierung angesehen werden, mit Hilfe der drei phospho-spezifischen Antikörper gegen den  $sst_2$ -Rezeptor zu untersuchen. Folglich wurde Pasireotid als bevorzugter  $sst_5$ - und Octreotid als bevorzugter  $sst_2$ -Ligande identifiziert. Im Gegensatz dazu ist Somatoprim einzigartig, da es ein potenter Agonist an  $sst_2$ - und  $sst_5$ -Rezeptoren ist. Daraus resultiert, dass der  $sst_2$ -C-Terminus als Phosphorylierungssonde zur direkten Messung der GPCR-Aktivierung eingesetzt werden kann und somit weitere pharmakologisch wichtige Somatostatin-Analoga charakterisiert werden können.

# A Transplantable Phosphorylation Probe for Direct Assessment of G Protein-Coupled Receptor Activation

Andrea Kliewer, Anika Mann, Aline Petrich, Florian Pöll, Stefan Schulz\*

Department of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital - Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany

## Abstract

The newly developed multireceptor somatostatin analogs pasireotide (SOM230), octreotide and somatoprim (DG3173) have primarily been characterized according to their binding profiles. However, their ability to activate individual somatostatin receptor subtypes (sst) has not been directly assessed so far. Here, we transplanted the carboxyl-terminal phosphorylation motif of the sst<sub>2</sub> receptor to other somatostatin receptors and assessed receptor activation using a set of three phosphosite-specific antibodies. Our comparative analysis revealed unexpected efficacy profiles for pasireotide, octreotide and somatoprim. Pasireotide was able to activate sst<sub>3</sub> and sst<sub>5</sub> receptors but was only a partial agonist at the sst<sub>2</sub> receptor. Octreotide exhibited potent agonistic properties at the sst<sub>2</sub> receptor but produced very little sst<sub>5</sub> receptor activation. Like octreotide, somatoprim was a full agonist at the sst<sub>2</sub> receptor. Unlike octreotide, somatoprim was also a potent agonist at the sst<sub>5</sub> receptor. Together, we propose the application of a phosphorylation probe for direct assessment of G protein-coupled receptor activation and demonstrate its utility in the pharmacological characterization of novel somatostatin analogs.

**Citation:** Kliewer A, Mann A, Petrich A, Pöll F, Schulz S (2012) A Transplantable Phosphorylation Probe for Direct Assessment of G Protein-Coupled Receptor Activation. PLoS ONE 7(6): e39458. doi:10.1371/journal.pone.0039458

**Editor:** Raul M. Luque, University of Cordoba, Spain

**Received:** March 5, 2012; **Accepted:** May 21, 2012; **Published:** June 26, 2012

**Copyright:** © 2012 Kliewer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant SCHU924/10-3 and the Deutsche Krebshilfe grant 109952. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: Stefan.Schulz@mti.uni-jena.de.

## Introduction

The development of novel multireceptor somatostatin analogs has primarily focused on the discovery of compounds with nanomolar binding affinities to more than one of the five somatostatin receptors (sst<sub>1</sub>–sst<sub>5</sub>). It is not clear, however, whether these compounds exhibit full or partial agonistic properties at individual somatostatin receptor subtypes. This lack of knowledge is due to the limited availability of methods allowing a direct assessment of G protein-coupled receptor (GPCR) activation.

In clinical practice, octreotide and lanreotide are used as first choice medical treatment of neuroendocrine tumors such as GH-secreting adenomas and carcinoids [1,2]. Octreotide and lanreotide bind with high sub-nanomolar affinity to sst<sub>2</sub> only, have moderate affinity to sst<sub>3</sub> and sst<sub>5</sub> and show very low or absent binding to sst<sub>1</sub> and sst<sub>4</sub>. Recently, the novel multireceptor somatostatin analog, pasireotide (SOM230), has been synthesized [3]. Pasireotide is a cyclohexapeptide, which binds with high affinity to all somatostatin receptors except to sst<sub>4</sub> [4]. In contrast to octreotide, pasireotide exhibits particular high sub-nanomolar affinity to sst<sub>5</sub> [5]. Pasireotide is currently under clinical evaluation for treatment of acromegaly, Cushing's disease and octreotide-resistant carcinoid tumors [6,7,8]. In addition to pasireotide, the novel pan-somatostatin analog somatoprim (DG3173) is currently under clinical and preclinical evaluation. Somatoprim exhibits a unique binding profile in that binds with high affinity to sst<sub>2</sub>, sst<sub>4</sub> and sst<sub>5</sub> but not to sst<sub>1</sub> or sst<sub>3</sub>.

We have recently uncovered agonist-selective and species-specific patterns of sst<sub>2A</sub> receptor phosphorylation and trafficking [9]. Whereas octreotide, in a manner similar to that observed with

somatostatin, stimulates the phosphorylation of a number of carboxyl-terminal phosphate acceptor sites in both rat and human sst<sub>2</sub> receptors, pasireotide fails to promote any detectable phosphorylation or internalization of the rat sst<sub>2A</sub> receptor. In contrast, pasireotide is able to trigger a partial internalization of the human sst<sub>2</sub> receptor. At present it is unclear whether the agonist-selective regulation of the sst<sub>2</sub> receptor observed for pasireotide is a general property of all pan-somatostatin analogs, and whether such functional selectivity may exist for other clinically-relevant somatostatin receptors including sst<sub>5</sub> and sst<sub>3</sub>.

In the present study, we addressed this problem by using the carboxyl-terminal tail of the sst<sub>2</sub> receptor as transplantable phosphorylation probe to directly sense the activation of other somatostatin receptors. This approach was possible due to our recent success in generating a set of three phosphosite-specific antibodies for the sst<sub>2</sub> receptor which allowed us to determine distinct patterns of phosphorylation induced by different agonists. Our assay utilizes the unique ability of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) to detect only active conformations of GPCRs. Different phosphorylation patterns may hence reflect distinct receptor conformations.

## Materials and Methods

### Reagents and Antibodies

Pasireotide and octreotide were provided by Dr. Herbert Schmid (Novartis, Basel, Switzerland). Somatoprim was provided by Dr. Ursula Hoffmann (DeveloGen, Göttingen, Germany). Somatostatin (SS-14) was obtained from Bachem (Weil am Rhein,

Germany). The phosphorylation-independent rabbit monoclonal anti-*sst*<sub>2</sub> {UMB-1}, anti-*sst*<sub>3</sub> {UMB-5} or anti-*sst*<sub>5</sub> {UMB-4} antibodies were obtained from Epitomics (Burlingame, CA). The rabbit polyclonal phosphosite-specific *sst*<sub>2</sub> antibodies anti-pT353/pT354 {0521}, anti-pT356/pT359 {0522}, and anti-pS341/pS343 {3155} were generated and extensively characterized previously [9,10].

#### Generation of Mutant Somatostatin Receptors

A chimera of the human *sst*<sub>5</sub> receptor with the carboxyl-terminal tail of the human *sst*<sub>2</sub> receptor (hsst5-*sst*<sub>2</sub>CT) was generated by DNA synthesis by imaGenes (Berlin, Germany). A chimera of the rat *sst*<sub>3</sub> receptor with the carboxyl-terminal tail of the rat *sst*<sub>2</sub> receptor (rsst3-*sst*<sub>2</sub>CT) was generated by exchange of the entire carboxyl-terminal tail using the FLS Motive present in the DNA sequence of both receptors in the seventh transmembrane domain. The fragments were cloned into pcDNA3.1(+) using HindIII and XbaI cloning sites.

#### Cell Culture and Transfection

Human embryonic kidney HEK293 cells were obtained from the German Resource Centre for Biological Material (DSMZ, Braunschweig, Germany). HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum in a humidified atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub>. Cells were transfected with plasmids encoding for wild-type or mutant somatostatin receptors using jetPEI<sup>TM</sup> according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Stable

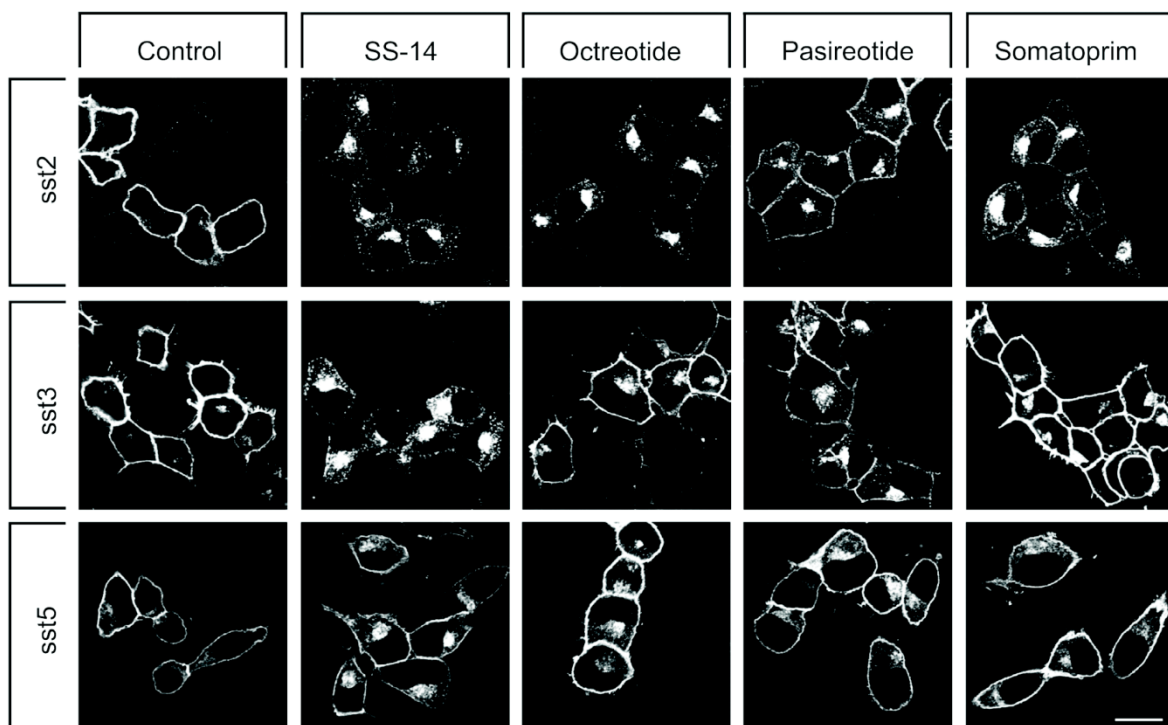
transfectants were selected in the presence of 400 µg/ml G418. HEK293 cells stably expressing somatostatin receptors were characterized using radioligand-binding assays, Western blot analysis, and immunocytochemistry as described previously. The level of somatostatin receptor expression was ~900 fmol/mg membrane protein. All chimeras and mutants tested were present at the cell surface and expressed similar amounts of receptor protein. The IC<sub>50</sub> values of SS-14, octreotide and pasireotide for ligand binding affinities are given in Table S1.

#### Immunocytochemistry

Cells were grown on poly-L-lysine-coated coverslips overnight. After the appropriate treatment with SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in phosphate buffer (pH 6.9) for 30 min at room temperature and washed several times. Specimens were permeabilized and then incubated with anti-*sst*<sub>2</sub> {UMB-1}, anti-*sst*<sub>3</sub> {UMB-5} or anti-*sst*<sub>5</sub> {UMB-4} antibodies followed by Alexa488-conjugated secondary antibodies (Amersham, Braunschweig, Germany). Specimens were mounted and examined using a Zeiss LSM510 META laser scanning confocal microscope [11].

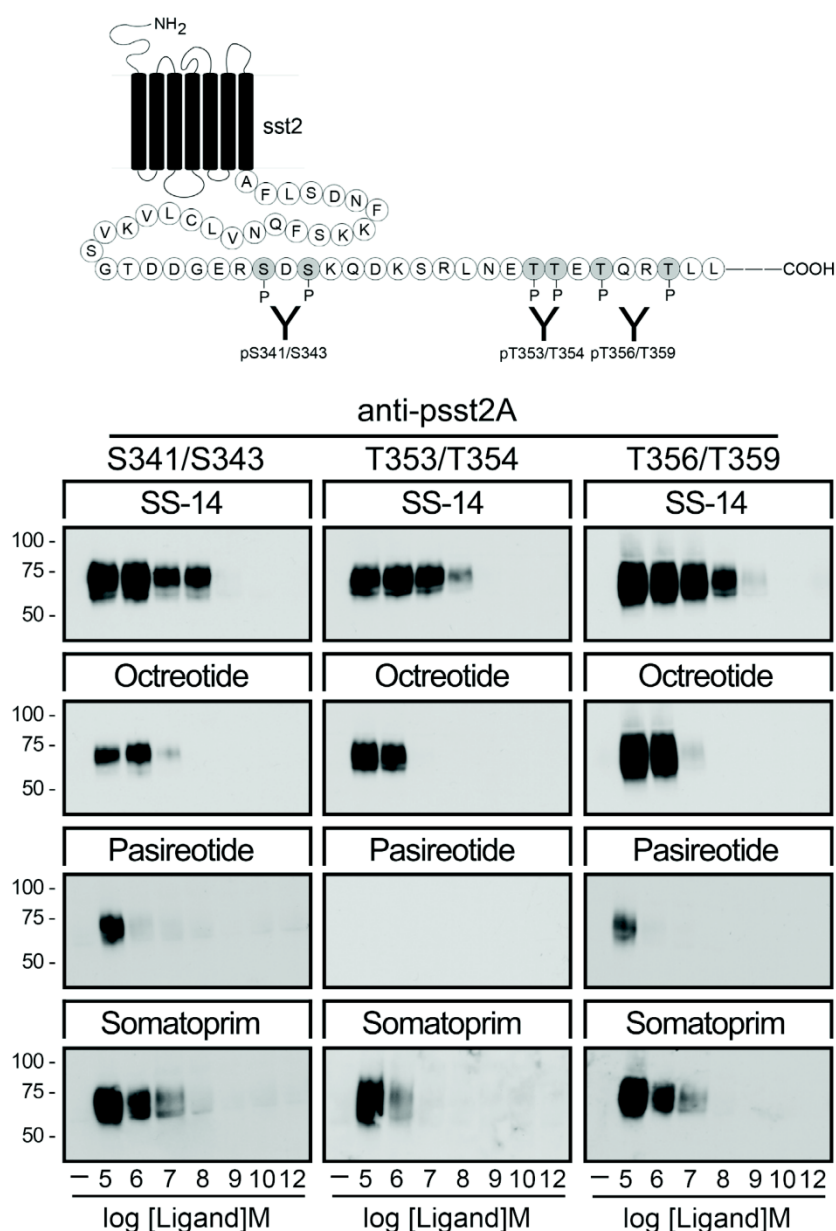
#### Western Blot Analysis

Stably transfected HEK293 cells were plated onto poly-L-lysine-coated 60-mm dishes and grown to 80% confluence. After the appropriate treatment with SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim, cells were lysed in detergent buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF,



**Figure 1. Agonist-selective internalization of human somatostatin receptors.** HEK293 cells stably expressing *sst*<sub>2</sub>, *sst*<sub>3</sub> or *sst*<sub>5</sub> receptors were treated with either 1 µM SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim for 0 or 30 min. Cells were fixed, immunofluorescently stained with anti-*sst*<sub>2</sub> {UMB-1}, anti-*sst*<sub>3</sub> {UMB-5} or anti-*sst*<sub>5</sub> {UMB-4} antibodies, and examined by confocal microscopy. Shown are representative images from one of three independent experiments performed in duplicate. Scale bar, 20 µm.  
doi:10.1371/journal.pone.0039458.g001

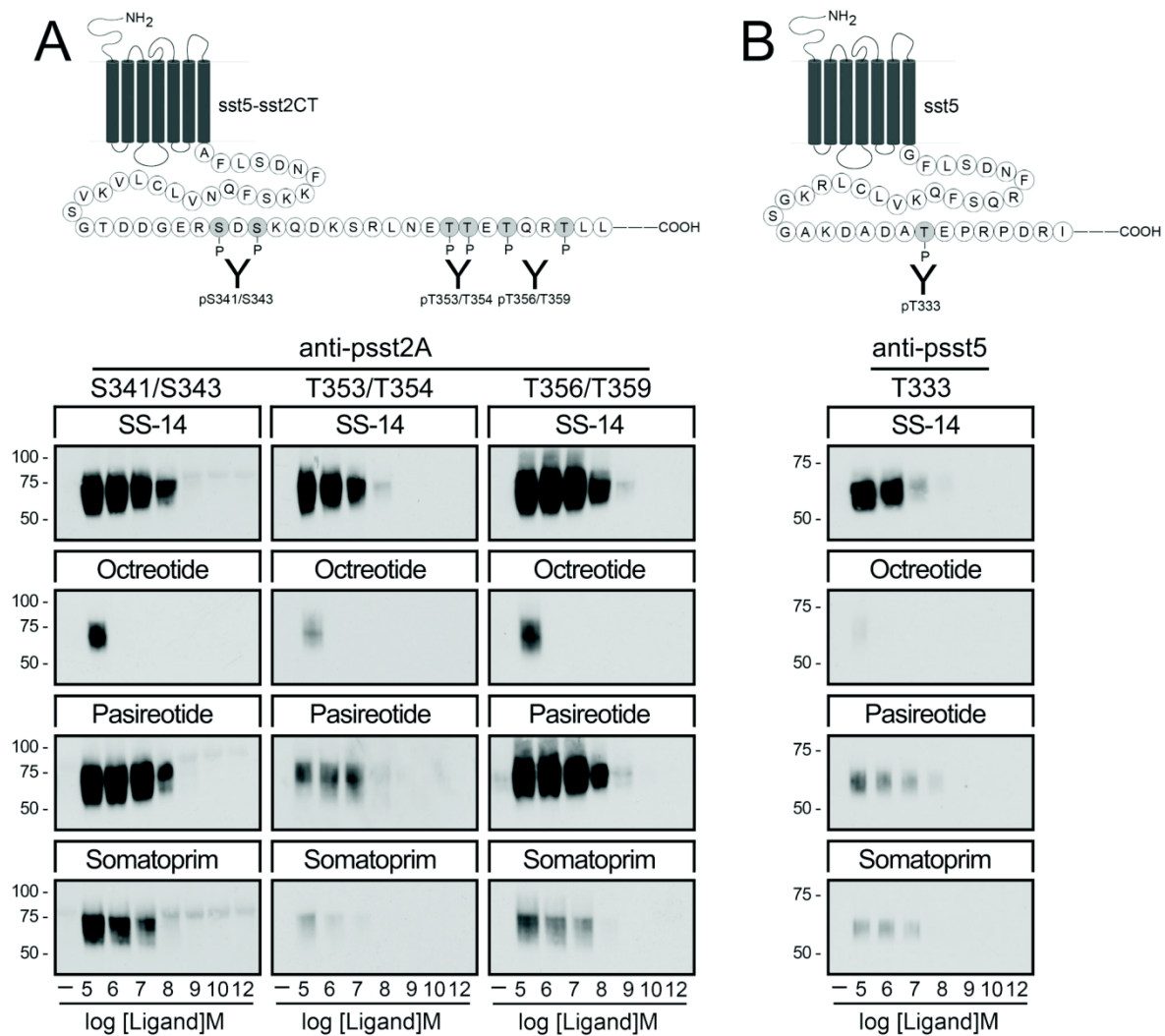




**Figure 2. Agonist-selective phosphorylation of the human sst<sub>2</sub> receptor.** (Top) Schematic representation of the human sst<sub>2</sub> receptor indicating the phosphate acceptor sites S341/343, T353/354 and T356/359 within its carboxyl-terminal tail. (Bottom) HEK293 cells stably expressing the sst<sub>2</sub> receptor were either not exposed or exposed for 5 min to SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim in concentrations ranging from 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-5</sup> M. The levels of phosphorylated sst<sub>2</sub> receptors were then determined using the phosphosite-specific antibodies anti-pS341/pS343 {3157}, anti-pT353/pT354 {0521} and anti-pT356/pT359 {0522}. Western blots shown are representative of three to five independent experiments for each condition. The positions of the molecular mass markers are indicated on the left (in kDa). doi:10.1371/journal.pone.0039458.g002

10 mM disodium pyrophosphate, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml bacitracin). Glycosylated proteins were partially enriched using wheat germ lectin-agarose beads as described [12,13,14]. Proteins were eluted from the beads using SDS-sample

buffer for 20 min at 60°C and then resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels. After electroblotting, membranes were incubated with the phosphosite-specific antibodies anti-pS341/pS343 {3157}, anti-pT353/pT354 {0521} or anti-pT356/pT359 {0522} at a concentration of 0.1 µg/ml followed by detection using enhanced chemiluminescence (Amersham). Blots



**Figure 3. Agonist-selective phosphorylation of the human sst<sub>5</sub> and sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT chimera.** (A, Top panel) Schematic representation of the sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT receptor indicating the phosphate acceptor sites S341/343, T353/354 and T356/359 within the carboxyl-terminal tail. (A, Bottom) HEK293 cells stably expressing the sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT receptor were either not exposed or exposed for 5 min to SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim in concentrations ranging from 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-5</sup> M. The levels of phosphorylated sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT receptors were then determined using the phosphosite-specific antibodies anti-pS341/pS343 [3157], anti-pT353/pT354 [0521] and anti-pT356/pT359 [0522]. (B, Top panel) Schematic representation of the human sst<sub>5</sub> receptor indicating the phosphate acceptor site T333 within its carboxyl-terminal tail. (B, Bottom) HEK293 cells stably expressing the human sst<sub>5</sub> receptors were either not exposed or exposed for 5 min to SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim in concentrations ranging from 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-5</sup> M. The levels of phosphorylated sst<sub>5</sub> receptors were then determined using the phosphosite-specific antibodies anti-pT333 [3567]. Western blots shown are representative of three to five independent experiments for each condition. The positions of the molecular mass markers are indicated on the left (in kDa). doi:10.1371/journal.pone.0039458.g003

were subsequently stripped and reprobed with anti-sst<sub>2</sub> {UMB-1} to confirm equal loading of the gels.

**Radioligand Binding Assay**

Competition binding assays were performed on membrane preparations from stable transfected cells as described above. Cells were harvested into PBS and stored at -80°C. After thawing, cells were centrifuged at 20,000×g for 10 min at 4°C and then homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 3 mM EGTA, 5 mM EDTA, pH 7.4). Cell membranes were pelleted

by centrifugation at 50,000×g for 15 min at 4°C, washed twice with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4), and resuspended in binding buffer (10 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µg/ml bacitracin, pH 7.5). For competition binding assay, aliquots of the membrane preparations containing 30 µg of protein were incubated with 0.05 nM [<sup>125</sup>I]-Tyr11]-SS-14 (specific activity: 74 TBq/mmol, PerkinElmer, USA) in the present or absence of either SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim in concentrations ranging from 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-6</sup> M. The experiment for each concentration was performed in triplicate. Assays were performed

**Table 1.** Ligand binding properties of sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT receptors.

Ligand	Ligand binding affinity IC <sub>50</sub> (nM)		
	human sst <sub>2</sub>	human sst <sub>5</sub>	human sst <sub>5</sub> -2CT
SS-14	5.7±1.1	15.5±2.6	30.3±5.0
Octreotide	1.4±0.3	28.9±4.2	38.8±11.7
Pasireotide	21.3±5.7	3.6±1.5	10.8±5.3
Somatoprim	4.7±0.6	5.6±2.2	5.4±1.6

Ligand binding assays were carried out as described under "Materials and Methods". The half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were analyzed by nonlinear regression curve fitting using the computer program GraphPad Prism. Data are presented as the mean of three independent experiments performed in triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0039458.t001

in 96-well polypropylene plates in a final volume of 200  $\mu$ l for 45 min at room temperature. Specific binding was calculated by subtracting non-specific binding – defined as that seen in the presence of 1  $\mu$ M SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim – from total binding obtained with radioligand alone. The incubation was terminated by addition of ice-cold buffer and rapid vacuum filtration through glass fiber filters presoaked in 0.3% polyethyleneimine using an Inotech cell harvester (Dittikon, Switzerland). Filters were rinsed twice with washing buffer and air-dried. Bound radioactivity was determined using a  $\gamma$ -counter (COBRAII, Packard, USA). Data from ligand binding and IC<sub>50</sub> were analyzed by curve fitting using GraphPad Prism 4.0 software [15].

### GTP $\gamma$ S Binding Assays

Cells were harvested and lysed as described above except that a lysis buffer containing 50 mM Tris, 10 mM EDTA and 1 mM EGTA (pH 7.4) was used. The resulting pellet was resuspended in assay buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). Aliquots containing 30  $\mu$ g of protein were incubated with 3  $\mu$ M GDP and 0.05 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (Specific activity – 43.3 TBq/mmol, PerkinElmer USA) in the presence or absence of either SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim in concentrations ranging from 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-6</sup> M. Assays were carried out in a final volume of 1 ml for 30 min at 30°C under continuous agitation. Nonspecific binding was determined in the presence of 10  $\mu$ M unlabeled GTP $\gamma$ S. The incubation was terminated by the addition of ice-cold buffer and rapid vacuum filtration through glass fiber filters as described above. Filters were rinsed twice with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) and dried. A scintillation mixture was added, and radioactivity was determined using a  $\beta$ -counter (1600 TR, Packard, USA) [15].

### Results

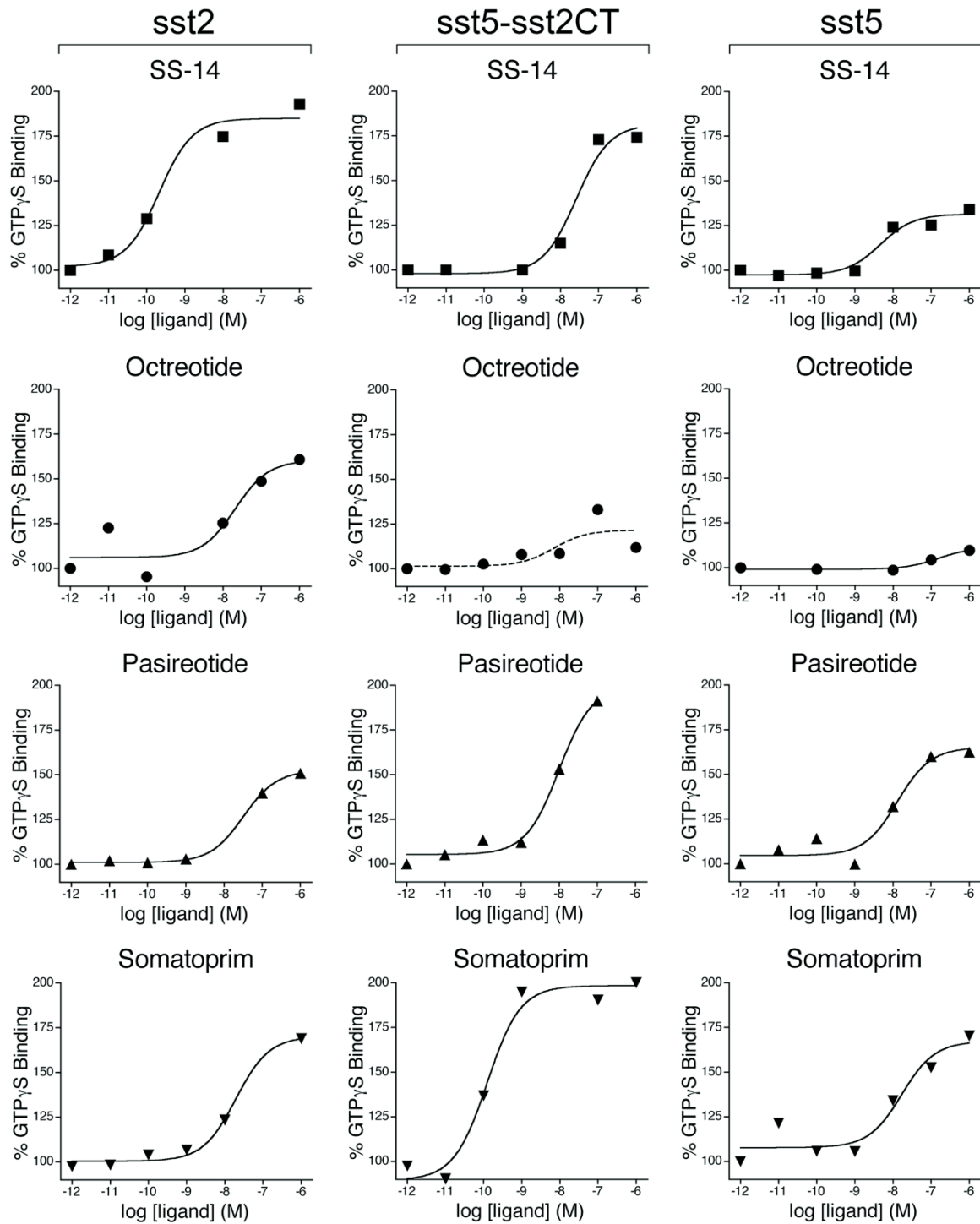
We have recently shown that pasireotide exhibits partial agonistic properties at the sst<sub>2</sub> receptor. While binding with high affinity it triggers only a partial internalization of the human sst<sub>2</sub> receptor. To test the possibility that this behavior would be a general property of all multireceptor somatostatin analogs, we evaluated the internalization profile of somatoprim in comparison to pasireotide and octreotide. First, we examined human sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> and sst<sub>5</sub> receptors expressed in HEK293 cells by confocal microscopy revealing that in the absence of agonist all three somatostatin receptor subtypes were almost exclusively confined to the plasma membrane (Figure 1, *left panel*). As shown in Figure 1

(*upper panel*), octreotide and somatoprim were able to stimulate a robust endocytosis of human sst<sub>2</sub> receptors similar to that seen after SS-14 exposure. In contrast, a saturating concentration of pasireotide induced only a very limited internalization of sst<sub>2</sub> receptors. Conversely, examination of sst<sub>3</sub>-expressing cells revealed that pasireotide promoted a more pronounced receptor sequestration than octreotide, whereas somatoprim failed to stimulate any detectable sst<sub>3</sub> internalization (Figure 1, *middle panel*). When sst<sub>5</sub>-expressing cells were exposed to SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim only the endogenous ligand SS-14 was able to stimulate a clearly detectable receptor endocytosis (Figure 1, *lower panel*).

Recently, we have generated a set of three phosphosite-specific antibodies, which allowed us to detect selectively the S341/S343-, the T353/T354- and the T356/T359-phosphorylated forms of the sst<sub>2</sub> receptor [16,17,18,19]. When HEK293 cells stably expressing the human sst<sub>2</sub> receptor were exposed for 5 min to SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim in concentrations ranging from 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-5</sup> M, SS-14, octreotide and somatoprim were able to promote a robust dose-dependent phosphorylation of all three sites (Figure 2). In contrast, pasireotide stimulated only at saturating concentration a detectable phosphorylation of S341/S343 and T356/T359 but not of T353/T354. Considering the high binding affinity of pasireotide this result was unexpected and indicates that, in contrast to octreotide and somatoprim, pasireotide is a partial agonist at the human sst<sub>2</sub> receptor. It also shows that the sst<sub>2</sub> receptor can exist in distinct active conformations, which favor different patterns of GRK-mediated phosphorylation. Thus, considerable differences may exist between the binding and efficacy profiles of pan-somatostatin analogs. It would therefore be desirable to know the patterns of phosphorylation induced by multireceptor ligands at the level of individual somatostatin receptors. However, at present phosphosite-specific antibodies are only available for the sst<sub>2</sub> receptor.

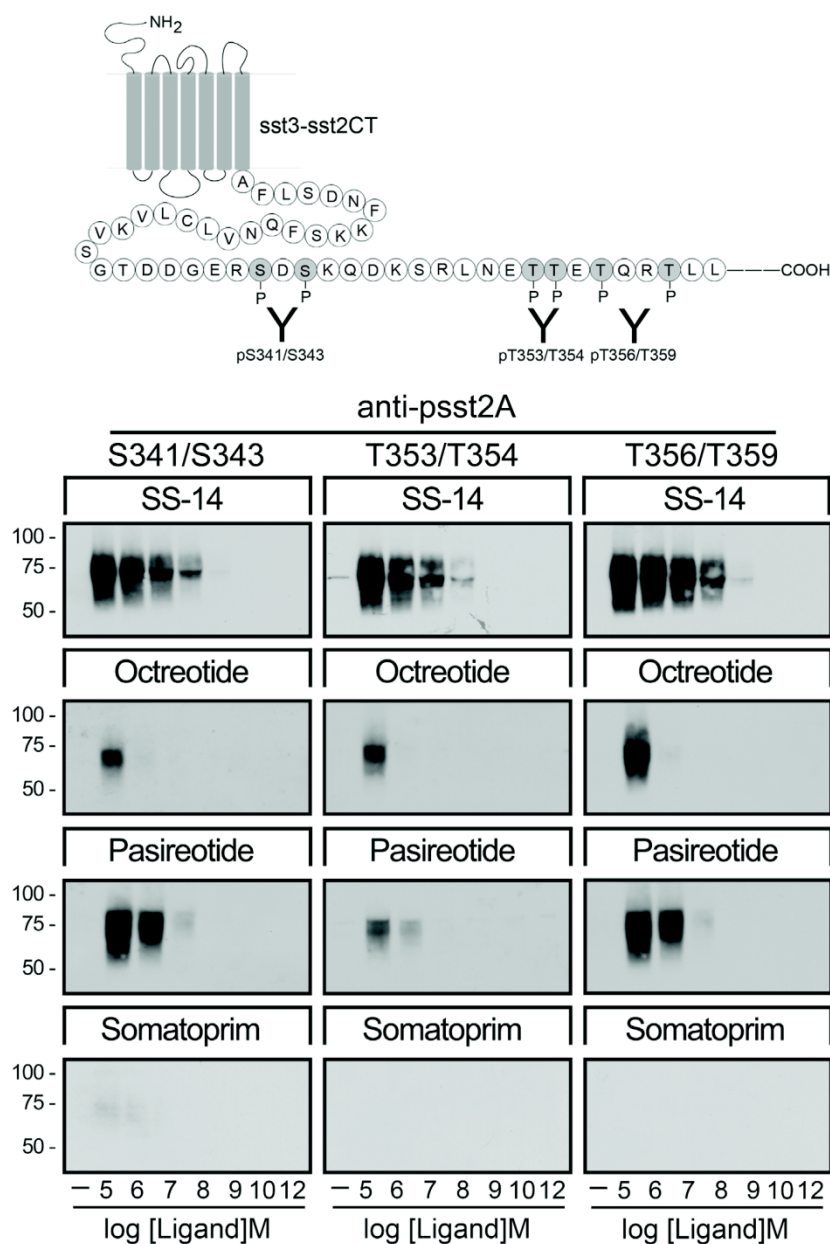
We therefore elucidated whether the carboxyl-terminal tail of the sst<sub>2</sub> receptor can be used as probe to sense the activation of other somatostatin receptors. Consequently, we transplanted the carboxyl-terminal phosphorylation motif of the sst<sub>2</sub> receptor to other clinically-relevant somatostatin receptors and assessed their patterns of activation using our set of three phosphosite-specific antibodies. Examination of cells expressing a sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT chimeric receptor revealed that SS-14 stimulated the most pronounced phosphorylation of all three sites (Figure 3 A). Pasireotide and somatoprim also promoted a robust phosphorylation of S341/S343 and T356/T359 (Figure 3 A). In contrast, octreotide induced only at saturating concentration a detectable phosphorylation of S341/S343 and T356/T359 (Figure 3 A). Interestingly, similar results were obtained at the wild-type sst<sub>5</sub> receptor using a recently generated phosphosite-specific antibody to T333 validating our approach to study receptor activation (Figure 3 B). Analysis of ligand binding properties of the sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT chimera indicated that the transfer of the sst<sub>2</sub> carboxyl-terminal tail to sst<sub>5</sub> did not substantially affect the affinities for SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim (Table 1).

We then examined the capacity of these compounds to stimulate GTP $\gamma$ S binding in membrane preparations from the same cells (Figure 4). Unlike that seen in sst<sub>2</sub> receptor phosphorylation assays, pasireotide was able to stimulate GTP $\gamma$ S binding to a similar degree as octreotide or somatoprim suggesting that pasireotide is a G protein-biased ligand. In contrast, octreotide stimulated GTP $\gamma$ S binding in both sst<sub>5</sub>- and sst<sub>5</sub>-sst<sub>2</sub>CT-expressing cells to a much lesser extent than pasireotide or somatoprim suggesting it is indeed a weak partial agonist at the sst<sub>5</sub> receptor. Again similar



**Figure 4. Agonist-stimulated  $^{35}\text{S}$ -GTP $\gamma$ S binding.** Stimulation of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding by SS-14, Octreotide, Pasireotide and Somatoprim in the concentration range of  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M. Membranes were prepared from HEK293 cells stably expressing either the human sst $_2$ , sst $_5$  and sst $_5$ -sst $_2$ CT or the rat sst $_3$ -sst $_2$ CT receptor. Values represent means of triplicate determinations. SE values were smaller than 15%. Three replicate experiments gave similar results.

doi:10.1371/journal.pone.0039458.g004



**Figure 5. Agonist-selective phosphorylation of the sst<sub>3</sub>-sst<sub>2</sub>CT chimera.** (Top) Schematic representation of the rat sst<sub>3</sub>-sst<sub>2</sub>CT chimera indicating the phosphate acceptor sites S341/343, T353/354 and T356/359 within the carboxyl-terminal tail. (Bottom) HEK293 cells stably expressing the rat sst<sub>3</sub>-sst<sub>2A</sub>CT receptor were either not exposed or exposed to concentrations of 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-5</sup> M SS-14, octreotide, pasireotide or somatoprim for 5 min. The levels of phosphorylated rsst<sub>3</sub>-sst<sub>2A</sub>CT receptors were then determined using anti-pS341/pS343 [3157], anti-pT353/pT354 [0521] or anti-pT356/pT359 [0522]. Western blots shown are representative of three to five independent experiments for each condition. The positions of the molecular mass markers are indicated on the left (in kDa).  
doi:10.1371/journal.pone.0039458.g005

results were obtained with the wild-type sst<sub>3</sub> and the sst<sub>3</sub>-sst<sub>2</sub>CT receptor.

To elucidate whether our approach can be used to directly assess the activation of a wide variety of G protein-coupled receptors, we next examined a sst<sub>3</sub>-sst<sub>2</sub>CT chimera. Examination of HEK293 cells stably expressing sst<sub>3</sub>-sst<sub>2</sub>CT receptors revealed

that only pasireotide but not octreotide was able to promote a robust phosphorylation of S341/S343 and T356/T359 (Figure 5). In contrast, somatoprim failed to induce any detectable phosphorylation. Pasireotide is less potent than octreotide in inducing internalization of the sst<sub>2</sub> receptor but more potent than octreotide in inducing internalization of the sst<sub>3</sub> receptor. Thus,

the patterns of phosphorylation of the  $rsst_3$ - $sst_2$ CT chimera correlates very well with pattern internalization of the wild-type  $sst_3$  receptor (Figure 1). Nevertheless, it should be noted that these results were obtained with rat  $sst_3$ - $sst_2$ CT receptor construct. Given the recently observed species differences for the  $sst_2$  receptor, these results need to be reproduced with the human  $sst_3$  receptor.

## Discussion

The development of new drugs targeting GPCRs is primarily focused on the discovery of compounds with nanomolar and subnanomolar binding affinities. Then indirect methods mostly assessing G protein signaling are being used to determine whether a new compound is a full or partial agonist. Accumulating evidence suggests that more than one active conformation exists for many GPCRs and that many compounds selectively stimulate specific signaling pathways [20]. Thus, there is clearly a need for methods providing more direct information on receptor activation. However, structural information is only available for a few activated receptors, and none of these has been crystallized in more than one active conformation yet [21,22]. Determination of receptor activation using biophysical methods requires insertion of bulky fluorescent proteins into the receptor which may itself affect receptor activation [23].

In the present study, we have used the phosphorylation motif of the  $sst_2$  receptor to probe GPCR activation. This approach was possible due to our recent success in generating a set of three phosphosite-specific antibodies for the  $sst_2$  receptor which allowed us to determine distinct patterns of phosphorylation induced by different agonists. Given the unique ability of GRKs to detect only active GPCRs these distinct conformations may reflect different receptor conformations. However, phosphosite-specific antibodies are notoriously difficult to generate and are only available for a few receptors. We therefore elucidated whether the carboxyl-terminal tail of the  $sst_2$  receptor can be used as probe to sense the activation of other somatostatin receptors. Perhaps the most convincing evidence that this might be a valid and useful approach comes from a  $sst_5$ - $sst_2$ CT chimera. In fact, the results obtained with the  $sst_5$ - $sst_2$ CT chimeric receptor and the wild-type  $sst_5$  receptor were very similar. We have also confirmed that insertion of the  $sst_2$  phosphorylation motif into other somatostatin receptors did not dramatically change their binding properties with regard to the compounds tested. In addition, construction of a  $sst_3$ - $sst_2$ CT chimera was also successful indicating that this approach could be

used to examine the activation of a wide variety of GPCRs. Our assay can be adapted to a quantitative ELISA method and thus be applied to screening of large numbers of ligands [24]. However, for other receptors it cannot be completely ruled out that transplantation of the  $sst_2$ CT may alter receptor function. Therefore, a functional analysis of such chimeric receptors needs to be performed in each case.

Our study also yielded valuable and previously unappreciated information about the pan-somatostatin analogs currently under clinical and preclinical examination. Pasireotide exhibited potent agonistic activity at the  $sst_5$  receptor but only weak partial agonistic properties at the  $sst_2$  receptor. Consequently, pasireotide should be classified as  $sst_5$ -preferring ligand. Octreotide is a full agonist at the  $sst_2$  receptor but exhibited virtually no agonistic activity at the  $sst_5$  receptor. Consequently, octreotide should be classified as  $sst_2$ -preferring ligand. In contrast, somatoprim is unique in that it was a potent agonist at both  $sst_2$  and  $sst_5$  receptors. In fact, this may provide the molecular basis for the recent observation that somatoprim can inhibit GH release in cases, which did not respond to octreotide [25].

In conclusion, we describe the use of a phosphorylation probe for direct assessment of GPCR activation and demonstrate its utility in the pharmacological characterization of novel pan-somatostatin analogs.

## Supporting Information

**Table S1 Ligand binding properties of rat, human and mutant somatostatin receptors.** Ligand binding assays were carried out as described under "Materials and Methods". The half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were analyzed by nonlinear regression curve fitting using the computer program GraphPad Prism. Data are presented as the mean of three independent experiments performed in triplicate. (DOC)

## Acknowledgments

We thank Heidrun Guder and Heike Stadler for excellent technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS AK FP. Performed the experiments: AK AM AP. Analyzed the data: SS AK. Wrote the paper: SS AK.

## References

- Donangelo I, Melmed S (2005) Treatment of acromegaly: future. *Endocrine* 28: 123–128.
- Oberg KE, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Krenning EP (2010) Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 139: 742–753, 753 e741.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G (2002) SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146: 707–716.
- Lewis I, Bauer W, Albert R, Chandramouli N, Pless J, et al. (2003) A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential. *J Med Chem* 46: 2334–2344.
- Ma P, Wang Y, van der Hoek J, Nedelman J, Schran H, et al. (2005) Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of a novel multiligand somatostatin analog, SOM230, with octreotide in patients with acromegaly. *Clin Pharmacol Ther* 78: 69–80.
- Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, Glusman JE, Petersenn S, et al. (2009) Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 115–122.
- Pedroncelli AM (2010) Medical treatment of Cushing's disease: somatostatin analogues and pasireotide. *Neuroendocrinology* 92 Suppl 1: 120–124.
- Petersenn S, Schopohl J, Barkan A, Mohideen P, Colao A, et al. (2009) Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2781–2789.
- Poll F, Lehmann D, Illing S, Ginj M, Jacobs S, et al. (2010) Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of  $sst_2A$  somatostatin receptor phosphorylation. *Mol Endocrinol* 24: 436–446.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, et al. (2008) Reassessment of  $sst_2$  somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4519–4524.
- Lesche S, Lehmann D, Nagel F, Schmid HA, Schulz S (2009) Differential effects of octreotide and pasireotide on somatostatin receptor internalization and trafficking in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 654–661.
- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Hollt V, Schulz S, et al. (2003) Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5150–5157.
- Plockinger U, Albrecht S, Mawrin C, Saeger W, Buchfelder M, et al. (2008) Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1203–1210.

14. Schulz S, Pauli SU, Schulz S, Handel M, Dietzmann K, et al. (2000) Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of somatostatin receptor subtype sst2A. *Clin Cancer Res* 6: 1865–1874.
15. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, et al. (2001) Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* 276: 14027–14036.
16. Kobilka BK, Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 397–406.
17. Liu Q, Bec MS, Schonbrunn A (2009) Site specificity of agonist and second messenger-activated kinases for somatostatin receptor subtype 2A (Sst2A) phosphorylation. *Mol Pharmacol* 76: 68–80.
18. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356–363.
19. Wess J, Han SJ, Kim SK, Jacobson KA, Li JH (2008) Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 29: 616–625.
20. Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ (2011) Molecular Mechanism of  $\beta$ -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
21. Kobilka BK (2011) Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 32: 213–218.
22. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, et al. (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477: 549–555.
23. Ambrosio M, Zurn A, Lohse MJ (2011) Sensing G protein-coupled receptor activation. *Neuropharmacology* 60: 45–51.
24. Ghosh M, Schonbrunn A (2011) Differential temporal and spatial regulation of somatostatin receptor phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 286: 13561–13573.
25. Plockinger U, Hoffmann U, Geese M, Lupp A, Buchfelder M, et al. (2012) DG3173 (somatoprim), a unique somatostatin receptor subtypes 2-, 4- and 5-selective analogue, effectively reduces GH secretion in human GH-secreting pituitary adenomas even in Octreotide non-responsive tumours. *Eur J Endocrinol* 166: 223–234.



---

## 3.2 Manuskript II

# Carboxyl-Terminal Receptor Domains Control the Differential Dephosphorylation of Somatostatin Receptors by Protein Phosphatase 1 Isoforms

---

Andreas Lehmann, Andrea Kliewer, Carlo Märtens, Falko Nagel and Stefan Schulz

PLoS ONE *in revision*

### Autorenschaft

Co-Autor

### Beitrag der Autoren

Der experimentelle Teil wurde von Stefan Schulz, Andreas Lehmann und Andrea Kliewer entworfen. Falko Nagel und Andrea Kliewer designten die *Tail-Swap*-Mutanten. Andreas Lehmann, Andrea Kliewer und Carlo Märtens führten die Experimente durch. Die Daten wurden von Andreas Lehmann und Andrea Kliewer analysiert. Andreas Lehmann und Andrea Kliewer entwarfen die Abbildungen. Das Manuskript wurde von Andreas Lehmann und Stefan Schulz geschrieben.



## Zusammenfassung

Für verschiedene GPCRs existieren spezifische PP1-Isoformen, welche mit bemerkenswerter Selektivität rekrutiert werden. In der hier vorgelegten Publikation wurde untersucht, welche Rezeptordomäne für die Selektivität der PP1 bei der Rezeptor-Dephosphorylierung eine entscheidende Rolle spielt. Mit Hilfe von *Tail-Swap*-Mutanten des *sst*<sub>2</sub>- und *sst*<sub>5</sub>-Rezeptors konnten wir zeigen, dass der C-terminale Bereich von GPCRs nicht nur eine wichtige Determinante für die Selektivität der PP1 darstellt, sondern tiefgreifende Konsequenzen für die Dynamik der Dephosphorylierung und das *Trafficking* von GPCRs hat.

---

**Carboxyl-Terminal Receptor Domains Control the Differential  
Dephosphorylation of Somatostatin Receptors  
by Protein Phosphatase 1 Isoforms**

*Andreas Lehmann, Andrea Kliewer, Jan Carlo Märtens, Falko Nagel and Stefan  
Schulz*

Institute of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital, Friedrich-  
Schiller-University, 07747 Jena, Germany

Running Title: Regulation of GPCR phosphatase specificity

Abbreviations used: HEK293, human embryonic kidney 293 cells; GPCR, G-protein  
coupled receptor; SS-14, somatostatin-14; sst, somatostatin receptor.

All correspondence should be addressed to: Stefan Schulz, Institute of  
Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital - Friedrich Schiller University  
Jena, Drackendorfer Straße 1, D-07747 Jena, Germany, Phone: +49-3641-9325650,  
FAX: +49-3641-9325652, Email: [Stefan.Schulz@mti.uni-jena.de](mailto:Stefan.Schulz@mti.uni-jena.de).

Grant support: This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft  
grant SCHU924/10-3 and the Deutsche Krebshilfe grant 109952.

---

## Abstract

We have recently identified protein phosphatase 1 $\beta$  (PP1 $\beta$ ) as G protein-coupled receptor (GPCR) phosphatase for the sst<sub>2</sub> somatostatin receptor using siRNA knockdown screening. By contrast, for the sst<sub>5</sub> somatostatin receptor we identified protein phosphatase 1 $\gamma$  (PP1 $\gamma$ ) as GPCR phosphatase using the same approach. We have also shown that sst<sub>2</sub> and sst<sub>5</sub> receptors differ substantially in the temporal dynamics of their dephosphorylation and trafficking patterns. Whereas dephosphorylation and recycling of the sst<sub>2</sub> receptor requires extended time periods of ~30 min, dephosphorylation and recycling of the sst<sub>5</sub> receptor is completed in less than 10 min. Here, we examined which receptor domains determine the selection of phosphatases for receptor dephosphorylation. We found that generation of tail-swap mutants between sst<sub>2</sub> and sst<sub>5</sub> was required and sufficient to completely reverse the patterns of dephosphorylation and trafficking of these two receptors. In fact, siRNA knockdown confirmed that the sst<sub>5</sub> receptor carrying the sst<sub>2</sub> tail is predominantly dephosphorylated by PP1 $\beta$ , whereas the sst<sub>2</sub> receptor carrying the sst<sub>5</sub> tail is dephosphorylated by PP1 $\gamma$ . Thus, GPCR phosphatase specificity of individual somatostatin receptor subtypes is primarily determined by their different carboxyl-terminal receptor domains. This phosphatase specificity has in turn profound consequences for the dephosphorylation dynamics and trafficking patterns of GPCRs.

**Key words:** somatostatin, somatostatin receptor, G protein-coupled receptor, G protein-coupled receptor kinase, protein phosphatase 1

---

## Introduction

The signaling output of G protein-coupled receptors (GPCRs) is desensitized by mechanisms involving phosphorylation,  $\beta$ -arrestin binding and internalization. GPCR signaling is resensitized by mechanisms involving dephosphorylation, but details about the phosphatases responsible are generally lacking. We and others have recently succeeded in identifying bona fide GPCR phosphatases for a number of receptors using a combined approach of phosphosite-specific antibodies and siRNA screening in HEK293 cells. First, we identified protein phosphatase 1 $\beta$  (PP1 $\beta$ ) as GPCR phosphatase for the *sst*<sub>2</sub> somatostatin receptor [1]. Second, we identified PP1 $\gamma$  as GPCR phosphatase for the  $\mu$ -opioid receptor and the *sst*<sub>5</sub> somatostatin receptor [2] [3]. Third, more recently Gehret and Hinkle identified PP1 $\alpha$  as GPCR phosphatase for the thyrotropin-releasing hormone receptor [4]. All of the above observations were made in a similar cellular background. This suggests that a given GPCR may recruit its specific PP1 isoform for rapid dephosphorylation with remarkable selectivity. However, it is not known which GPCR domain directs the engagement of specific PP1 isoforms to the receptor.

Here, we have addressed this question using the closely-related *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> somatostatin receptors. The *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> receptors exhibit a high degree of homology in their transmembrane domains but exhibit divergent carboxyl-terminal tails. Both the *sst*<sub>2</sub> and the *sst*<sub>5</sub> receptor are pharmacological relevant targets for clinically-used drugs [5] [6] [7] [8] [9] but the two receptors exhibit strikingly different phosphorylation and trafficking patterns. The *sst*<sub>2</sub> receptor is a prototypical class B receptor that is phosphorylated at a cluster of at least six carboxyl-terminal serine and threonine residues upon agonist exposure. The *sst*<sub>2</sub> receptor then forms a stable

---

complex with  $\beta$ -arrestin that co-internalize into the same endocytic vesicles. Consequently, the  $sst_2$  receptor recycles slowly [1] [10] [11]. By contrast, the  $sst_5$  receptor is a prototypical class A receptor in that its endocytosis is regulated by a single phosphorylation at T333. The  $sst_5$  receptor then forms relatively unstable  $\beta$ -arrestin complexes that dissociate at or near the plasma membrane. The receptor internalizes without  $\beta$ -arrestin and recycles rapidly [2] [12]. Here, we show that a tail-swap mutation of  $sst_2$  and  $sst_5$  receptors is required and sufficient to completely reverse the patterns of dephosphorylation and trafficking of these two receptors.

---

## Materials and Methods

**Reagents, plasmids and antibodies.** SS-14 was obtained from Bachem (Weil am Rhein, Germany). DNA for HA-tagged human  $sst_2$  and  $sst_5$  receptor, 2-5- and 5-2-chimaera were generated via artificial gene synthesis and cloned into pcDNA3.1 by imaGenes (Berlin, Germany). The human HA-tagged  $sst_2$  receptor was obtained from UMR cDNA Resource Center (Rolla, MO). The phosphorylation-independent rabbit monoclonal anti- $sst_2$  antibody {UMB-1} and anti- $sst_5$  antibody {UMB-4} were obtained from Epitomics. The phosphosite-specific  $sst_{2A}$  antibodies anti-pS341/pS343 {3157}, anti-pT353/pT354 {0521}, anti-pT356/pT359 {0522} and phosphosite-specific  $sst_5$  antibodies anti-pT333 {3567} as well as the rabbit polyclonal anti-HA antibodies were generated and extensively characterized as previously described [1] [2].

**Cell culture and transfection.** Human embryonic kidney HEK293 cells were obtained from the German Resource Centre for Biological Material (DSMZ, Braunschweig, Germany). HEK293 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were transfected with plasmids using Lipofectamine 2000 according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Stable transfectants were selected in the presence of 400  $\mu$ g/ml G418. Stable cells were characterized using radioligand-binding assays, Western blot analysis, and immunocytochemistry as described previously. All receptors and chimeras tested were present at the cell surface, expressed similar amounts of receptor protein and had similar affinities for SS-14 as the wild-type receptors.

---

**Analysis of receptor internalization by confocal microscopy.** Cells were grown on poly-L-lysine-coated coverslips overnight. After the appropriate treatment with SS-14 at 37 °C, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in phosphate buffer (pH 6.9) for 30 min at room temperature and washed several times. Specimens were permeabilized and then incubated with anti-sst<sub>2A</sub> {UMB-1} or anti-sst5 antibody {UMB-4} antibodies followed by Alexa488-conjugated secondary antibodies. Specimens were mounted and examined using a Zeiss LSM510 META laser scanning confocal microscope.

**Western blot analysis.** Cells were plated onto 60-mm dishes and grown to 80% confluence. After treatment with SS-14, cells were lysed in detergent buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM disodium pyrophosphate, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml bacitracin). All phosphorylation and dephosphorylation assays were performed at both physiological temperature (37 °C) and at room temperature (22 °C) for the indicated time periods. Glycosylated proteins were partially enriched using wheat germ lectin-agarose beads as described. Proteins were eluted from the beads using SDS-sample buffer for 20 min at 65 °C and then resolved on 8 % SDS-polyacrylamide gels. After electroblotting, membranes were incubated with phosphosite-specific antibodies anti-pS341/pS343 {3157}, anti-pT353/pT354 {0521}, anti-pT356/pT359 {0522}, anti-pT333 {3567} at a concentration of 0.1 µg/ml followed by detection using enhanced chemiluminescence. Blots were subsequently stripped and reprobed with anti-sst<sub>2A</sub> antibody {UMB-1} or anti-sst5 antibody {UMB-4} to confirm equal loading of the gels.

---

**$\beta$ -Arrestin-EGFP mobilization assay.** HEK293 cells were seeded onto 35-mm glass-bottom culture dishes (Mattek, Ashland, MA). The next day, cells were transiently cotransfected with 0.2  $\mu$ g  $\beta$ -arrestin-2-EGFP and 2  $\mu$ g human or chimeric somatostatin receptors. After 24 h, cells were transferred onto a temperature-controlled microscope stage set at 37 °C of a Zeiss LSM510 META laser scanning confocal microscope. Images were collected sequentially using single line excitation at 488 nm with 515–540-nm band pass emission filters. Saturating concentrations of SS-14 were applied directly into the culture medium immediately after the initial image was taken.

**Small Interfering RNA Silencing of Gene Expression.** Chemically synthesized double-stranded siRNA duplexes (with 3' dTdT overhangs) were purchased from Qiagen (Hilden, Germany) for the following targets: PP1 $\alpha$  catalytic subunit (5'-AAGAGACGCTACAACATCAAA-3'), PP1 $\beta$  catalytic subunit (5'-ACGAGGATGTCGTCCAGGAA-3' and 5'-GTTCGAGGCTTATGTATCA-3'), PP1 $\gamma$  catalytic subunit (5'-ACATCGACAGCATTATCCAA-3' and 5'-AGAGGCAGTTGGTCACTCT-3'), and a nonsilencing RNA duplex (5'-GCTTAGGAGCATTAGTAAA-3' or 5'-AAA CTC TAT CTG CAC GCT GAC-3'). HEK293 cells were transfected with 150 nM siRNA for single transfection or with 100 nM of each siRNA for double transfection using HiPerFect (Qiagen). Silencing was quantified by immunoblotting. All experiments showed protein levels reduced by  $\geq 80\%$ .

**Data Analysis.** Data were analyzed using GraphPad Prism 4.0 software. Statistical analysis was carried out with Students t-test as well as with one-way or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. p-Values of  $< 0.05$  were considered statistically significant.



---

## Results

The  $sst_2$  and  $sst_5$  receptors exhibit a high degree of homology, yet these somatostatin receptors are dephosphorylated by different PP1 isoforms. To elucidate which receptor domains determine this remarkable phosphatase specificity, we first constructed tail-swap mutants of these two receptors. In initial studies, we confirmed that all receptors were expressed at similar levels on the cell surface, and exhibited similar binding and signaling properties (not shown). We then compared agonist-induced phosphorylation of the wild-type  $sst_2$  receptor with that of the  $sst_{5-2}$  receptor using phosphosite-specific antibodies for pS341/343, pT353/354 and pT356/359 (Figure 1, *left panel*). Phosphorylation at the three sites was not detectable in untreated cells. In the presence of SS-14 phosphorylation at all three sites became detectable within seconds of agonist exposure in both the  $sst_2$  and the  $sst_{5-2}$  receptor. Next, we compared agonist-induced phosphorylation of the wild-type  $sst_5$  receptor with that of the  $sst_{2-5}$  receptor using phosphosite-specific antibodies for pT333 (Figure 1, *right panel*). Upon addition of SS-14 T333 phosphorylation occurred within a few seconds in both  $sst_5$  and  $sst_{2-5}$  receptors.

The  $sst_2$  receptor and the  $sst_5$  receptor dramatically differ in the extent of their agonist-induced internalization. In the presence of SS-14, nearly all cell surface  $sst_2$  receptors are removed from the plasma membrane (Figure 2). By contrast, the  $sst_5$  shows only partial receptor internalization with a large proportion of receptors remaining at the plasma membrane (Figure 2). Interestingly, swapping the cytoplasmic tails completely reversed this trafficking pattern in that the  $sst_{5-2}$  receptor revealed complete and the  $sst_{2-5}$  receptor partial endocytosis (Figure 2). We then employed functional  $\beta$ -arrestin-2 conjugated to enhanced green fluorescent protein

---

(EGFP) to visualize the patterns of  $\beta$ -arrestin mobilization in live HEK293 cells. In the absence of agonist,  $\beta$ -arrestin-2-EGFP was uniformly distributed throughout the cytoplasm of the cells (Figure 3). The addition of saturating concentrations of SS-14 to the human  $sst_2$  receptor induced a long-lasting redistribution of  $\beta$ -arrestin-2 from the cytoplasm to the plasma membrane resulting in robust fluorescent staining outlining the cell shape (Figure 3). The addition of saturating concentrations of SS-14 to the human  $sst_5$  receptor induced a transient redistribution of  $\beta$ -arrestin-2 from the cytoplasm to the plasma membrane resulting in predominant punctate fluorescent staining outlining the cell shape (Figure 3). Again, swapping the cytoplasmic tails led to a complete reversal of the  $\beta$ -arrestin trafficking patterns of these two receptors (Figure 3).

The  $sst_2$  receptor and the  $sst_5$  receptor also dramatically differ in their patterns of dephosphorylation and recycling. Interestingly, dephosphorylation of individual  $sst_2$  phosphate acceptor sites occurs with distinct temporal dynamics. Whereas T353/T354 dephosphorylation occurred rapidly, T356/T359 dephosphorylation was delayed and S341/S343 dephosphorylation is only observed after extended SS-14 washout (Figure 4). When  $sst_5$ -expressing cells were exposed to SS-14 for 5 min, washed and then incubated in agonist-free medium, T333 dephosphorylation occurred very rapidly (Figure 4). Analysis of chimeric receptor under identical conditions showed that transplantation of the  $sst_2$  tail to the  $sst_5$  receptor led to an  $sst_2$ -like dephosphorylation profile (Figure 4). Conversely, transplantation of the  $sst_5$  tail to the  $sst_2$  receptor led to an  $sst_5$ -like dephosphorylation profile (Figure 4).

Finally, we elucidated the PP1 specificity of the  $sst_2$  receptor and the  $sst_5$  receptor as well as their respective tail-swap mutants. To date, three distinct catalytic subunits  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  are known for PP1 [13]. To elucidate which of these PP1 isoforms

---

is involved in  $sst_5$  dephosphorylation, we performed siRNA knockdown experiments. As depicted in Figure 5, PP1 $\beta$  knockdown resulted in a robust inhibition of  $sst_2$  dephosphorylation. In contrast, transfection of PP1 $\alpha$  or PP1 $\beta$  siRNA had no or very little effect on  $sst_2$  dephosphorylation (Figure 5). For the  $sst_5$  receptor only PP1 $\gamma$  knockdown resulted in a robust inhibition of its dephosphorylation, while transfection of PP1 $\alpha$  or PP1 $\beta$  siRNA had no effect (Figure 5). Interestingly, swapping the cytoplasmic tails conferred PP1 $\gamma$  specificity to the  $sst_2$  receptor and PP1 $\beta$  specificity to the  $sst_5$  receptor (Figure 5). These results suggest that PP1 specificity of individual somatostatin receptor subtypes is primarily determined by their different carboxyl-terminal receptor domains.

---

## Discussion

Although the regulation of agonist-induced phosphorylation and internalization has been studied in detail for many GPCRs, the molecular mechanisms and functional consequences of receptor dephosphorylation are far from understood. We have recently observed that closely related somatostatin receptor subtypes can be dephosphorylated by distinct PP1 isoforms. However, it is not known which GPCR domain directs the engagement of specific PP1 isoforms to the receptor. The major finding of this study is that carboxyl-terminal regions of different somatostatin receptor subtypes is a major determinant for their PP1 selectivity. This conclusion is based on the observation that transplantation of the *sst*<sub>2</sub> tail to the *sst*<sub>5</sub> receptor led to a predominant dephosphorylation by PP1 $\beta$ , whereas transplantation of the *sst*<sub>5</sub> tail to the *sst*<sub>2</sub> receptor led to a predominant dephosphorylation by PP1 $\gamma$ . Moreover, swapping the cytoplasmic tails led to a complete reversal of the trafficking profiles of these two receptors.

The remarkable selectivity in the recruitment of specific PP1 catalytic subunits to individual somatostatin receptor subtypes is surprising. PP1 catalytic subunits bind to their regulatory subunits and some substrates in a mutually exclusive manner through a conserved RVxF motif. The three isoforms of the PP1 catalytic subunit share greater than 90% sequence identity, including the regions that interact with the RVxF sequence [13]. However, neither the human *sst*<sub>2</sub> nor the human *sst*<sub>5</sub> receptor has a potential PP1-binding motif in its carboxyl-terminal tail suggesting that somatostatin receptors do not bind to PP1 exclusively by the canonical RVxF motif. Instead, association of PP1 may occur directly through a noncanonical interaction or multiple weak interactions or indirectly via one or more regulatory subunits of PP1.

---

Such targeting PP1 subunits are prime candidates to bring phosphatases in proximity to phosphorylated GPCRs. Nevertheless, the identity of the targeting PP1 subunits remains to be elucidated for both *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub>.

Somatostatin receptor subtypes exhibit strikingly different  $\beta$ -arrestin trafficking patterns. The *sst*<sub>2</sub> receptor is a prototypical class B receptor that is phosphorylated at clusters of carboxyl-terminal serine and threonine residues. In turn the *sst*<sub>2</sub> receptor forms stable  $\beta$ -arrestin complexes, co-internalizes with  $\beta$ -arrestin and recycles slowly. By contrast, *sst*<sub>5</sub> is a prototypical class A receptor in that its endocytosis is driven by phosphorylation of a single threonine residue. The *sst*<sub>5</sub> receptor then forms unstable  $\beta$ -arrestin complexes, internalizes without  $\beta$ -arrestin and recycles rapidly. Thus, our finding that swapping the cytoplasmic tails led not only to reversal of the PP1 specificity but also to complete reversal of the  $\beta$ -arrestin trafficking profiles of somatostatin receptors suggests a simple model in which fast recycling class A receptors are preferentially dephosphorylated by PP1 $\gamma$ , whereas slow recycling class B receptors are preferentially dephosphorylated by PP1 $\beta$ . So far only few bona fide GPCR phosphatases have been identified [14] [15] [1] [2] [4]. However, it should be noted that this hypothesis is supported by our recent observation that the  $\mu$ -opioid receptor, which is a prototypical fast recycling class A receptor, is rapidly dephosphorylated by PP1 $\gamma$  [3].

In conclusion, different GPCRs can recruit specific PP1 isoforms for their rapid dephosphorylation with remarkable selectivity. This GPCR phosphatase specificity is primarily determined by carboxyl-terminal receptor domains. Recruitment of different GPCR phosphatases has in turn profound consequences for the dephosphorylation dynamics and trafficking patterns of GPCRs.

## **Acknowledgements**

We thank Heidrun Guder and Heike Stadler for excellent technical assistance. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant SCHU924/10-3 and the Deutsche Krebshilfe grant 109952.

---

## References

1. Poll F, Lehmann D, Illing S, Ginj M, Jacobs S, Lupp A, et al. (2010) Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of sst2A somatostatin receptor phosphorylation. *Mol Endocrinol*;24:436-46.
2. Petrich A, Mann, A., Kliewer, A., Nagel, F., Strigli, A., Martens, J.C., Poll, F. & Schulz, S. (2013) Phosphorylation of Threonine 333 Regulates Trafficking of the Human sst5 Somatostatin Receptor. *Mol Endocrinol*;24:436-46.
3. Doll C, Poll, F., Peuker, K., Loktev, A., Gluck, L. & Schulz, S. (2012) Deciphering micro-opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol*;167:1259-70.
4. Gehret AU, Hinkle PM. (2013) siRNA screen identifies the phosphatase acting on the G protein-coupled thyrotropin-releasing hormone receptor. *ACS Chem Biol*;8:588-98.
5. Donangelo I, Melmed S. (2005) Treatment of acromegaly: future. *Endocrine*;28:123-8.
6. Gatto F, Feelders RA, van der Pas R, Kros JM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, et al. (2013) Immunoreactivity score using an anti-sst2A receptor monoclonal antibody strongly predicts the biochemical response to adjuvant treatment with somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*;98:E66-71.
7. Oberg KE, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. (2010) Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology*;139:742-53, 53 e1.

- 
8. Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, et al. (2012) A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *N Engl J Med*;366:914-24.
  9. Feelders RA, Hofland LJ. (2013) Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*;98:425-38.
  10. Liu Q, Dewi DA, Liu W, Bee MS, Schonbrunn A. (2008) Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding. *Mol Pharmacol*;73:292-304.
  11. Tulipano G, Stumm R, Pfeiffer M, Kreienkamp HJ, Holtt V, Schulz S. (2004) Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem*;279:21374-82.
  12. Peverelli E, Mantovani G, Calebiro D, Doni A, Bondioni S, Lania A, et al. (2008) The third intracellular loop of the human somatostatin receptor 5 is crucial for arrestin binding and receptor internalization after somatostatin stimulation. *Mol Endocrinol*;22:676-88.
  13. Choy MS, Page R, Peti W. (2012) Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins. *Biochem Soc Trans*;40:969-74.
  14. Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem*;272:5-8.
  15. Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*;92:8343-7.



---

## Figure Legends

**Figure 1. Agonist-induced phosphorylation of *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> tail-swap mutants.** *Top*, Schematic representation of the human wild-type *sst*<sub>2</sub> (depicted in grey) and human wild-type *sst*<sub>5</sub> receptors (depicted in black) and their corresponding tail-swap mutants. Phosphate acceptor sites targeted for the generation of phosphosite-specific antibodies are depicted as circles. *Bottom*, stably transfected HEK 293 cells were exposed to 1  $\mu$ M SS-14 at room temperature for the indicated time periods. Cells were lysed and immunoblotted with the indicated phosphosite-specific antibodies. Blots were then stripped and reprobbed with the phosphorylation-independent anti-*sst*<sub>5</sub> antibody {UMB-4} or anti-*sst*<sub>2</sub> antibody {UMB-1} to confirm equal loading of the gels. Shown are representative results from one of three independent experiments. The position of molecular mass markers is indicated on the left (in kDa).

**Figure 2. Agonist-induced internalization of *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> tail-swap mutants.** Stably transfected HEK293 cells were treated with 1  $\mu$ M SS-14 for 5, 15 or 30 min. Cells were then fixed, stained with the anti-*sst*<sub>2</sub> {UMB-1} or anti-*sst*<sub>5</sub> antibody {UMB-4} and examined by confocal microscopy. Shown are representative images from one of at least three independent experiments. *Scale bar*, 20  $\mu$ m.

**Figure 3. Agonist-induced  $\beta$ -arrestin mobilization of *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> tail-swap mutants.** HEK293 cells were transiently transfected with *sst*<sub>2</sub>, *sst*<sub>5</sub>, *sst*<sub>2-5</sub> or *sst*<sub>5-2</sub> and  $\beta$ -arrestin-2-EGFP. The distribution of  $\beta$ -arrestin-2 was visualized sequentially in the same live cells before (0 min) and after the addition of 1  $\mu$ M SS-14

---

to the culture medium. Shown are representative images from one of three independent experiments. *Scale bar*, 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4. Dephosphorylation of *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> tail-swap mutants.** Stably transfected HEK 293 cells were exposed to 1  $\mu\text{M}$  SS-14 for 5 min, washed and incubated at room temperature in the absence of agonist for the indicated time periods. Cells were lysed and immunoblotted with the indicated phosphosite-specific antibodies. Blots were then stripped and reprobated with the phosphorylation-independent anti-*sst*<sub>5</sub> antibody {UMB-4} or anti-*sst*<sub>2</sub> antibody {UMB-1} to confirm equal loading of the gels. Shown are representative results from one of three independent experiments. The position of molecular mass markers is indicated on the left (in kDa).

**Figure 5: PP1 specificity of *sst*<sub>2</sub> and *sst*<sub>5</sub> tail-swap mutants.** (A) HEK 293 cells stably expressing the *sst*<sub>2</sub> receptor or the *sst*<sub>5-2</sub> tail-swap mutant were transfected with siRNA targeted to PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$ , PP1 $\gamma$  or non-silencing siRNA control (SCR) for 72 h and then exposed to 1  $\mu\text{M}$  SS-14 for 5 min. Cells were washed three times and then incubated for 0, 15 or 30 min in the absence of agonist. Cells were lysed and immunoblotted with anti-pT356/T359 antibody {0522}. Blots were stripped and reprobated with the phosphorylation-independent anti-*sst*<sub>2</sub> antibody {UMB-1} to confirm equal loading of the gels. (B) HEK 293 cells stably expressing the *sst*<sub>5</sub> receptor or the *sst*<sub>2-5</sub> tail-swap mutant were transfected with siRNA targeted to PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$ , PP1 $\gamma$  or non-silencing siRNA control (SCR) for 72 h and then exposed to 1  $\mu\text{M}$  SS-14 for 5 min. Cells were washed three times and then incubated for 0, 2 or 5 min in the absence of agonist. Cells were lysed and immunoblotted with anti-pT333

---

{3567} antibody. Blots were stripped and reprobed with the phosphorylation-independent anti-sst5 antibody {UMB-4} to confirm equal loading of the gels. Receptor phosphorylation was quantified and expressed as percentage of maximal phosphorylation in SCR-transfected cells, which was set at 100%. Data correspond to the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Results were analyzed by two-way ANOVA. (C) siRNA knockdown of PP1 was confirmed by Western blot using isoform-specific PP1 antibodies. The positions of molecular mass markers are indicated on the left (in kDa).

Figure 1

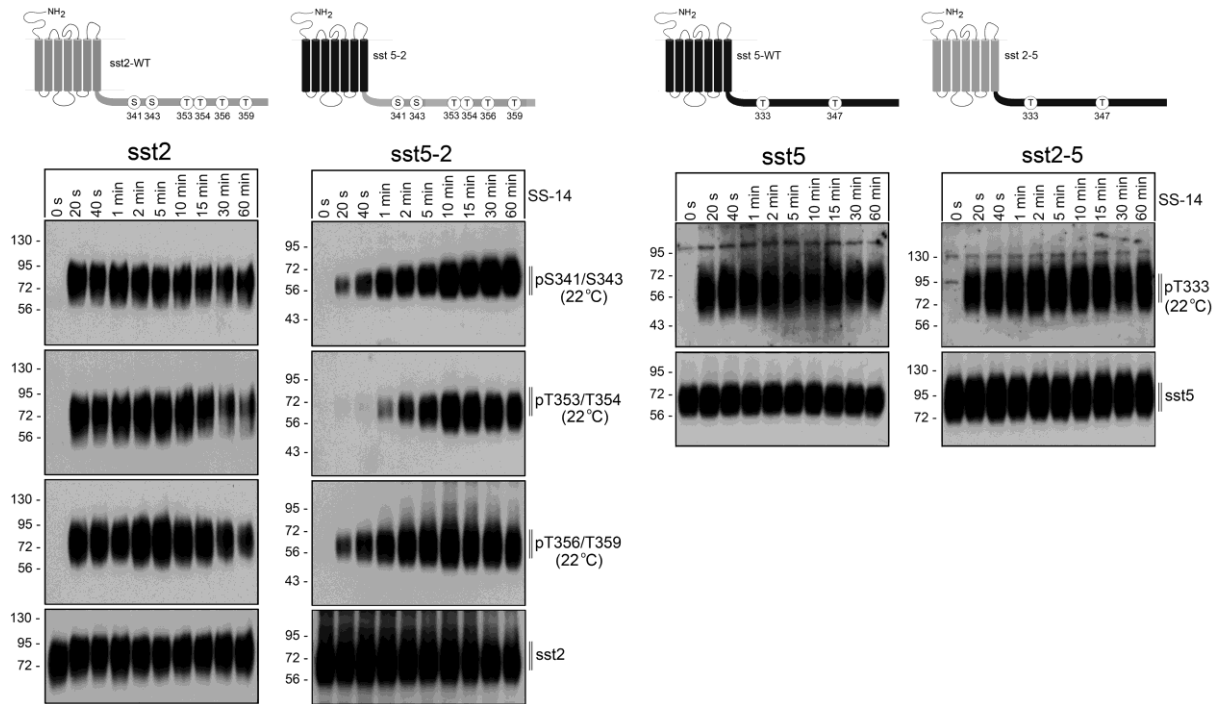


Figure 2

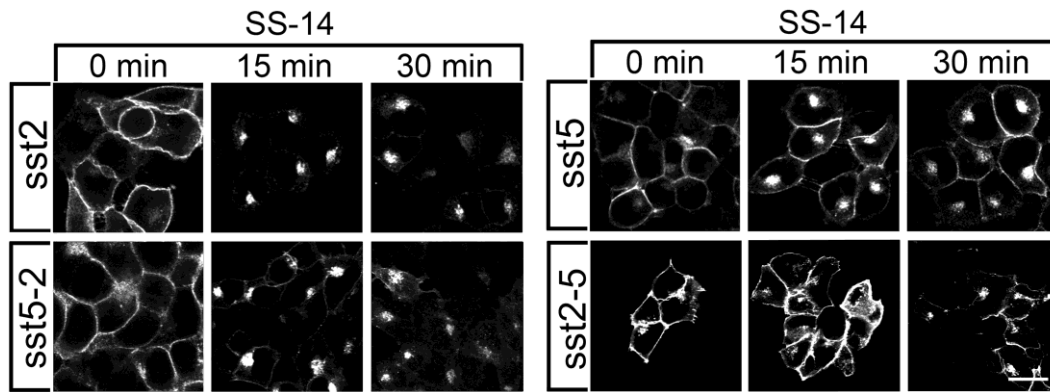


Figure 3

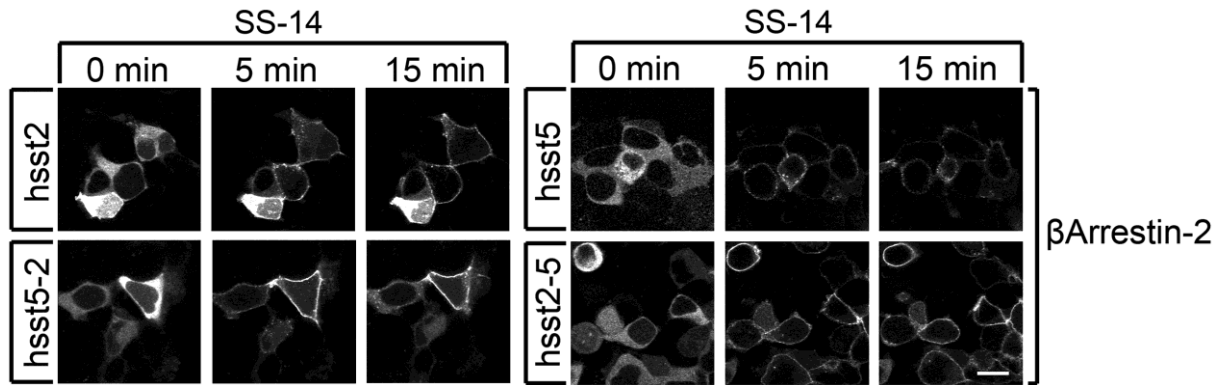


Figure 4

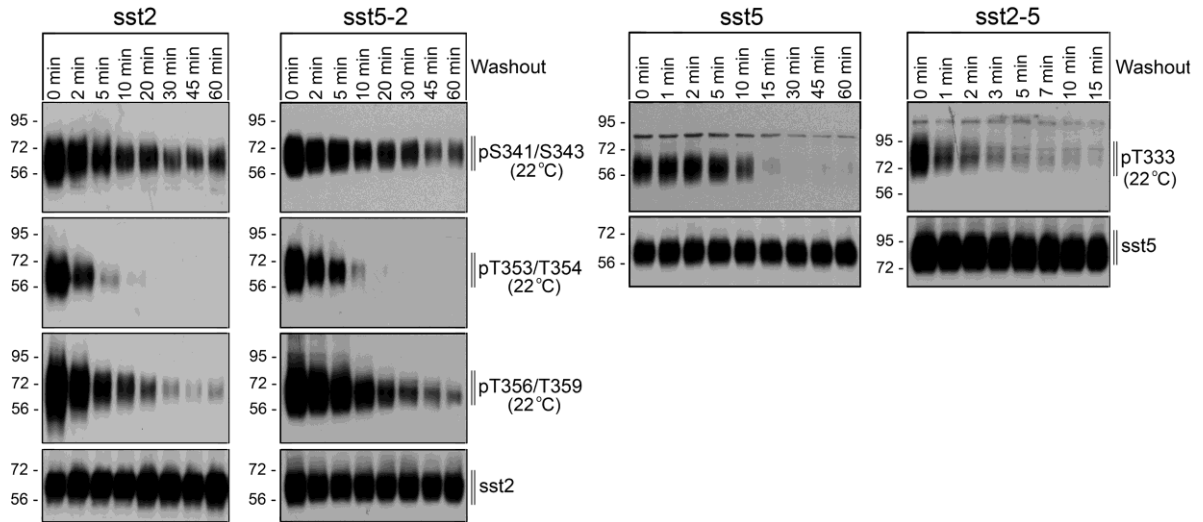
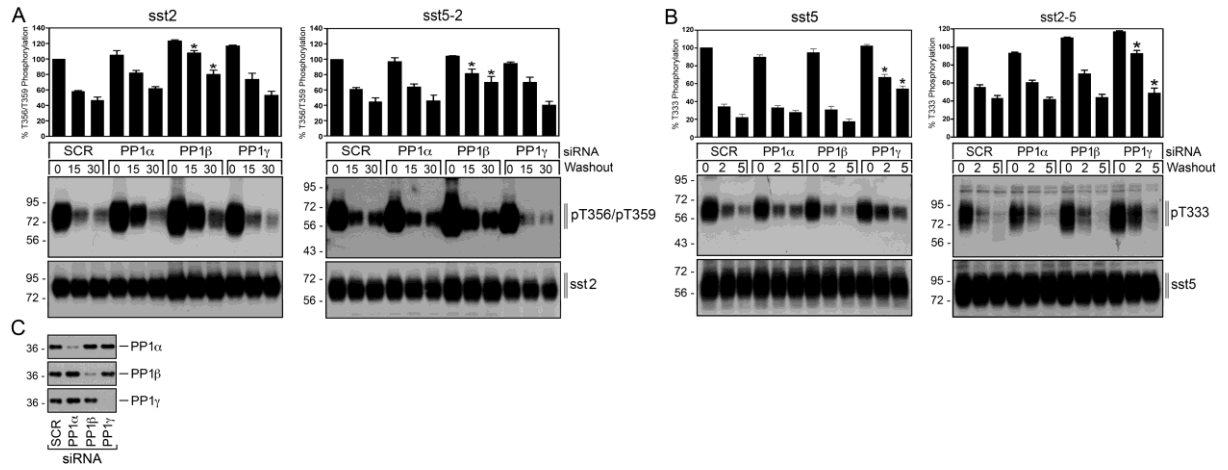


Figure 5





### 3.3 Manuskript III

## Differential Regulation of Somatostatin Receptor Dephosphorylation by $\beta$ -Arrestin1 and $\beta$ -Arrestin2

---

Andrea Kliewer and Stefan Schulz

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol *in revision*

### Autorenschaft

Erstautor

### Beitrag der Autoren

Der experimentelle Teil wurde von Stefan Schulz und Andrea Kliewer entworfen. Andrea Kliewer führte alle Experimente durch und analysierte die Daten. Andrea Kliewer und Stefan Schulz schrieben das Manuskript.

## Zusammenfassung

Die schnelle Dephosphorylierung von GPCRs wird über die PP1 $\beta$  vermittelt. Diese Publikation zeigt, dass für die Rezeptor-Dephosphorylierung an der Plasmamembran ein Komplex aus PP1 $\beta$  und  $\beta$ -Arrestin1 erforderlich ist. Diese neue Scaffoldfunktion von  $\beta$ -Arrestin1 ermöglicht eine effiziente Ausrichtung der PP1 $\beta$  am phosphorylierten GPCR. Eine schnelle Dephosphorylierung durch den  $\beta$ -Arrestin1/PP1 $\beta$ -Komplex ist essentiell für die Resensibilisierung des GPCRs und die Beendigung des  $\beta$ -Arrestin1 Signals.

---

**Differential Regulation of Somatostatin Receptor  
Dephosphorylation  
by  $\beta$ -Arrestin1 and  $\beta$ -Arrestin2**

*Andrea Kliewer and Stefan Schulz*

Department of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital - Friedrich Schiller University Jena, Drackendorfer Straße 1, D-07747 Jena, Germany

Running Title: A role for  $\beta$ -arrestin1 in GPCR dephosphorylation

Abbreviations used: HEK293, human embryonic kidney 293 cells; GRK, G protein-coupled receptor kinase; GPCR, G-protein coupled receptor; SS-14, somatostatin-14; sst, somatostatin receptor; PP1 $\beta$ , protein phosphatase 1 $\beta$ .

All correspondence should be addressed to: Stefan Schulz, Institute of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital - Friedrich Schiller University Jena, Drackendorfer Straße 1, D-07747 Jena, Germany, Phone: +49-3641-9325650, FAX: +49-3641-9325652, Email: [Stefan.Schulz@med.uni-jena.de](mailto:Stefan.Schulz@med.uni-jena.de).

---

## Abstract

**Purpose:** Signaling of G protein-coupled receptors (GPCRs) is tightly regulated by coordinated phosphorylation of intracellular serine and threonine residues. Although the mechanisms of agonist-induced phosphorylation have been deciphered for many GPCRs, the regulation of their dephosphorylation remains poorly understood.

**Methods:** Using a combination of siRNA knock down screening and phosphosite-specific antibodies, we have recently identified the catalytic subunit  $\beta$  of protein phosphatase 1 (PP1 $\beta$ ) as major constituent of the GPCR phosphatase responsible for dephosphorylation of the *sst*<sub>2</sub> somatostatin receptor. However, PP1 targeting subunits specifically required for GPCR dephosphorylation have not been identified so far.

**Results:** Here, we show that siRNA knock down of  $\beta$ -arrestin1 strongly inhibits *sst*<sub>2</sub> receptor dephosphorylation. Co-immunoprecipitation experiments demonstrate that  $\beta$ -arrestin1 and PP1 $\beta$  exist as constitutive complex that mediates rapid dephosphorylation of *sst*<sub>2</sub> receptors at or near the plasma membrane. By contrast,  $\beta$ -arrestin2 is not essential for rapid *sst*<sub>2</sub> receptor dephosphorylation.

**Conclusions:** Together, these findings reveal a novel scaffolding function of  $\beta$ -arrestin1 that facilitates efficient targeting of PP1 $\beta$  to phosphorylated GPCRs.

**Key words:** somatostatin, somatostatin receptor, G protein-coupled receptor, protein phosphatase 1 $\beta$ ,  $\beta$ -arrestin, internalization, phosphorylation, dephosphorylation.

---

## Introduction

Desensitization of GPCR signaling is essential for maintenance of cellular homeostasis. For many GPCRs agonist-dependent regulation involves the coordinated phosphorylation of a series of phosphate acceptor sites within the carboxyl-terminal tail of the receptor. This phosphorylation facilitates binding of  $\beta$ -arrestins, which in turn mediate desensitization of G protein-dependent signaling<sup>1</sup>. In addition,  $\beta$ -arrestins serve as scaffold to facilitate receptor internalization and to initiate a second wave of signaling<sup>2, 3, 4, 5</sup>. However, until now the mechanisms involved in the negative feedback regulation of unconventional  $\beta$ -arrestin-dependent signaling remain elusive.

We have recently used a combination of phosphosite-specific antibodies and siRNA screening to identify PP1 $\beta$  as bona fide GPCR phosphatase for the *sst*<sub>2</sub> somatostatin receptor<sup>6</sup>. Inhibition of PP1 $\beta$  expression resulted in increased agonist-driven receptor phosphorylation and facilitated detection of phosphorylated receptors at the plasma membrane indicating that PP1 $\beta$ -mediated dephosphorylation is initiated shortly after receptor activation. In addition, we discovered a novel mechanism for fine-tuning unconventional  $\beta$ -arrestin-dependent GPCR signaling. Indeed, inhibition of PP1 $\beta$  expression resulted in a specific enhancement of *sst*<sub>2</sub>-driven ERK activation. Given that arrestin-dependent signaling is initiated by binding to phosphorylated receptors, this finding suggests that PP1 $\beta$ -mediated GPCR dephosphorylation limits  $\beta$ -arrestin-dependent signaling by disrupting the  $\beta$ -arrestin-GPCR complex.

PP1 is often composed of a catalytic subunit bound to one or more regulatory subunits. To date, three distinct catalytic subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) and more than 80 distinct

---

regulatory PP1 subunits are known <sup>7</sup>. PP1 catalytic subunits bind to their regulatory subunits and some substrates in a mutually exclusive manner through a conserved RVxF motif <sup>8, 9</sup>. The three isoforms of the PP1 catalytic subunit share greater than 90% sequence identity, including the regions that interact with the RVxF sequence. However, the human *sst*<sub>2</sub> receptor does not contain a potential PP1-binding motif in its carboxyl-terminal tail suggesting that PP1 association may occur indirectly via one or more regulatory subunits. However, such PP1 targeting subunits that can bring the phosphatase in proximity to phosphorylated GPCRs have not been identified yet.

---

## Materials and Methods

**Reagents and antibodies.** Somatostatin (SS-14) was obtained from Bachem (Weil am Rhein, Germany). The phosphorylation-independent rabbit monoclonal anti- $sst_2$  antibody {UMB-1} was obtained from Epitomics (Burlingame, CA). The rabbit polyclonal phosphosite-specific  $sst_2$  antibody anti-pT356/pT359 {0522} was generated and extensively characterized previously<sup>10, 11</sup>. In addition, the following commercially available antibodies were used: rabbit monoclonal anti-PP1 $\beta$  antibody (2029-1; Epitomics), goat polyclonal anti-PP1 $\beta$  antibody (sc-6106; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), goat polyclonal anti-PP1 $\alpha$  antibody (sc-6104; Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-PP1 $\alpha$  antibody (sc-7482; Santa Cruz Biotechnology), rabbit monoclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody (1274-1; Epitomics), goat polyclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody (sc-9182; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (sc-13140; Santa Cruz Biotechnology), goat polyclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (sc-6387; Santa Cruz Biotechnology), and goat polyclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (31294; Epitomics).

**Cell culture and transfection.** Human embryonic kidney HEK293 cells were obtained from the German Resource Centre for Biological Material (DSMZ, Braunschweig, Germany). HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum in a humidified atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub>. Cells were transfected with plasmid encoding for wild-type human  $sst_2$  somatostatin receptor using Lipofectamine according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Stable transfectants were selected in the presence of 400  $\mu$ g/ml G418. HEK293 cells stably expressing somatostatin receptors were characterized using radioligand-binding assays, Western blot

---

analysis, and immunocytochemistry as described previously<sup>12, 13, 14</sup>. The level of somatostatin receptor expression was ~900 fmol/mg membrane protein.

**Immunocytochemistry.** Stably transfected HEK293 cells were grown on poly-L-lysine-coated coverslips overnight. After the appropriate treatment with 1  $\mu$ M SS-14 cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in phosphate buffer (pH 6.9) for 30 min at room temperature and washed several times. Cells were permeabilized and then incubated with anti-pT356/pT359 {0522} antibody followed by Alexa488-conjugated secondary antibodies (Amersham, Braunschweig, Germany). Specimens were mounted and examined using a Zeiss LSM510 META laser scanning confocal microscope<sup>15</sup>.

**Western blot analysis.** Stably transfected HEK293 cells were plated onto poly-L-lysine-coated 60-mm dishes and grown to 80% confluence. After the appropriate treatment with 1  $\mu$ M SS-14, cells were lysed in detergent buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM disodium pyrophosphate, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) in the presence of protease and phosphatase inhibitors Complete mini and PhosSTOP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and centrifuged at 16,000 x g for 30 min at 4 °C. All dephosphorylation assays were performed at room temperature (22 °C). When indicated cells were washed three times with 2 ml ice-cold phosphate-buffered saline (washout) to remove SS-14. Glycosylated proteins were partially enriched using wheat germ lectin-agarose beads as described<sup>16, 17, 18</sup>. Proteins were eluted from the beads using SDS-sample buffer for 20 min at 65 °C and then resolved on 8% SDS-polyacrylamide gels. After electroblotting, membranes were incubated with the phosphosite-specific antibody anti-pT356/pT359 {0522} at a concentration of 0.1  $\mu$ g/ml followed by detection using enhanced chemiluminescence detection system



---

(Amersham, Braunschweig, Germany). Blots were subsequently stripped and reprobed with anti- $\text{sst}_2$  {UMB-1} to confirm equal loading of the gels. Protein bands on Western blots were exposed to X-ray film. Films exposed in the linear range were then densitized using ImageJ 1.37v.

**Small Interfering RNA (siRNA) Silencing of Gene Expression.** Chemically synthesized double-stranded siRNA duplexes (with 3' dTdT overhangs) were purchased from Qiagen (Hilden, Germany) for following human mRNA targets: PP1 $\beta$  catalytic subunit (5'-TACGAGGATGTCGTCCAGGAA-3' and 5'-GTTTCGAGGCTTATGTATCA-3'),  $\beta$ -arrestin 1 (5'-AAAGCCTTCTGCGCGGAGAAT-3' and 5'-CTCGACGTTCTGCAAGGTCTA-3'),  $\beta$ -arrestin 2 (5'-AAGGACCGCAAAGTGTTTGTG-3' and 5'-CTCGAACAAAGATGACCAGGTA-3') and a nonsilencing RNA duplex (SCR) (5'-GCTTAGGAGCATTAGTAAA-3' and 5'-AAACTCTATCTGCACGCTGAC-3'). HEK293 cells were transfected with 100 nM of each siRNA for single or double transfection using HiPerFect (Qiagen) according to the instructions of the manufacturer for 3 days. Silencing was quantified by immunoblotting. All experiments showed protein levels reduced by  $\geq 80\%$ .

**Immunoprecipitation.** Cells were plated onto poly-L-lysine-coated 150-mm dishes and grown to 80% confluence. After the appropriate treatment with 1  $\mu\text{M}$  SS-14, cells were lysed in detergent buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM disodium pyrophosphate, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) in the presence of protease and phosphatase inhibitors Complete mini and PhosSTOP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and centrifuged at 16,000 x g for 30 min at 4 °C. The supernatant was then immunoprecipitated with the goat polyclonal anti-PP1 $\beta$  antibody (sc-6106), goat polyclonal anti-PP1 $\alpha$  antibody (sc-6104) or goat polyclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody

---

(sc-9182) bound to protein A-agarose beads for 2 h at 4 °C. Beads were washed five times with detergent puffer, and immunoprecipitates were eluted from the beads with SDS-sample buffer for 20 min at 40 °C. Equal amounts of protein of each sample were then loaded onto 8% SDS-polyacrylamide gels. After electroblotting, membranes were incubated with rabbit monoclonal anti-PP1 $\beta$  antibody (2029-1), rabbit monoclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody (1274-1) or mouse monoclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (sc-13140) for 12 h at 4 °C, followed by detection using enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Braunschweig, Germany). Blots were subsequently stripped and reprobed. Protein bands on Western blots were subsequently exposed to X-ray film.

**Data Analysis.** Data were analyzed using GraphPad Prism 4.0 software. Statistical analysis was carried out with two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. *p*-Values of <0.05 were considered statistically significant.

---

## Results

Inhibition of PP1 $\beta$  expression results in an enhancement of sst<sub>2</sub> receptor phosphorylation in the presence of agonist and a clearly delayed receptor dephosphorylation after agonist removal<sup>6</sup>. We hypothesized that siRNA knock down of relevant PP1 $\beta$  targeting subunits would result in a similar defect of sst<sub>2</sub> dephosphorylation. Given that PP1 $\beta$  initiates dephosphorylation directly after receptor activation at or near the plasma membrane, we first tested candidates known to interact with activated and phosphorylated GPCRs. As depicted in Figure 1, inhibition of  $\beta$ -arrestin1 expression resulted in enhanced receptor phosphorylation and delayed dephosphorylation in a manner similar to that observed after knock down of PP1 $\beta$ . Nevertheless, combined siRNA inhibition of PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 did not produce an effect exceeding that of either PP1 $\beta$  or  $\beta$ -arrestin1 knock down alone (Figure 1).

We have previously observed that inhibition of PP1 $\beta$  expression also results in increased detection of phosphorylated receptors at the plasma membrane<sup>6</sup>. We therefore evaluated the effect of  $\beta$ -arrestin1 siRNA knock down on the subcellular distribution of phosphorylated sst<sub>2</sub> receptors in SS-14-treated cells. In fact, inhibition of  $\beta$ -arrestin1 expression facilitated detection of phosphorylated sst<sub>2</sub> receptors at the plasma membrane already 5 min after agonist exposure (Figure 2). This enhanced ability to detect phosphorylated sst<sub>2</sub> receptors at the plasma membrane persisted throughout the 15 min treatment period. Again, siRNA inhibition of PP1 $\beta$  mimicked the effect of  $\beta$ -arrestin1 knock down (Figure 2). In contrast,  $\beta$ -arrestin2 knock down did not result in an enhanced detection of phosphorylated sst<sub>2</sub> receptor at the plasma membrane. siRNA knock down of PP1 $\beta$ ,  $\beta$ -arrestin1 or  $\beta$ -arrestin2 did not

---

dramatically change the rate of  $sst_2$  receptor internalization (Suppl. Figure 1). These results strongly suggest that both PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 are required for rapid  $sst_2$  receptor dephosphorylation at or near the plasma membrane and that this process is initiated immediately after receptor activation.

If  $\beta$ -arrestin1 would function as targeting subunit for PP1 $\beta$ , both proteins would be expected to interact in  $sst_2$ -expressing HEK293 cells. We therefore used co-immunoprecipitation assays to demonstrate an interaction between endogenously expressed PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1. First, we immunoprecipitated PP1 $\beta$  using a goat polyclonal antibody, which allowed for unequivocal detection of PP1 $\beta$  in immunoblots with a rabbit monoclonal antibody (Figure 3A and Suppl. Figure 2). Interestingly,  $\beta$ -arrestin1 was detectable with a rabbit monoclonal antibody in PP1 $\beta$  immunoprecipitates from SS14-treated as well as from untreated cells (Figure 3A). Surprisingly,  $\beta$ -arrestin2 was also specifically detected in PP1 $\beta$  immunoprecipitates with a mouse monoclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (Figure 3A). Conversely, immunoprecipitation of  $\beta$ -arrestin1 facilitated detection of both PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin2 in immunoblots (Figure 3B). By contrast, when PP1 $\alpha$  was immunoprecipitated with a goat polyclonal antibody,  $\beta$ -arrestin1 was not detectable under otherwise identical conditions suggesting that the  $\beta$ -arrestin1-PP1 $\beta$  interaction is selective (Figure 3C).

The presence of  $\beta$ -arrestin2 in PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 immunoprecipitates suggests that these three proteins exist as constitutive complexes. If  $\beta$ -arrestin2 would directly interact with PP1 $\beta$ , inhibition of  $\beta$ -arrestin2 expression would be expected to result in a similar defect of  $sst_2$  dephosphorylation as that observed after siRNA knock down of  $\beta$ -arrestin1 or PP1 $\beta$ . As depicted in Figure 4, inhibition of  $\beta$ -arrestin2 expression did neither enhance receptor phosphorylation in the presence of

---

agonist nor delay receptor dephosphorylation after agonist removal. These findings suggest that  $\beta$ -arrestin2 is not essential for rapid  $\text{sst}_2$  receptor dephosphorylation.

---

## Discussion

The signaling output of GPCRs is desensitized by mechanisms involving phosphorylation,  $\beta$ -arrestin binding and internalization. GPCR signaling is resensitized by mechanisms involving dephosphorylation and recycling, but details about the phosphatases responsible are generally lacking. This lack of information has led to the prevailing view that GPCR dephosphorylation is an unspecific and unregulated process. Progress has been hampered by the mandatory use of radioactive dephosphorylation assays and the limited availability of selective chemical phosphatase inhibitors. We and others have recently succeeded in identifying bona fide GPCR phosphatases for a number of receptors using a combined approach of phosphosite-specific antibodies and siRNA screening in HEK293 cells<sup>6, 19, 20, 21, 22</sup>. First, we identified protein phosphatase 1 $\beta$  (PP1 $\beta$ ) as GPCR phosphatase for the sst<sub>2</sub> somatostatin receptor<sup>6</sup>. Second, we identified PP1 $\gamma$  as GPCR phosphatase for the  $\mu$ -opioid receptor and the sst<sub>5</sub> somatostatin receptor<sup>22</sup>. Third, more recently Gehret and Hinkle identified PP1 $\alpha$  as GPCR phosphatase for the thyrotropin-releasing hormone receptor. All of the above observations were made in a similar cellular background. This suggests that a given GPCR may recruit its specific PP1 isoform for rapid dephosphorylation with remarkable selectivity. However, it is not known which targeting subunits direct the engagement of catalytic PP1 subunits to the phosphorylated GPCRs.

The major finding of this study is that  $\beta$ -arrestin1 and PP1 $\beta$  exist as a constitutive complex that mediates rapid dephosphorylation of sst<sub>2</sub> receptors at or near the plasma membrane. This suggests a novel scaffolding function of  $\beta$ -arrestin1 that facilitates efficient targeting of PP1 $\beta$  to phosphorylated receptors thereby

---

regulating the rate of GPCR resensitization. In addition to its role in receptor resensitization, PP1 $\beta$  is likely to have a function in fine-tuning of unconventional  $\beta$ -arrestin-dependent GPCR signaling. Indeed, we have recently observed that inhibition of PP1 $\beta$  expression resulted in a robust increase in  $\beta$ -arrestin-dependent ERK activation that was specifically mediated via the agonist-activated sst<sub>2</sub> receptor<sup>6</sup>. This effect was selective and not seen after exposure to EGF or after inhibition of PP1 $\alpha$  or PP1 $\gamma$  expression under identical conditions. This suggests that receptor dephosphorylation by PP1 $\beta$  leads to disruption of the GPCR- $\beta$ -arrestin complex and, hence, facilitates termination of  $\beta$ -arrestin-dependent signaling.

More recent work using the conformation-specific nanobody Nb80 detected two temporally and spatially separated waves of  $\beta$ 2AR signaling through Gs<sup>23</sup>. Nb80 was recruited to the active receptor at the cell membrane as well as at the membrane of intracellular vesicles but not to clathrin-coated pits where  $\beta$ 2AR is bound to  $\beta$ -arrestin. Thus, the present findings suggest a simple model in that rapid PP1-mediated dephosphorylation would allow the initiation of a second wave of endosomal G protein signaling by facilitating the release of  $\beta$ -arrestin from phosphorylated GPCRs.

In conclusion, we identify  $\beta$ -arrestin1 as first PP1 targeting subunit required for rapid PP1 $\beta$ -mediated GPCR dephosphorylation. GPCR dephosphorylation by the  $\beta$ -arrestin1-PP1 $\beta$  complex is a highly regulated process that is initiated immediately after receptor activation/phosphorylation. We propose that rapid GPCR dephosphorylation by PP1 is a crucial step in a variety of distinct interdependent cellular functions including (I) receptor resensitization, (II) termination of  $\beta$ -arrestin signaling and (III) initiation of endosomal G protein signaling.

## **Acknowledgements**

We thank Heidrun Guder and Heike Stadler for excellent technical assistance. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant SCHU924/10-3 and the Deutsche Krebshilfe grant 109952.



---

## References

1. Krupnick, J. G.; Benovic, J. L., The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998, 38, 289-319.
2. DeFea, K. A., Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cell Signal* 2011, 23, (4), 621-9.
3. Lefkowitz, R. J.; Shenoy, S. K., Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 2005, 308, (5721), 512-7.
4. DeWire, S. M.; Ahn, S.; Lefkowitz, R. J.; Shenoy, S. K., Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 2007, 69, 483-510.
5. Luttrell, L. M.; Gesty-Palmer, D., Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* 2010, 62, (2), 305-30.
6. Poll, F.; Doll, C.; Schulz, S., Rapid dephosphorylation of G protein-coupled receptors by protein phosphatase 1beta is required for termination of beta-arrestin-dependent signaling. *J Biol Chem* 2011, 286, (38), 32931-6.
7. Virshup, D. M.; Shenolikar, S., From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 2009, 33, (5), 537-45.
8. Roy, J.; Cyert, M. S., Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal* 2009, 2, (100), re9.
9. Cohen, P. T., Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 2002, 115, (Pt 2), 241-56.

- 
10. Poll, F.; Lehmann, D.; Illing, S.; Ginja, M.; Jacobs, S.; Lupp, A.; Stumm, R.; Schulz, S., Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of sst2A somatostatin receptor phosphorylation. *Mol Endocrinol* 2010, 24, (2), 436-46.
  11. Fischer, T.; Doll, C.; Jacobs, S.; Kolodziej, A.; Stumm, R.; Schulz, S., Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93, (11), 4519-24.
  12. Tulipano, G.; Stumm, R.; Pfeiffer, M.; Kreienkamp, H. J.; Holtt, V.; Schulz, S., Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem* 2004, 279, (20), 21374-82.
  13. Pfeiffer, M.; Koch, T.; Schroder, H.; Klutzny, M.; Kirscht, S.; Kreienkamp, H. J.; Holtt, V.; Schulz, S., Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* 2001, 276, (17), 14027-36.
  14. Pfeiffer, M.; Koch, T.; Schroder, H.; Laugsch, M.; Holtt, V.; Schulz, S., Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 2002, 277, (22), 19762-72.
  15. Lesche, S.; Lehmann, D.; Nagel, F.; Schmid, H. A.; Schulz, S., Differential effects of octreotide and pasireotide on somatostatin receptor internalization and trafficking in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94, (2), 654-61.
  16. Mundschenk, J.; Unger, N.; Schulz, S.; Holtt, V.; Schulz, S.; Steinke, R.; Lehnert, H., Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88, (11), 5150-7.

- 
17. Plockinger, U.; Albrecht, S.; Mawrin, C.; Saeger, W.; Buchfelder, M.; Petersenn, S.; Schulz, S., Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93, (4), 1203-10.
  18. Schulz, S.; Pauli, S. U.; Schulz, S.; Handel, M.; Dietzmann, K.; Firsching, R.; Hollt, V., Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of somatostatin receptor subtype sst2A. *Clin Cancer Res* 2000, 6, (5), 1865-74.
  19. Petrich, A.; Mann, A.; Kliewer, A.; Nagel, F.; Strigli, A.; Martens, J. C.; Poll, F.; Schulz, S., Phosphorylation of threonine 333 regulates trafficking of the human sst5 somatostatin receptor. *Mol Endocrinol* 2013, 27, (4), 671-82.
  20. Ghosh, M.; Schonbrunn, A., Differential temporal and spatial regulation of somatostatin receptor phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 2011.
  21. Gehret, A. U.; Hinkle, P. M., siRNA screen identifies the phosphatase acting on the G protein-coupled thyrotropin-releasing hormone receptor. *ACS Chem Biol* 2013, 8, (3), 588-98.
  22. Doll, C.; Poll, F.; Peuker, K.; Loktev, A.; Gluck, L.; Schulz, S., Deciphering micro-opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* 2012, 167, (6), 1259-70.
  23. Irannejad, R.; Tomshine, J. C.; Tomshine, J. R.; Chevalier, M.; Mahoney, J. P.; Steyaert, J.; Rasmussen, S. G.; Sunahara, R. K.; El-Samad, H.; Huang, B.; von Zastrow, M., Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 2013, 495, (7442), 534-8.

---

## Figure Legends

**Figure 1:  $\beta$ -arrestin1 is required for rapid  $ss2$  receptor dephosphorylation.** (*Top*) HEK293 cells stably expressing  $ss2$  receptor were transfected with 100 nM siRNA targeted to PP1 $\beta$ ,  $\beta$ -arrestin1 or a nonsilencing RNA (SCR) for 72 h and then exposed to 1  $\mu$ M SS-14 for 5 min. Cells were washed three times with ice-cold PBS, and then incubated in the absence of agonist for 0, 15 or 30 min in culture medium (washout) at room temperature (22 °C). Cells were lysed and immunoblotted with anti-pT356/pT359 antibody (*upper panel*). Blots were stripped and reprobbed with the phosphorylation-independent anti- $ss2$  receptor antibody UMB-1 (*lower panel*) to confirm equal loading of the gels. pT356/pT359 phosphorylation was quantified and expressed as percentage of maximal phosphorylation in SCR-transfected cells, which was set at 100%. Phosphorylation levels were normalized to total receptor loading in each lane. Data correspond to the mean  $\pm$  SEM from six independent experiments. Data was analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test (\*,  $p < 0.05$ ) compared to the corresponding time point in SCR transfected cells. Note that PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 knockdown resulted in enhanced receptor phosphorylation and delayed receptor dephosphorylation. (*Bottom*) siRNA knockdown of PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 was confirmed by Western blot. The positions of molecular mass markers are indicated on the *left* (in kDa).

**Figure 2: PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 are required for  $ss2$  dephosphorylation at the plasma membrane.** HEK293 cells stably expressing  $ss2$  receptor were transfected with nonsilencing RNA (SCR, *first panel*), PP1 $\beta$  (*second panel*),  $\beta$ -arrestin1 (*third panel*) or  $\beta$ -arrestin2 (*fourth panel*) for 72 h and then exposed to 1  $\mu$ M

---

SS-14 for 0, 5 or 15 min. Cells were fixed, immunofluorescently stained with anti-pT356/pT359 antibody, and examined by confocal microscopy. Shown are representative images from one of three independent experiments performed in duplicate. *Scale bar*, 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3: PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin1 exist as constitutive complex.** (A) HEK293 cells stably expressing  $\text{sst}_2$  receptors were either not exposed (-) or exposed (+) to 1  $\mu\text{M}$  SS-14 for 5 min. Cells were lysed and PP1 $\beta$  was immunoprecipitated (*IP*) with the goat polyclonal anti-PP1 $\beta$  antibody and then immunoblotted (*IB*) with rabbit monoclonal anti-PP1 $\beta$  antibody (*upper panel*), rabbit monoclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody (*middle panel*), or mouse monoclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (*lower panel*). Note that both  $\beta$ -arrestin1 and  $\beta$ -arrestin2 were present in PP1 $\beta$  immunoprecipitates. Arrowhead indicates non-specific band that is also detected in samples without lysate. Presence of equal amounts of PP1 $\beta$  in lysates (*input*) was confirmed by immunoblot (*bottom panel*). Three additional experiments gave similar results. (B) HEK293 cells stably expressing  $\text{sst}_2$  receptors were either not exposed (-) or exposed (+) to 1  $\mu\text{M}$  SS-14 for 5 min. Cells were lysed and  $\beta$ -arrestin1 was immunoprecipitated (*IP*) with the goat polyclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody and then immunoblotted (*IB*) with rabbit monoclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody (*upper panel*), rabbit monoclonal anti-PP1 $\beta$  antibody (*middle panel*), or mouse monoclonal anti- $\beta$ -arrestin2 antibody (*lower panel*). Note that both PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin2 were present in  $\beta$ -arrestin1 immunoprecipitates. Presence of equal amounts of PP1 $\beta$  in lysates (*input*) was confirmed by immunoblot (*bottom panel*). Two additional experiments gave similar results. (C) HEK293 cells stably expressing  $\text{sst}_2$  receptors were either not exposed (-) or exposed (+) to 1  $\mu\text{M}$  SS-14 for 5 min. Cells were lysed and PP1 $\alpha$

---

was immunoprecipitated (*IP*) with the goat polyclonal anti-PP1 $\alpha$  antibody and then immunoblotted (*IB*) mouse monoclonal anti-PP1 $\alpha$  antibody (*upper panel*) or with rabbit monoclonal anti- $\beta$ -arrestin1 antibody (*lower panel*). Note that  $\beta$ -arrestin1 was not detected in PP1 $\alpha$  immunoprecipitates. Presence of equal amounts of PP1 $\alpha$  in lysates (*input*) was confirmed by immunoblot (*bottom panel*). Representative results from three independent experiments are shown. The positions of molecular mass markers are indicated on the *left* (in kDa).

**Figure 4:  $\beta$ -arrestin2 is not essential for *sst*<sub>2</sub> receptor dephosphorylation.**

(*Top*) HEK293 cells stably expressing *sst*<sub>2</sub> receptor were transfected with 100 nM siRNA targeted to PP1 $\beta$ ,  $\beta$ -arrestin2 or a nonsilencing RNA (SCR) for 72 h and then exposed to 1  $\mu$ M SS-14 for 5 min. Cells were washed three times with ice-cold PBS, and then incubated in the absence of agonist for 0, 15 or 30 min in culture medium (washout) at room temperature (22 °C). Cells were lysed and immunoblotted with anti-pT356/pT359 antibody (*upper panel*). Blots were stripped and reprobed with the phosphorylation-independent anti-*sst*<sub>2</sub> receptor antibody UMB-1 (*lower panel*) to confirm equal loading of the gels. pT356/pT359 phosphorylation was quantified and expressed as percentage of maximal phosphorylation in SCR-transfected cells, which was set at 100%. Phosphorylation levels were normalized to total receptor loading in each lane. Data correspond to the mean  $\pm$  SEM from six independent experiments. Data was analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test (\*,  $p < 0.05$ ) compared to the corresponding time point in SCR transfected cells. Note that PP1 $\beta$  but not  $\beta$ -arrestin2 knockdown resulted in enhanced receptor phosphorylation and delayed receptor dephosphorylation. (*Bottom*) siRNA

---

knockdown of PP1 $\beta$  and  $\beta$ -arrestin2 was confirmed by Western blot. The positions of molecular mass markers are indicated on the *left* (in kDa).

**Figure 1**

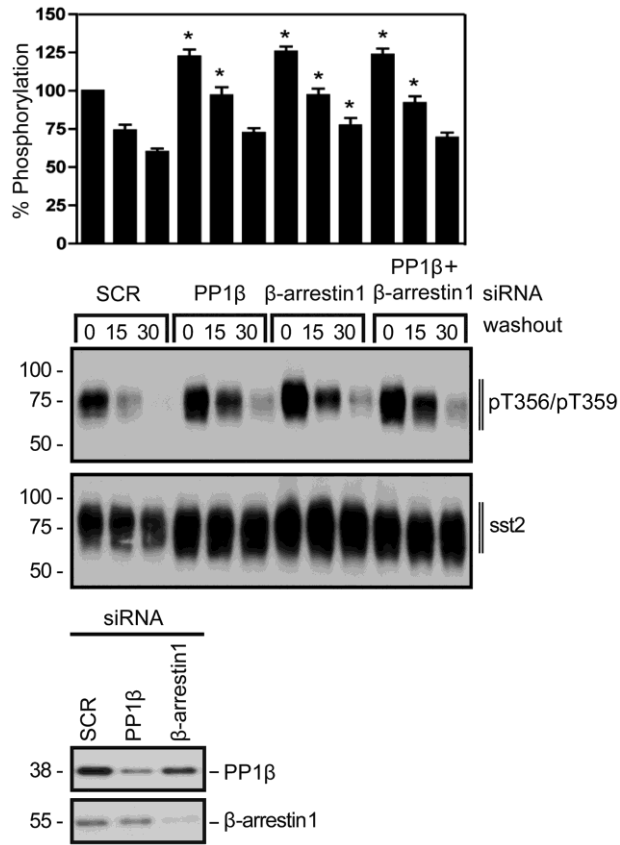
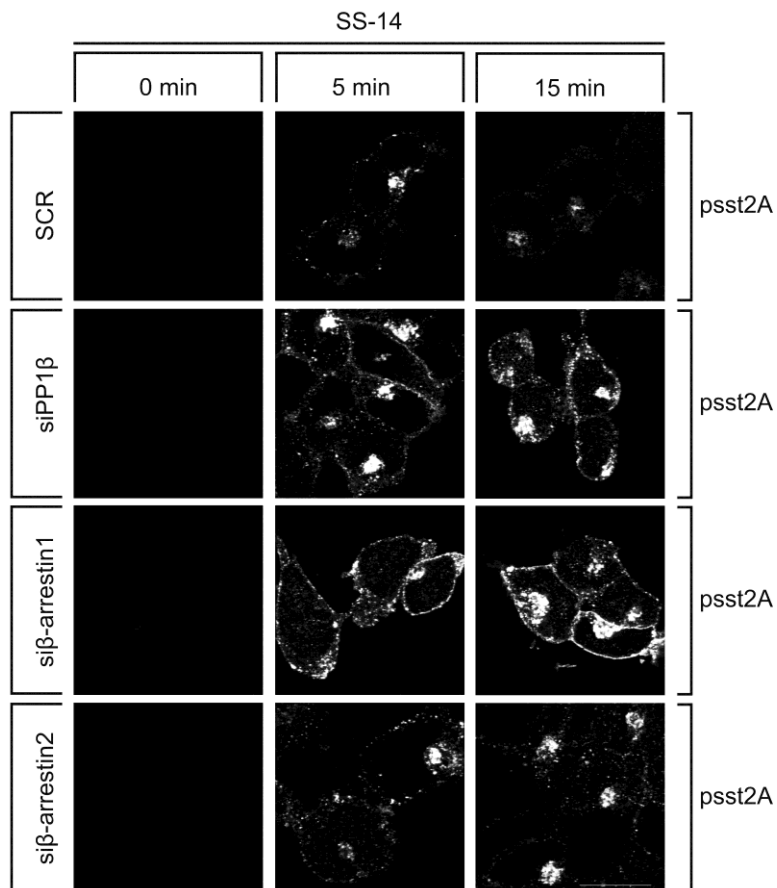
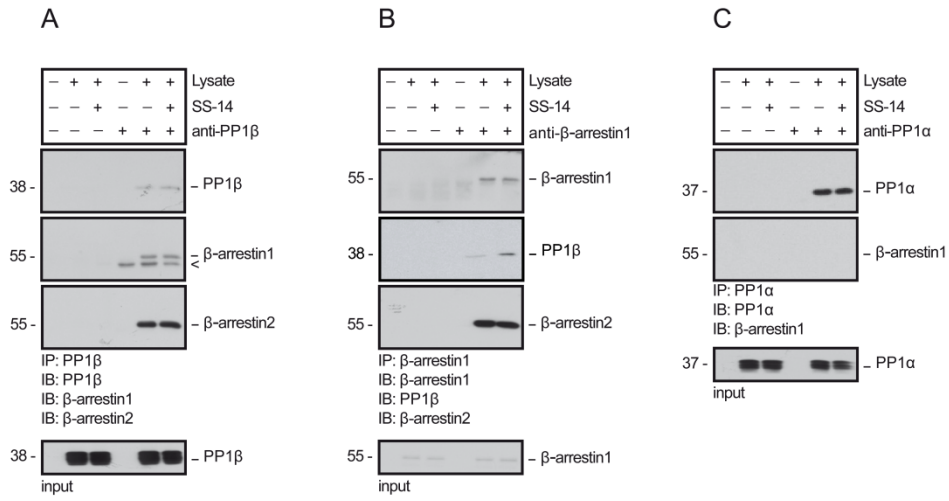




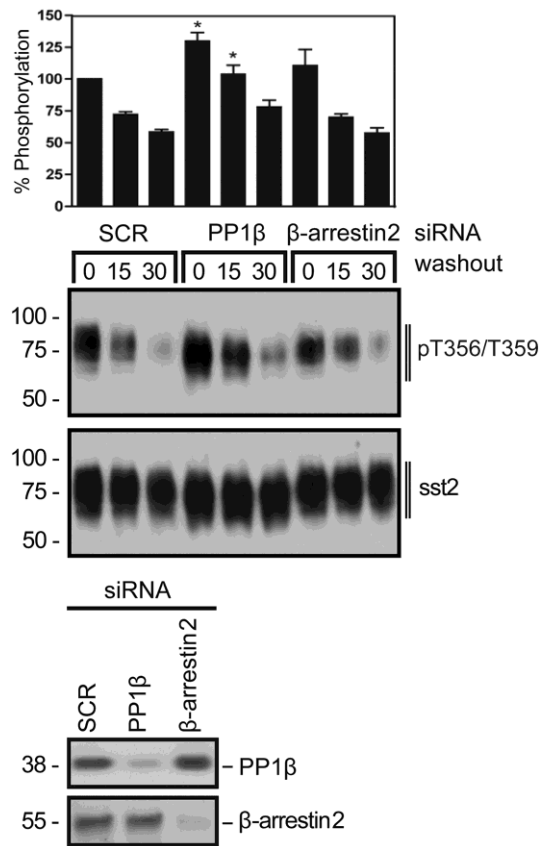
Figure 2



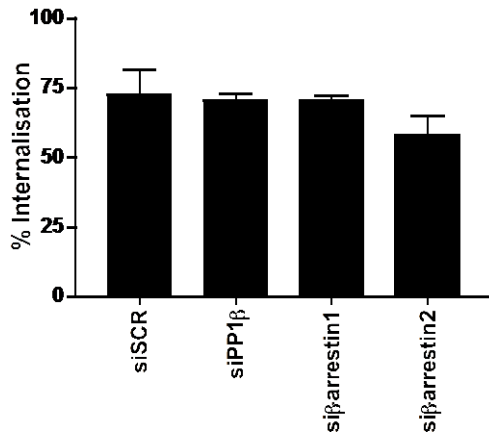
**Figure 3**



**Figure 4**

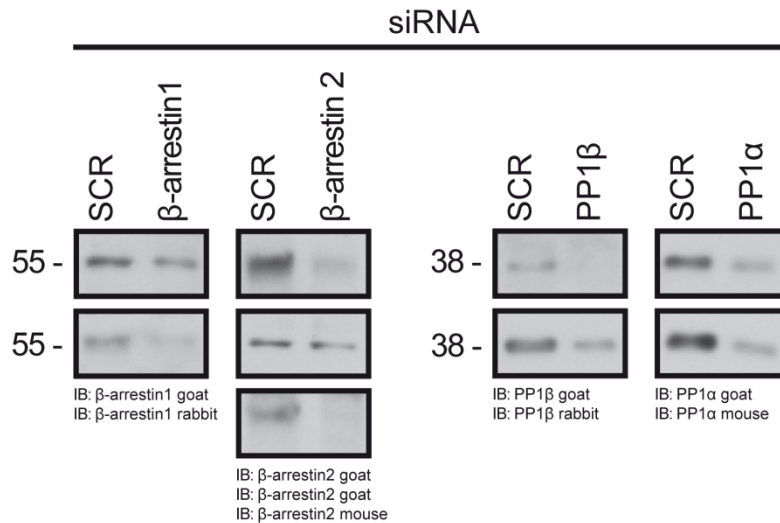


## Supplemental Figure 1



**Supplemental Figure 1: Rate of  $ss\tau_2$  receptor internalization.** HEK293 cells stably expressing the HA-tagged  $ss\tau_2$  receptor were seeded onto poly-L-lysine-treated 24-well plates. The next day, cells were transfected with 100 nM siRNA targeted to PP1 $\beta$ , PP1 $\alpha$ ,  $\beta$ -arrestin1,  $\beta$ -arrestin2 or a nonsilencing RNA (SCR) for 72 h. In the next step, cells were preincubated with 1  $\mu$ g/ml anti-HA antibody for 2 h at 4  $^{\circ}$ C. After the appropriate treatment with SS-14 at 37  $^{\circ}$ C, cells were fixed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody for 2 h at room temperature. After washing, the plates were developed with ABTS solution and analyzed at 405 nm using a microplate reader. Receptor sequestration, quantified as the percent loss of cell-surface receptors in agonist-treated cells. Data are presented as mean  $\pm$  SEM from four independent experiments performed in quadruplicate.

## Supplemental Figure 2



**Supplemental Figure 2: Antibody specificity.** HEK293 cells stably expressing  $sst_2$  receptor were transfected with 100 nM siRNA targeted to PP1β, PP1α, β-arrestin1, β-arrestin2 or a nonsilencing RNA (SCR) for 72 h. Cells were lysed and immunoblotted (*IB*) with goat polyclonal anti-β-arrestin1 antibody (sc-9182; Santa Cruz Biotechnology) and rabbit polyclonal anti-β-arrestin1 antibody (1274-1; Epitomics) (*first panel*), goat polyclonal anti-β-arrestin2 (sc-6387; Santa Cruz Biotechnology and 31294; Epitomics) and mouse polyclonal anti-β-arrestin2 (sc-13140; Santa Cruz Biotechnology) (*second panel*), goat polyclonal anti-PP1β antibody (sc-6106; Santa Cruz Biotechnology) and rabbit monoclonal anti-PP1β antibody (2029-1; Epitomics) (*third panel*) or goat polyclonal anti-PP1α antibody (sc-6104; Santa Cruz Biotechnology) and mouse polyclonal anti-PP1α antibody (sc-7482; Santa Cruz Biotechnology) (*fourth panel*). The position of molecular mass markers are indicated on the *left* (in kDa).

---

## 4 Diskussion

Die Familie der GPCRs stellt die größte Gruppe der Signalproteine dar und zählt zu den wichtigsten Zielstrukturen in der heutigen Arzneimittelwelt. Die Entwicklung neuer Medikamente gegen GPCRs ist getrieben von der Suche nach Verbindungen, welche nanomolare und subnanomolare Bindungsaffinitäten aufweisen. Immer mehr deutet darauf hin, dass für viele GPCRs mehrere aktive Konformationen existieren und somit selektiv spezifische Signalwege aktiviert werden können. Die Desensibilisierung des GPCR-Signals ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Viele GPCRs werden agonist-abhängig über die Phosphorylierung von einer Reihe von Phospho-Akzeptorstellen im C-Terminus des Rezeptors koordiniert. Diese Phosphorylierungen erleichtern die Bindung von  $\beta$ -Arrestin und führen zur Desensibilisierung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion (Krupnick and Benovic, 1998).  $\beta$ -Arrestin dient darüber hinaus als *Scaffold*- und Adapterprotein und ist somit in der Lage die Rezeptor-Internalisierung zu erleichtern und eine zweite Welle der Signaltransduktion auszulösen (DeFea, 2011; DeWire et al., 2007; Lefkowitz and Shenoy, 2005; Luttrell and Gesty-Palmer, 2010).

### 4.1 Agonist-selektive

### Somatostatin-Rezeptor-Phosphorylierung

#### 4.1.1 Agonist-selektive Phosphorylierung durch verschiedene Somatostatin-Analoga

Die Synthese neuer Pan-Somatostatin-Analoga war bisher darauf gerichtet, Substanzen zu entwickeln, die möglichst hohe Affinitäten zu möglichst vielen Somatostatin-Rezeptoren haben. Die klinische Entwicklung von Pasireotid war von der Idee getrieben, eine Nachfolgesubstanz für Octreotid zu liefern, die Octreotid-ähnliche Wirkungen am  $ss_{t_2}$ -Rezeptor hat und zusätzliche Aktivitäten an anderen

---

Somatostatin-Rezeptoren besitzt. Das sollte die Möglichkeit eröffnen, Pasireotid bei allen Octreotidindikationen und in Situationen zu verwenden, in denen Octreotid nicht oder nur eingeschränkt einsetzbar ist, wie beim Cushing-Syndrom und der Octreotidresistenz (Boscaro et al., 2009; Colao et al., 2012; Feelders and Hofland, 2013).

Durch die Erzeugung phospho-spezifischer  $sst_2$ -Antikörper konnte u.a. durch die vorliegende Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Pasireotid den  $sst_2$ -Rezeptor in eine andere aktive Konformation als Octreotid oder Somatostatin zwingt (Nagel et al., 2011; Manuskript I). Der Pasireotid-aktivierte  $sst_2$ -Rezeptor wird in einer Konformation gehalten, die ein schlechtes Substrat für die Phosphorylierung durch GRK 2 oder GRK 3 darstellt, so dass der Rezeptor nicht oder nur teilweise phosphoryliert werden kann (Nagel et al., 2011; Poll et al., 2010). Da GRKs selektiv die aktive Rezeptorkonformation erkennen, kann man die GRK-vermittelte Phosphorylierung eines Rezeptors als ein direktes Maß für die Rezeptoraktivierung ansehen. Der Vergleich von Affinität und Rezeptor-Phosphorylierung zeigt, dass Octreotid sowie Somatoprim in der Lage sind eine robuste Phosphorylierung, vergleichbar mit Somatostatin, am  $sst_2$ -Rezeptor auszulösen. Pasireotid hingegen bewirkt trotz hoher Affinität nur eine limitierte Aktivierung und Phosphorylierung. Im Vergleich zu Octreotid und Somatoprim scheint Pasireotid nach diesen Ergebnissen ein Partialagonist am  $sst_2$ -Rezeptor zu sein.

Rezeptoraktivierung direkt messen zu können, ist ein grundlegendes pharmakologisches Problem. Es ist nicht ausreichend, die Bestimmung der Affinität von neuen Substanzen als alleiniges Kriterium für deren weitere Entwicklung heranzuziehen. Die Entwicklung phospho-spezifischer Antikörper für GPCRs stellt jedoch eine enorme Herausforderung dar. Wir haben deshalb eine  $sst_{5-2}$ -Rezeptorchimäre hergestellt, eine sogenannte *Tail-Swap*-Mutante, bei welcher der C-Terminus des  $sst_5$ -Rezeptors durch den C-Terminus des  $sst_2$ -Rezeptors ersetzt wurde. Dadurch werden die Bindungseigenschaften des  $sst_5$ -Rezeptors nicht verändert. Dieses Vorgehen erlaubt die Verwendung der phospho- $sst_2$  Antikörper zur Messung der  $sst_5$ -Aktivierung. Mit Hilfe der  $sst_{5-2}$ -Rezeptorchimäre war es erstmals möglich die Rezeptoraktivierung des  $sst_5$  zu charakterisieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich Pasireotid am  $sst_{5-2}$ -Rezeptor wie Octreotid am  $sst_2$ -Rezeptor verhält, was mit einer hohen  $sst_5$ -Aktivität korreliert. Octreotid und Somatoprim entfalten ähnliche Wirkungen am  $sst_5$ -Rezeptor. Diese Ergebnisse wurden mit einem

---

neu erzeugten phospho- $ss_t_5$  Antikörper validiert. Sie zeigen, dass neben Somatostatin auch Pasireotid in der Lage ist den Rezeptor zu phosphorylieren. Die Untersuchungen der G-Protein-Kopplung über die  $GTP\gamma S$ -Bindungsstudien zeigten, dass anders als im Phosphorylierungsassay Pasireotid die  $GTP\gamma S$ -Bindung ähnlich stark stimuliert wie Octreotid oder Somatoprim. Das deutet darauf hin, dass Pasireotid ein *G protein-biased ligand* ist. Im Gegensatz dazu, zeigte Octreotid eine geringere  $GTP\gamma S$ -Bindung in  $ss_t_5$ - und  $ss_t_{5-2}$ -Rezeptor exprimierenden Zellen als Pasireotid und Somatoprim. Octreotid ist somit ein schwacher Partialagonist am  $ss_t_5$ - und  $ss_t_{5-2}$ -Rezeptor.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der  $ss_t_2$ -C-Terminus zur Messung der Aktivierung anderer GPCRs eingesetzt werden kann. Wir haben anschließend dieses Modell verwendet, um die Rezeptor-Aktivierung der  $ss_t_{3-2}$ -Rezeptorchimäre zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass Pasireotid im Gegensatz zu Octreotid in der Lage ist, eine robuste Phosphorylierung an den S341/S343 und den T356/T359 am hervorzurufen. Im Gegensatz dazu konnte Somatoprim eine leichte Phosphorylierung am  $ss_t_{3-2}$ -Rezeptor induzieren. Pasireotid bewirkt eine geringere Internalisierung des  $ss_t_2$ -Rezeptors als Octreotid. Am  $ss_t_3$ -Rezeptor induziert Pasireotid jedoch eine stärkere Internalisierung als Octreotid. Diese Ergebnisse der Rezeptor-Aktivierung der  $ss_t_{3-2}$ -Rezeptorchimäre korrelieren ebenfalls sehr gut mit den Internalisierungsdaten des Wildtyp- $ss_t_3$ -Rezeptors.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der  $ss_t_2$ -C-Terminus als Sonde zur Messung der Aktivierung anderer GPCRs eingesetzt werden kann. Dieses Modell kann nicht nur verwendet werden, um die Fähigkeit ausgewählter Somatostatin-Analoga zur Aktivierung anderer Somatostatin-Rezeptoren zu bestimmen, sondern ist genauso gut auch auf andere GPCRs und Liganden anwendbar.

#### 4.1.2 Physiologische Relevanz

Im Hinblick auf die klinische Relevanz könnte unserem Assay ein quantitatives ELISA-Verfahren angepasst werden, wodurch ein *Screening* mit einer großen Anzahl von Liganden möglich ist (Ghosh and Schonbrunn, 2011). Natürlich ist hierbei nicht auszuschließen, dass der Austausch der C-Termini die Rezeptorfunktion beeinflusst.



---

Somit ist es in jedem Fall nötig eine funktionelle Analyse solcher chimärer Rezeptoren durchzuführen. Im Weiteren ergaben unsere Studien wertvolle und bisher unbeachtete Informationen über Somatostatin-Analoga die sich zur Zeit in der klinischen und präklinischen Prüfung befinden. Pasireotid zeigte eine hohe agonistische Aktivität am  $sst_5$ -Rezeptor, aber nur schwache partialagonistische Eigenschaften am  $sst_2$ -Rezeptor. Octreotid hingegen ist ein voller Agonist am  $sst_2$ -Rezeptor zeigt aber praktisch keine agonistische Aktivität am  $sst_5$ -Rezeptor. Folglich sollte Pasireotid als bevorzugender  $sst_5$ - und Octreotid als bevorzugter  $sst_2$ -Ligand klassifiziert werden. Im Gegensatz dazu ist Somatoprim ein potenter Agonist am  $sst_2$ - und  $sst_5$ -Rezeptoren. Daraus ergibt sich womöglich ein neuer klinischer Einsatz von Somatoprim, welches die GH-Freisetzung in Patienten, die nicht auf Octreotid ansprechen, hemmen könnte (Plockinger et al., 2012).

In diesem Zusammenhang erscheint Pasireotid einzigartig. Die funktionelle Selektivität von Pasireotid am  $sst_2$ -Rezeptor ist vergleichbar mit der von Morphin, welches den  $\mu$ -Opioid-Rezeptor aktiviert ohne das er internalisiert wird. Am  $\mu$ -Opioid-Rezeptor wird die agonist-selektive Phosphorylierung über verschiedene GRKs vermittelt (Just et al. 2013; Doll et al., 2012; Doll et al., 2011). Die Morphin-vermittelte Phosphorylierung wird hier vorzugsweise durch GRK 5 und bei hoch potenten Agonisten bevorzugt durch GRK 2 und GRK 3 katalysiert (Doll 2012). Solche agonisten-selektive Phosphorylierungen über verschiedene GRKs konnten jedoch nicht für den  $sst_2$ -Rezeptor gezeigt werden (Poll et al., 2010).

In diesem Kontext betrachtet, ist die Phosphorylierung des  $sst_2$ -Rezeptors bemerkenswerterweise agonist- und speziesabhängig. SS-14 und Octreotid fördern die Phosphorylierung von allen sechs C-terminalen Serin- und Threoninresten (S341, S343, T353, T354, T356 und T359), sowohl in der Ratte als auch beim Menschen (Nagel et al., 2011; Manuskript I). Im Gegensatz dazu zeigt Pasireotid keine wesentliche Phosphorylierung und Internalisierung am Ratten  $sst_2$ -Rezeptor, ist aber am humanen  $sst_2$ -Rezeptor in der Lage S341 und S343 selektiv zu phosphorylieren und den Rezeptor teilweise zu internalisieren (Nagel et al., 2011; Manuskript I). Diese Phosphorylierungsmuster gehen mit einer unterschiedlichen Spezies-selektiven  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung einher. So kommt es nach Pasireotid durch Stimulation am humanen  $sst_2$ -Rezeptor in HEK293-Zellen zu einer erleichterten  $\beta$ -Arrestin-Mobilisierung (Lesche et al., 2009), am Ratten  $sst_2$ -Rezeptor bleibt die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung jedoch aus (Poll et al., 2010). Im Gegensatz dazu fördern SS-

---

14 und Octreotid eine robuste  $\beta$ -Arrestin-Mobilisierung sowohl am Ratte als auch am humanen  $ss_{t_2}$ -Rezeptor (Lesche et al., 2009; Liu et al., 2008; Tulipano et al., 2004). Interessanterweise führt eine Überexpression von GRK 2 oder GRK 3, nicht aber GRK 5, nach Stimulation mit Pasireotid zu einer T356/T359-Phosphorylierung,  $\beta$ -Arrestin-Mobilisierung und Internalisierung des Ratte  $ss_{t_2}$ -Rezeptors (Poll et al., 2010).

Angesichts der großen Homologie der Somatostatin-Rezeptoren zwischen Mensch und Ratte ist die Selektivität von Pasireotid beeindruckend. Mit Hilfe von Punktmutanten konnten die Aminosäuren 27, 30, 163 und 164 des humanen  $ss_{t_2}$ -Rezeptors, welche für die Pasireotid-induzierte S341/S343-Phosphorylierung und Internalisierung entscheidend sind, identifiziert werden (Nagel et al., 2011). Kommt es zum Austausch dieser Aminosäuren zwischen dem Ratten und humanen  $ss_{t_2}$ -Rezeptor, so wird der Ratten  $ss_{t_2}$ -Rezeptor nach Stimulation durch Pasireotid an den Stellen S341/S343 phosphoryliert und anschließend internalisiert, wohingegen die Internalisierung des humanen  $ss_{t_2}$  gehemmt wird (Nagel et al., 2011). Vergleichend dazu kommt es nach Stimulation mit SS-14 und Octreotid zu einer vollständigen Phosphorylierung und Internalisierung beider Rezeptor-Mutanten. Dies führt zu dem Schluss, dass Pasireotid den  $ss_{t_2}$ -Rezeptor über einen molekularen Schalter aktiviert, welcher sich strukturell und funktionell von der Octreotid-vermittelten  $ss_{t_2}$ -Rezeptor-Aktivierung unterscheidet.

Die agonist-selektive Phosphorylierung und Internalisierung wurde nicht nur in stabil Somatostatin-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen beobachtet, sondern auch in endogen exprimierenden Zelllinien wie GH3, INS oder AR42J (Cescato et al., 2010; Kao et al., 2011; Poll et al., 2010). So kommt es ebenfalls zu einer agonist-selektiven Phosphorylierung und Internalisierung des  $ss_{t_2}$ -Rezeptors im Pankreas und in der Hypophyse der Ratte nach Octreotid oder Pasireotid Applikation *in vivo* (Poll et al., 2010). Steigende Konzentrationen von Pasireotid sind ebenfalls in der Lage die Phosphorylierung und Internalisierung des  $ss_{t_2}$ -Rezeptors, nach vollständiger Aktivierung durch SS-14 oder Octreotid, zu hemmen. Dies deutet wiederum daraufhin, dass Pasireotid ein partieller Agonist am  $ss_{t_2}$ -Rezeptor ist (Poll et al., 2010; Manuskript I). Kürzlich wurde die Phosphorylierung von S341/S343 auch in Proben neuroendokriner Tumore von Patienten, die mit Octreotid-behandelt worden waren, nachgewiesen (Waser et al., 2012).

---

Bemerkenswert ist auch die agonisten-selektive Phosphorylierung des sst<sub>5</sub>-Rezeptors. SS-14 führt zu einer schnellen und konzentrationsabhängigen T333-Phosphorylierung (Petrich et al., 2013; Manuskript I). Der Multirezeptor-Agonist Pasireotid, sowie die sst<sub>5</sub>-selektiven Liganden L-817 und L-818 fördern ebenfalls eine deutlich nachweisbare T333-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu ist Octreotid nicht in der Lage eine vergleichbare Phosphorylierung hervorzurufen. Allerdings ist keine der genannten Verbindungen mit dem natürlichen Liganden SS-14 vergleichbar. Ein ähnliches Ausmaß an Phosphorylierung zeigt nur der sst<sub>5</sub>-selektive Agonist BIM-23268 (Shimon et al., 1997).

## 4.2 Regulation der Dephosphorylierung von Somatostatin-Rezeptoren

### 4.2.1 Spezifität der Proteinphosphatase 1

Unsere und anderen Arbeitsgruppen ist es in den letzten Jahren gelungen, mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern und einem siRNA *knock down-Screening* in HEK293-Zellen eine Reihe von GPCR-Proteinphosphatasen für die Dephosphorylierung zu identifizieren (Poll et al., 2011; Petrich et al., 2013; Ghosh and Schonbrunn, 2011; Gehret and Hinkle, 2013; Doll et al., 2012). Hierbei wurde von uns die PP1 $\beta$  für den sst<sub>2</sub>-Rezeptor (Poll et al., 2011) und die PP1 $\gamma$  für den sst<sub>5</sub>- (Petrich et al., 2013) und  $\mu$ -Opioid-Rezeptor identifiziert (Doll et al., 2012). Gehret und Hinkel (2013) identifizierten kürzlich PP1 $\alpha$  als GPCR-Proteinphosphatase für den TRH-Rezeptor (Gehret and Hinkle, 2013). Im Vergleich zur Regulation der agonist-induzierten Phosphorylierung und Internalisierung vieler GPCRs sind die molekularen Mechanismen und funktionellen Konsequenzen der GPCR-Dephosphorylierung weitestgehend unverstanden.

Gegenwärtig steht unter anderem das Zusammenspiel von Rezeptor-Internalisierung und Dephosphorylierung im Fokus. So wurde für die Resensibilisierung des Klasse A  $\beta_2$ AR schon vor mehr als einem Jahrzehnt angenommen, dass die Dephosphorylierung durch PP2A (Krueger et al., 1997) im frühen Endosomen

---

stattfindet, und der Rezeptor daraufhin wieder zurück zur Plasmamembran recycelt wird (Rockman et al., 2002). Hierbei scheint das saure Milieu des Endosoms entscheidend für die Aktivität der PP2A zu sein (Krueger et al., 1997). In diesem Zusammenhang deuteten mehrere Studien darauf hin, dass im Endosom weniger phosphorylierte als desensitisierte Rezeptoren an der Plasmamembran vorhanden sind (Barak et al., 1994; Sibley et al., 1986). In isolierten Vesikeln konnte eine höhere Proteinphosphatase-Aktivität als an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die Untersuchungen legten nahe, dass die Internalisierung essentiell für die Dephosphorylierung und Resensitisierung des  $\beta_2$ AR ist. Dies unterstützte die Theorie, dass die Dephosphorylierung im Endosom und nicht an der Plasmamembran stattfindet (Sibley et al., 1986; Yu et al., 1993; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 1997; Krueger et al., 1997). In früheren Studien wurde jedoch auch schon gezeigt, dass eine Hemmung der Internalisierung nicht zu einer Blockierung der Rezeptor-Resensitisierung führt (Pippig et al., 1995). Aufgrund mangelnder Techniken war es jedoch schwierig die Resensitisierung an der Plasmamembran nachzuweisen. Später konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der  $\beta_2$ AR-Internalisierung, durch eine hypertone Saccharose-Lösung oder eine dominant-negative Dynamin-Mutante die Dephosphorylierung der GRK- und PKA-vermittelten Phosphorylierungsstellen im C-Terminus nicht verhindert (Tran et al., 2004; Kelly, 2006). Diese Untersuchungen zeigten, dass die durch die Dephosphorylierung bedingte Internalisierung und Resensitisierung des  $\beta_2$ AR zwei unabhängig voneinander ablaufende Prozesse sind. Daraus ergab sich die Frage, ob die Desensitisierung und die Internalisierung abhängig oder unabhängig voneinander verlaufen.

Am hier untersuchten Klasse B  $ssr_2$ -Rezeptor führte eine Hemmung der Dephosphorylierung durch einen siRNA *knock down* der PP1 $\beta$ , bereits fünf Minuten nach dem der Agonist ausgewaschen wurde, zu einer anhaltenden Phosphorylierung des Rezeptors an der Plasmamembran (Poll et al., 2011; Manuskript II; Manuskript III). Diese zeitlich verlängerte Phosphorylierung bleibt auch nach längerem Auswaschen erhalten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die  $ssr_2$ -Rezeptor-Dephosphorylierung unmittelbar nach Rezeptor-Aktivierung in oder nahe der Plasmamembran initiiert wird. Diese Ergebnisse werden durch frühere Befunde von Ghosh et al. (2011), in denen beschrieben wird, dass die Dephosphorylierung von T353/T354 nicht erforderlich für eine Rezeptor-Internalisierung ist, bestätigt (Ghosh

---

and Schonbrunn, 2011). Die Dephosphorylierung ergab hier ein spezifisches Muster. Interessanterweise findet die Dephosphorylierung von S341/S343 zeitlich verzögert statt und hält bis zu mehr als einer Stunde unter agonisten-freien Bedingungen an (Petrich et al., 2013; Manuskript II). Im Gegensatz dazu waren T353/T354 nach einer halben Stunde und T356/T359 nach knapp einer dreiviertel Stunde dephosphoryliert. So ist es möglich, dass die  $sst_2$ -Rezeptor-Dephosphorylierung eingeleitet und während des Endozytoseweges fortgesetzt wird. Alternativ dazu könnte auch eine zweite, noch nicht identifizierte Enzymaktivität für eine Dephosphorylierung im Zytosol verantwortlich sein. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen am  $sst_5$ -Rezeptor, welcher wie der  $\beta_2AR$  zu den Rezeptoren der Klasse A gezählt wird, unterstützt (Petrich et al., 2013; Manuskript II). Vergleichend betrachtet findet hier eine schnellere Dephosphorylierung innerhalb der ersten fünf bis zehn Minuten statt, was ebenfalls die Theorie einer membranahen Dephosphorylierung unterstützt. Auch die Internalisierung ist typisch für die Klasse A-Rezeptoren, die hier am  $sst_5$ -Rezeptor nur sehr gering ausgeprägt ist und mit einem schnellen Recycling einhergeht. Die Internalisierung am  $sst_2$ -Rezeptor hingegen dauert mit bis zu einer Stunde wesentlich länger. Beim C-terminalen Austausch der beiden Rezeptoren, werden nicht nur die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmuster vertauscht, sondern auch das *Trafficking*-Verhalten. Der  $sst_{5-2}$ -Rezeptor zeigte eine vollständige Endozytose, was mit einer  $\beta$ -Arrestin2-Rekrutierung zur Plasmamembran einhergeht. Hingegen war der  $sst_{2-5}$ -Rezeptor nicht mehr in der Lage  $\beta$ -Arrestin2 zu rekrutieren, was nur eine teilweise Internalisierung und Endozytose zur Folge hatte (Manuskript II).

So ergeben sich, vergleichend betrachtet, zwei unterschiedliche Modelle für die Internalisierung und Dephosphorylierung der Klasse A- und B-Rezeptoren. In verschiedenen Arbeiten an Klasse A-GPCRs wurde gezeigt, dass die Internalisierung wahrscheinlich nicht notwendig für die Dephosphorylierung ist (Iyer et al., 2006; Gardner et al., 2001; Doll et al., 2012; Petrich et al., 2013). Bei diesen Rezeptortypen scheint es eine membranahen und schnelle Dephosphorylierung zu geben, die mit einem schnellen Recycling des Rezeptors einhergeht (Doll et al., 2012; Dang and Christie, 2011). Im Gegensatz dazu konnte man bei den Klasse B-GPCRs feststellen, dass die Dephosphorylierung an mehreren Aminosäurestellen nur intrazellulär und sehr langsam stattfindet, was wiederum mit einem längeren Recyclingprozess korreliert (Ghosh and Schonbrunn, 2011). Zusätzlich scheinen  $\beta$ -

---

Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 auch im internalisierten Zustand gleichermaßen stark an den Rezeptor zu binden (Ghosh and Schonbrunn, 2011; Gehret and Hinkle, 2010; Tulipano et al., 2004; Poll et al., 2011).

Unbekannt ist bis jetzt noch, wie es zu den unterschiedlich schnellen Dephosphorylierungen kommt und ob es Erkennungsmuster am Rezeptor gibt oder welchen Einfluss die Dephosphorylierung auf das Recycling hat. Erste Hinweise darauf wurden in einem Rezeptor-Chimären-Modell des Thyreotropin-releasing Hormon- und des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors gezeigt (Gehret and Hinkle, 2010). Durch den Austausch der jeweiligen C-Termini wurde gezeigt, dass scheinbar nicht nur die C-terminalen Aminosäuresequenzen wichtig für die Regulation der Dephosphorylierung sind (Gehret and Hinkle, 2010). Diese Daten weisen darauf hin, dass es starke räumliche und zeitliche Unterschiede in der Dephosphorylierung verschiedener GPCRs zu geben scheint, die noch genauer aufgeklärt werden müssen.

Erste Antworten darauf lieferten unsere Untersuchungen mit dem Somatostatin-Rezeptor *Tail-Swap*-Mutanten. Somatostatin-Rezeptoren zeigen auffallende Unterschiede in der  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung (Tulipano et al., 2004; Manuskript II). Der  $sst_2$ -Rezeptor, als prototypischer Klasse B-Rezeptor, wird an einem C-terminalen Cluster von Serin- und Threoninresten phosphoryliert und bildet stabile  $\beta$ -Arrestin-Komplexe. Es kommt zur  $\beta$ -Arrestin-abhängigen Internalisierung und zum langsamen Recycling. Im Gegensatz dazu geht der  $sst_5$ -Rezeptor, als prototypischer Klasse A-Rezeptor, eine instabile Bindung mit  $\beta$ -Arrestin ein, internalisiert unabhängig davon und recycelt schnell. So konnten wir erstmals zeigen, dass die Bindung des  $sst_2$ -C-Terminus an den  $sst_5$ -Rezeptor zu einer überwiegend PP1 $\beta$ -vermittelten Dephosphorylierung führt, während die Bindung des  $sst_5$ -C-Terminus an den  $sst_2$ -Rezeptor eine überwiegend PP1 $\gamma$ -vermittelte Dephosphorylierung zur Folge hat (Manuskript II). Darüber hinaus führte der *Tail-Swap* zu einer Umkehrung des *Trafficking*-Profils beider Rezeptoren. Diese bemerkenswerte Selektivität der PP1-Isoformen in Bezug auf die beiden Somatostatin-Rezeptorsubtypen war überraschend. Daraus folgend kann das Modell ergänzt werden, in dem schnell recycelnde Klasse A-Rezeptoren bevorzugt durch PP1 $\gamma$  und langsam recycelnde Klasse B-Rezeptoren durch PP1 $\beta$  dephosphoryliert werden (Manuskript II). Diese Hypothese wird unterstützt durch frühere Beobachtungen am  $\mu$ -Opioid-Rezeptor,

---

welcher als Klasse A-Rezeptor ebenfalls schnell recycelt und über PP1 $\gamma$  dephosphoryliert wird (Doll et al., 2012).

#### 4.2.2 Die Rolle von $\beta$ -Arrestin1 und $\beta$ -Arrestin2 bei der $ss_2$ -Rezeptor-Dephosphorylierung

$\beta$ -Arrestine regulieren die GPCR Signaltransduktion, indem sie Desensibilisierung, Endozytose, Recycling und Degradation der meisten GPCRs kontrollieren. Im Weiteren fungieren sie als liganden-regulierende *Scaffolds*, die in der Lage sind unterschiedliche Proteine zum GPCR zu rekrutieren und neue Signalwege anzuschalten (DeFea, 2011; DeWire et al., 2007; Lefkowitz and Shenoy, 2005; Luttrell and Gesty-Palmer, 2010). Die GPCR-Signaltransduktion wird unter anderem durch die Dephosphorylierung der C-terminalen Phosphatreste resensibilisiert. Fehlende Details über die Beteiligung bestimmter Proteinphosphatasen führten zu der vorherrschenden Ansicht, dass die GPCR-Dephosphorylierung ein unspezifischer und unregulierter Prozess sei. Die Identifikation unterschiedlicher PP1-Isoformen deuten darauf hin, dass ein bestimmter GPCR selektiv eine spezifische PP1-Isoform für die Dephosphorylierung rekrutiert. Dennoch ist unklar, durch welche Mechanismen die PP1-Selektivität und -Spezifität reguliert werden. Es ist möglich, dass entweder C-terminale Phosphorylierungsmuster, spezifische Sequenzen innerhalb der intrazellulären Schleifen des Rezeptors oder aber auch  $\beta$ -Arrestine für die Rekrutierung der richtigen Proteinphosphatase nötig sind. Eine weitere Frage ist, wie die katalytische Untereinheit der PP1 zur phosphorylierten Sequenz des GPCRs gelangt und reguliert wird.

Für die PP1 sind bis heute drei verschiedene katalytische ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und mehr als 80 verschiedene regulatorische Untereinheiten bekannt (Virshup and Shenolikar, 2009). Die Bindung der Untereinheiten erfolgt über das konservierte RVxF-Motiv (Roy and Cyert, 2009; Cohen, 2002). Die drei katalytischen Untereinheiten besitzen eine mehr als 90%ige Sequenzhomologie, einschließlich der RVxF-Sequenz, mit der sie interagieren (Heroes et al., 2012). Da der humane  $ss_2$ -Rezeptor kein potenzielles PP1-Bindungsmotiv im C-Terminus aufweist, muss die Bindung über nicht-

kanonische Wechselwirkung, mehrere schwache Wechselwirkungen oder indirekt über eine oder mehrere regulatorische Untereinheiten erfolgen.

Häufig werden solche Prozesse durch Adapterproteine wie  $\beta$ -Arrestine, AKAPs oder andere Proteine katalysiert, die eine enge Bindung zwischen den einzelnen Proteinen vermitteln (DeFea, 2011; Fraser et al., 2000; Vasudevan et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass AKAP Gravin mit dem  $\beta_2$ AR assoziiert, wodurch es nach Agonisten-Stimulation zur Rekrutierung von PP2A kommt (Lin et al., 2000; Tao et al., 2003). AKAP79/150 hingegen interagiert mit dem  $\beta_2$ AR in einem Multiproteinkomplex und leitet somit die Bildung eines Signalkomplexes aus PKA, PKC und PP2B (Calcineurin) ein (Fraser et al., 2000; Cong et al., 2001). Zusätzlich scheint AKAP79 auch als regulatorische Untereinheit an der PP1 für die Substratspezifität mittels Translokation beteiligt zu sein (Le et al.). Im Weiteren wurde beschrieben, dass auch die  $\beta$ -Arrestine bei der De- und Resensibilisierung des  $\beta_2$ AR und des  $\mu$ -Opioid-Rezeptors eine entscheidende Rolle spielen (Groer et al., 2011; Dang and Christie, 2011; Vasudevan et al., 2011).

Ein weiterer möglicher Kandidat hierfür wäre das Multidomänenprotein Spinophilin, was sowohl eine bekannte regulatorische Untereinheit der PP1 ist, als auch über ein F-Actin-Bindemotiv, eine PP1- und PDZ-Proteinbindedomäne verfügt (Heroes et al., 2012; Bollen et al., 2012; Cohen, 2002; Ragusa et al. 2011) So wurde beschrieben, dass der Phosphorylierungsstatus des AMPA- und NMDA-Rezeptors durch einen Proteinkomplex mit Spinophilin gesteuert wird. Spinophilin ist dabei für die Gerüst- und Lokalisationsfunktion notwendig, wodurch die PP1 in die dendritischen Dornen transferiert wird und aktiviert werden kann (Hu et al., 2007; Kelker et al., 2007).  $\beta$ -Arrestine und Somatostatin-Rezeptoren sind beide in der Lage über die PDZ-Proteinbindedomäne zu interagieren (Klenk et al. 2010; Christenn et al., 2007). So ist vorstellbar, dass Spinophilin ebenfalls eine regulatorische Untereinheit der PP1 am  $sst_2$ - und  $sst_5$ -Rezeptor sein kann.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass  $\beta$ -Arrestin1 und PP1 $\beta$  als konstitutiver Komplex existieren und die schnelle Dephosphorylierung am  $sst_2$ -Rezeptor vermitteln. Dies deutet erneut daraufhin, dass die Dephosphorylierung an oder nahe der Plasmamembran stattfindet.  $\beta$ -Arrestin1 fungiert als *Scaffold*- und Adapterprotein, bringt die PP1 $\beta$  zum phosphorylierten Rezeptor und sorgt für eine optimale Ausrichtung der Proteinphosphatase zum Substrat. Diese Funktion von  $\beta$ -Arrestin1 ist neuartig und wurde so noch nicht beschrieben. Darüber hinaus wird so



---

die Rate der GPCR-Resensibilisierung, sowie das *fine tuning* unkonventioneller  $\beta$ -Arrestin-abhängiger GPCR-Signalwege reguliert. In Poll et al. (2011) wurde gezeigt, dass die GRK 2- und GRK 3-vermittelte Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup> Motivs essentiell für die  $\beta$ -Arrestin-Bindung ist (Poll et al., 2011), wodurch es zu einer  $G\alpha_i$ -Protein-unabhängigen  $\beta$ -Arrestin-abhängigen ERK-Aktivierung kommt (Poll et al., 2011). In stabil *sst*<sub>2</sub>-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen führt eine Hemmung der PP1 $\beta$  Expression zu einem verstärkten Anstieg der  $\beta$ -Arrestin-abhängigen ERK-Aktivierung nach SS-14-Behandlung (Poll et al., 2011). Dieser Effekt wurde nicht nach EGF-Behandlung oder nach Hemmung der PP1 $\alpha$  oder PP1 $\gamma$  Expression, unter gleichen Bedingungen beobachtet und deutet darauf hin, dass eine verminderte PP1 $\beta$  Aktivität nicht generell zu einem verstärktem ERK-Ansprechen führt (Poll et al., 2011). Daraus folgt, dass die PP1 $\beta$ -vermittelte GPCR-Dephosphorylierung zu einer Auflösung des  $\beta$ -Arrestin-GPCR-Komplexes führt, wodurch das  $\beta$ -Arrestin-abhängige ERK-Signal reguliert wird. Neuste Arbeiten von Irannejad und von Zastrow (2013) unterstützen diese Ergebnisse (Irannejad et al., 2013). Unter Verwendung des konformationsspezifischen Nanobodys NB80 wurden erstmals zwei zeitlich und räumlich getrennte Wellen der Signaltransduktion des  $G\alpha_s$ -Protein gekoppelten  $\beta_2$ AR beschrieben (Irannejad et al., 2013). NB80, welches an das  $G\alpha_s$ -Protein gekoppelt ist, wird nach Stimulation zum aktiven Rezeptor an die Plasmamembran sowie in intrazelluläre Vesikel rekrutiert. Keine Rekrutierung findet jedoch nach Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den  $\beta_2$ AR in Clathrin-beschichteten Vesikeln statt. In Kombination mit den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich ein einfaches Modell in dem die schnelle PP1-vermittelte Dephosphorylierung, durch die Dissoziation von  $\beta$ -Arrestin vom phosphorylierten GPCR, eine zweite Welle der Signaltransduktion ermöglicht. Dies könnte ein genereller Mechanismus für viele GPCRs sein.

Unsere Untersuchung ergaben zudem, dass  $\beta$ -Arrestin2 keinen direkten Einfluss auf die Dephosphorylierung hat. Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass  $\beta$ -Arrestin2 ebenfalls Teil des  $\beta$ -Arrestin1/PP1 $\beta$ -Komplexes ist.  $\beta$ -Arrestin2 könnte hier mehr für die Internalisierung des *sst*<sub>2</sub>-Rezeptors entscheidend sein (Whalen et al., 2010; Shenoy and Lefkowitz, 2011; DeFea, 2011). Jüngste Untersuchungen am Cannabinoid-Rezeptor 1 zeigen, dass die Internalisierung nach siRNA *knock down* von  $\beta$ -Arrestin2 vollständig gehemmt werden kann (Ahn et al., 2013). Untersuchungen am  $\mu$ -Opioid-Rezeptor zeigen auch, dass  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 unterschiedlich stark binden, woraus sich möglicherweise unterschiedliche

---

Regulationsmechanismen ergeben könnten (Groer et al., 2011; Dang and Christie, 2011). Zudem wurde angedeutet, dass die Dephosphorylierung nach DAMGO-Stimulation abhängig von  $\beta$ -Arrestin1 abläuft (Groer et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig  $\beta$ -Arrestin1 als eine potentielle regulatorische Untereinheit der PP1 identifiziert werden, welche die schnelle PP1 $\beta$ -vermittelte Dephosphorylierung an GPCRs katalysiert. Die durch den  $\beta$ -Arrestin1/PP1 $\beta$ -Komplex vermittelte Dephosphorylierung ist ein streng regulierter Prozess der unmittelbar nach der Rezeptor-Aktivierung bzw. Phosphorylierung eingeleitet wird. Die schnelle GPCR-Dephosphorylierung durch PP1 ist ein entscheidender Schritt für die Rezeptor-Resensibilisierung, die Beendigung des  $\beta$ -Arrestin-Signals sowie die Einleitung der endosomalen G-Protein-Signaltransduktion.

### 4.2.3 Physiologische Relevanz

Die physiologische Relevanz der GPCR-Dephosphorylierung ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Erste Hinweise darauf sind in Poll et al. (2011) zu finden, wodurch es nach einer Hemmung der PP1 $\beta$  Expression zu einer verstärkten  $\beta$ -Arrestin-vermittelten ERK-Aktivierung nach SS-14 Stimulation kommt (Poll et al., 2011). Daraus folgt, dass die PP1 essentiell für die Beendigung des  $\beta$ -Arrestin-Signals ist. Eine weitere wichtige Konsequenz der GPCR-Dephosphorylierung ist die daraus resultierende Resensibilisierung, wodurch der Rezeptor wieder aktivierbar zurück an die Membran gelangt (Poll et al., 2011; Pippig et al., 1995). Der Zusammenhang zwischen Dephosphorylierung und Recycling konnte in dieser Arbeit anhand der *Tail-Swap*-Mutanten weiter aufgeklärt werden (Manuskript II). So scheint die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung mit der Internalisierung und dem Recycling in Abhängigkeit von der jeweiligen Proteinphosphatase zu korrelieren. Daraus ergibt sich, dass es zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen der Resensibilisierung, eine langsame womöglich für Klasse A-Rezeptoren und eine schnelle für Klasse B-Rezeptoren, gibt. Die Desensibilisierung des GPCR-Signals hat ein verringertes Ansprechen des Rezeptors auf wiederholte oder dauerhafte Reize zur Folge. Eine mögliche physiologische Konsequenz für das schnelle Recycling könnte die Vermeidung der Toleranzentwicklung und eine schnelle, neue

---

Aktivierbarkeit während langandauernder Behandlung mit Agonisten, sein. Diese ist relevant bei der Therapie von neuroendokrinen Tumoren mit Octreotid und Pasireotid, sowie beim  $\mu$ -Opioid-Rezeptor in der Schmerztherapie. Beide Rezeptoren gehören zur Klasse A-GPCRs und werden sehr schnell über PP1 $\gamma$  dephosphoryliert und recycelt.

### 4.3 Offene Fragen

1. Welchen Einfluss hat die agonist-selektive Phosphorylierung des  $sst_2$ -Rezeptors durch Octreotid und Pasireotid auf eine langfristige Behandlung von neuroendokrinen Tumoren?
2. Wie wird die Phosphorylierung und Dephosphorylierung in Geweben reguliert, die den  $sst_2$ - und  $sst_5$ -Rezeptor koexprimieren und welche Konsequenzen ergeben sich daraus für die Behandlung mit Somatostatin-Analoga?
3. Wie kommt es zu den räumlichen und zeitlichen Unterschieden in der PP1-vermittelten Dephosphorylierung?
4. Wodurch ist die PP1-Selektivität festgelegt? Wie werden die PP1-Komplexe zusammengebaut und wie zum phosphorylierten GPCR rekrutiert?
5. Welche weiteren regulatorischen Untereinheiten sind für die Funktionalität der PP1 $\beta$  wichtig?
6. Gibt es eine selektive PP1-Rekrutierung bei unterschiedlichen Liganden?
7. Ist die Spezifität der PP1-Isoformen auch bei anderen GPCRs zu finden?
8. Welche Rolle spielen  $\beta$ -Arrestin1 und  $\beta$ -Arrestin2 bei der Dephosphorylierung am  $sst_5$ -Rezeptor?

---

## 4.4 Schlussfolgerung und Hypothese

GPCRs regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. Dabei ist sowohl die Aktivierung als auch die Beendigung der Signalweitergabe aktivierter GPCRs essentiell für die zelluläre Homöostase.

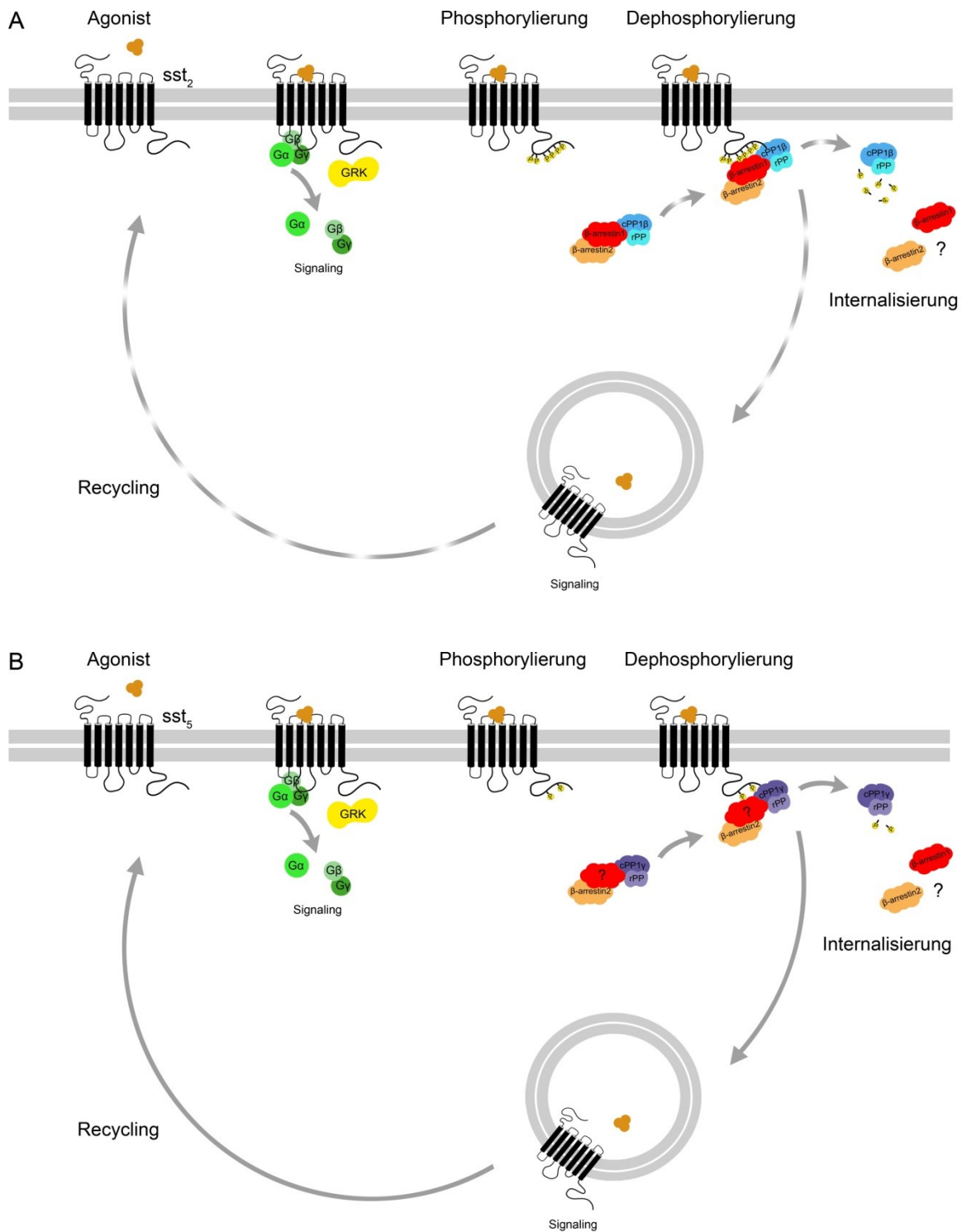
I. Die in dieser Arbeit gezeigten Studien ergaben wertvolle und bisher unbeachtete Informationen über Somatostatin-Analoga, die sich zur Zeit in der klinischen und präklinischen Prüfung befinden. Folglich sollte Pasireotid als bevorzugter  $sst_5$ - und Octreotid als bevorzugter  $sst_2$ -Ligand klassifiziert werden. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich wichtige Konsequenzen für die klinische Anwendung von Octreotid und Pasireotid: 1) Tumore, die überwiegend den  $sst_2$ -Rezeptor exprimieren und dauerhaft auf Octreotid ansprechen, wie z. B. die Mehrheit der GH-sekretierenden Adenome, werden weiter auf eine Octreotid-Behandlung ansprechen. Angesichts der partialagonistischen Eigenschaften von Pasireotid, ist es denkbar, dass die gleichzeitige Gabe von Octreotid und Pasireotid den klinischen Nutzen von Octreotid begrenzt. 2) Tumore deren Ansprechen sich während der Behandlung mit Octreotid verringert und eine starke  $sst_5$ -Rezeptor Expression zeigen, wie z. B. Octreotid-resistente GH-sekretierende Adenome und Karzinoide, sollten besser auf eine Pasireotid-Behandlung ansprechen. 3) Aufgrund der Fähigkeit von Pasireotid den  $sst_2$ -Rezeptor nur im geringen Maße zu internalisieren, ist Pasireotid weniger effektiv als Octreotid für den Einsatz in der Bildgebung und Strahlentherapie bei  $sst_2$ -Rezeptor exprimierenden Tumoren (Schulz et al. 2013 *in revision*).

II. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass für verschiedene GPCRs spezifische PP1-Isoformen existieren, welche mit bemerkenswerter Selektivität rekrutiert werden. So wurde beschrieben, dass ein C-terminaler Austausch zwischen Rezeptoren der Klasse A und B nicht nur zu einer Umkehr der PP1-Spezifität, sondern auch der  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung und der damit einhergehenden Internalisierung führt. Hierbei stellen die C-terminalen Bereiche der GPCRs eine wichtige Determinate für die Selektivität der PP1 dar. Diese unterschiedliche

---

Rekrutierung hat wiederum tiefgreifende Konsequenzen für die Dynamik der Dephosphorylierung und das *Trafficking* von GPCRs.

III.  $\beta$ -Arrestine besitzen als Multidomänenproteine vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle und regulieren als zentraler Schalter komplexe Mechanismen. In dieser Arbeit konnte ein weiteres Beispiel für die Komplexität des Moleküls und die Wichtigkeit in der Regulation der zellulären Homoöstase aufgezeigt werden. Daraus ergibt sich die Hypothese (Abb. 7), dass  $\beta$ -Arrestin1, PP1 $\beta$  und  $\beta$ -Arrestin2 in einem konstitutiven Komplex existieren und zusammen zur Plasmamembran rekrutiert werden. Am sst<sub>2</sub>-Rezeptor reguliert  $\beta$ -Arrestin1 das *fine tuning* der PP1 $\beta$  und sorgt zusätzlich für die Terminierung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion.  $\beta$ -Arrestin2 hingegen ist entscheidend für die Clathrin-abhängige Internalisierung des Rezeptors. Die Dephosphorylierung findet hierbei an oder nahe der Plasmamembran statt. An welcher Stelle der  $\beta$ -Arrestin/PP1 $\beta$ -Komplex dissoziiert bleibt unklar. Die  $\beta$ -Arrestine selbst sind in der Lage eine zweite Welle der Signaltransduktion, unabhängig vom G-Protein an der Plasmamembran und im Endosom auszulösen. Eine starke  $\beta$ -Arrestin/PP1 $\beta$ -Interaktion findet bei relativ langsam dephosphorylierenden GPCRs, wie dem Klasse B-sst<sub>2</sub>-Rezeptor, statt. Diese geht mit einem ebenfalls langsamen Recyclingprozess einher. Schnell dephosphorylierende GPCRs hingegen, wie der Klasse A-sst<sub>5</sub>-Rezeptor und der  $\mu$ -Opioid-Rezeptor, werden über PP1 $\gamma$  dephosphoryliert, haben nur eine geringe Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin1 und 2 und recyceln sehr schnell.



**Abb. 7: De- und Resensibilisierung von Klasse A und B GPCRs.** Am Beispiel des sst<sub>2</sub>- (A) und sst<sub>5</sub>-Rezeptors (B) sind hier die zeitlichen und räumlichen Dynamiken vergleichend dargestellt. So kommt es durch die GRK 2- und GRK 3-vermittelte Phosphorylierung an mindestens sechs Phosphorylierungsstellen zu einer stabilen β-Arrestin1- und β-Arrestin2-Bindung am sst<sub>2</sub>-Rezeptor. Durch PP1β wird eine langsamere Dephosphorylierung und Recycling initiiert (unterbrochene Pfeile). Die selektive GRK 2-vermittelte T333-Phosphorylierung am sst<sub>5</sub>-Rezeptor hingegen führt zu einer instabilen β-Arrestin1- und β-Arrestin2-Bindung, was jedoch mit einer schnellen PP1γ-vermittelten Dephosphorylierung und Recycling einhergeht (durchgehende Pfeile).

---

## 5 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatzyklase
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropes Hormon
<b>AMPA-Rezeptor</b>	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure Rezeptor
<b>AP-2</b>	Adapter-Protein-2
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CHO</b>	<i>Chinese hamster ovary</i> , Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
<b>c-Src</b>	Zelluläre proto-onkogene Tyrosinkinase
<b>C-Terminus</b>	Carboxyl-Terminus
<b>EGF</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor
<b>ERK</b>	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GEF</b>	GTP-Austauschfaktor
<b>GH</b>	<i>Growth hormon</i> , Wachstumshormon
<b>GPCR</b>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
<b>GRK</b>	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
<b>G-Protein</b>	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>GTPase</b>	Guanosintriphosphatase
<b>HEK293</b>	humane embryonale Nieren-293-Zellen
<b>MAPK</b>	Mitogen aktivierte Proteinkinase
<b>NMDA-Rezeptor</b>	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C

---

<b>PP</b>	Proteinphosphatase
<b>RGS</b>	Regulatoren der G-Protein-Signalweitergabe
<b>S</b>	Serin
<b>siRNA</b>	<i>small interfering ribonucleic acid</i> , kleine interferierende Ribonukleinsäuren
<b>SOM230</b>	Pasireotid
<b>SS-14 (-28)</b>	Somatostatin-14 (-28)
<b>sst</b>	Somatostatin-Rezeptor
<b>T</b>	Threonin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>z. B.</b>	zum Beispiel



---

## 6 Literatur

- Ahn KH, Mahmoud MM, Shim JY, Kendall DA (2013) Distinct roles of beta-arrestin 1 and beta-arrestin 2 in ORG27569-induced biased signaling and internalization of the cannabinoid receptor one (CB1). *J Biol Chem*.
- Ahn S, Kim J, Hara MR, Ren XR, Lefkowitz RJ (2009) {beta}-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *J Biol Chem* 284:8855-8865.
- Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y (1999) Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 274:1185-1188.
- Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1740-1744.
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* 279:35518-35525.
- Asnacios A, Courbon F, Rochaix P, Bauvin E, Cances-Lauwers V, Susini C, Schulz S, Boneu A, Guimbaud R, Buscail L (2008) Indium-111-pentetreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype 2 expression: new prognostic factors for malignant well-differentiated endocrine tumors. *J Clin Oncol* 26:963-970.
- Barak LS, Tiberi M, Freedman NJ, Kwatra MM, Lefkowitz RJ, Caron MG (1994) A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* 269:2790-2795.
- Barford D, Das AK, Egloff MP (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27:133-164.

- 
- Barlic J, Andrews JD, Kelvin AA, Bosinger SE, DeVries ME, Xu L, Dobransky T, Feldman RD, Ferguson SS, Kelvin DJ (2000) Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat Immunol* 1:227-233.
- Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren XR, Milligan G, Lefkowitz RJ (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* 280:8041-8050.
- Beaulieu JM, Marion S, Rodriguiz RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, Wetsel WC, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132:125-136.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122:261-273.
- Ben-Shlomo A, Melmed S (2010) Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab* 21:123-133.
- Blum AM, Metwali A, Mathew RC, Cook G, Elliott D, Weinstock JV (1992) Granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN-gamma secretion. *J Immunol* 149:3621-3626.
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18:1723-1729.
- Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M (2012) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35:450-458.
- Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, Glusman JE, Petersenn S, Reincke M, Snyder P, Tabarin A, Biller BM, Findling J, Melmed S, Darby CH, Hu K, Wang Y, Freda PU, Grossman AB, Frohman LA, Bertherat J (2009) Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab* 94:115-122.
- Brautigan DL (2013) Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *Febs J* 280:324-345.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79.

- 
- Breeman WA, de Jong M, Bernard B, Hofland LJ, Srinivasan A, van der Pluijm M, Bakker WH, Visser TJ, Krenning EP (1998) Tissue distribution and metabolism of radioiodinated DTPA0, D-Tyr1 and Tyr3 derivatives of octreotide in rats. *Anticancer Res* 18:83-89.
- Brink CB, Harvey BH, Bodenstein J, Venter DP, Oliver DW (2004) Recent advances in drug action and therapeutics: relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* 57:373-387.
- Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E (2007) Brain-gut communication: cortistatin, somatostatin and ghrelin. *Trends Endocrinol Metab* 18:246-251.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G (2002) SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146:707-716.
- Bruns C, Raulf F, Hoyer D, Schloos J, Lubbert H, Weckbecker G (1996) Binding properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 45:17-20.
- Byk T, Bar-Yaacov M, Doza YN, Minke B, Selinger Z (1993) Regulatory arrestin cycle secures the fidelity and maintenance of the fly photoreceptor cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1907-1911.
- Casarini AP, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S, Giannella-Neto D, Musolino NR, Alves VA, Bronstein MD (2009) Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary* 12:297-303.
- Cescato R, Loesch KA, Waser B, Macke HR, Rivier JE, Reubi JC, Schonbrunn A (2010) Agonist-biased signaling at the sst2A receptor: the multi-somatostatin analogs KE108 and SOM230 activate and antagonize distinct signaling pathways. *Mol Endocrinol* 24:240-249.
- Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE, Wester HJ, Culler M, Ginj M, Liu Q, Schonbrunn A, Reubi JC (2006) Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med* 47:502-511.
- Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1-39.

- 
- Chauvin S, Bencsik M, Bambino T, Nissenson RA (2002) Parathyroid hormone receptor recycling: role of receptor dephosphorylation and beta-arrestin. *Mol Endocrinol* 16:2720-2732.
- Choy MS, Page R, Peti W (2012) Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins. *Biochem Soc Trans* 40:969-974.
- Christenn M, Kindler S, Schulz S, Buck F, Richter D, Kreienkamp HJ (2007) Interaction of brain somatostatin receptors with the PDZ domains of PSD-95. *FEBS Lett* 581:5173-5177.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66:61-79.
- Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203.
- Cohen PT (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115:241-256.
- Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, Schoenherr U, Mills D, Salgado LR, Biller BM (2012) A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *N Engl J Med* 366:914-924.
- Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* 276:15192-15199.
- Csaba Z, Peineau S, Dournaud P (2011) Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking. *J Mol Endocrinol* 48:R1-R12.
- Culler MD (2011) Somatostatin-dopamine chimeras: a novel approach to treatment of neuroendocrine tumors. *Horm Metab Res* 43:854-857.
- Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994) Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127:915-934.
- Dang VC, Christie MJ (2011) Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br J Pharmacol* 165:1704-1716.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:235-271.

- 
- DeFea KA (2011) Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cell Signal* 23:621-629.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69:483-510.
- DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ (2008) Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem* 283:10611-10620.
- Doll C, Konietzko J, Poll F, Koch T, Hollt V, Schulz S (2011) Agonist-selective patterns of micro-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *Br J Pharmacol* 164:298-307.
- Doll C, Poll F, Peuker K, Loktev A, Gluck L, Schulz S (2012) Deciphering micro-opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* 167:1259-1270.
- Donangelo I, Melmed S (2005) Treatment of acromegaly: future. *Endocrine* 28:123-128.
- Elberg G, Hipkin RW, Schonbrunn A (2002) Homologous and heterologous regulation of somatostatin receptor 2. *Mol Endocrinol* 16:2502-2514.
- Elliott DE, Blum AM, Li J, Metwali A, Weinstock JV (1998) Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J Immunol* 160:3997-4003.
- Epelbaum J (1986) Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 27:63-100.
- Feelders RA, Hofland LJ (2013) Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 98:425-438.
- Feelders RA, Hofland LJ, van Aken MO, Neggers SJ, Lamberts SW, de Herder WW, van der Lely AJ (2009) Medical therapy of acromegaly: efficacy and safety of somatostatin analogues. *Drugs* 69:2207-2226.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C (2000) Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 94:205-210.

- 
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S (2008) Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4519-4524.
- Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJ (1999) Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* 13:24-37.
- Fraser ID, Cong M, Kim J, Rollins EN, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Scott JD (2000) Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr Biol* 10:409-412.
- Freda PU (2002) Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3013-3018.
- Freda PU, Katznelson L, van der Lely AJ, Reyes CM, Zhao S, Rabinowitz D (2005) Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4465-4473.
- Gagnon AW, Kallal L, Benovic JL (1998) Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273:6976-6981.
- Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, Pei G (2004) Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell* 14:303-317.
- Gardner B, Liu ZF, Jiang D, Sibley DR (2001) The role of phosphorylation/dephosphorylation in agonist-induced desensitization of D1 dopamine receptor function: evidence for a novel pathway for receptor dephosphorylation. *Mol Pharmacol* 59:310-321.
- Gatto F, Feelders RA, van der Pas R, Kros JM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Neggers SJ, van der Lelij AJ, Minuto F, Lamberts SW, de Herder WW, Ferone D, Hofland LJ (2013) Immunoreactivity score using an anti-sst2A receptor monoclonal antibody strongly predicts the biochemical response to adjuvant treatment with somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E66-71.

- 
- Gehret AU, Hinkle PM (2010) Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem J* 428:235-245.
- Gehret AU, Hinkle PM (2013) siRNA Screen Identifies the Phosphatase Acting on the G Protein-Coupled Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor. *ACS Chem Biol* 8:588-598.
- Ghosh M, Schonbrunn A (2011) Differential temporal and spatial regulation of somatostatin receptor phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*.
- Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447-450.
- Groer CE, Schmid CL, Jaeger AM, Bohn LM (2011) Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J Biol Chem* 286:31731-31741.
- Gruszka A, Culler MD, Melmed S (2012) Somatostatin analogs and chimeric somatostatin-dopamine molecules differentially regulate human growth hormone and prolactin gene expression and secretion in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 362:104-109.
- Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Cordelier P, Bousquet C, Pyronnet S, Susini C (2005) Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest* 28:5-9.
- Gurevich VV, Hanson SM, Song X, Vishnivetskiy SA, Gurevich EV (2011) The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells. *Prog Retin Eye Res* 30:405-430.
- Hanyaloglu AC, von Zastrow M (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:537-568.
- Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M (2009) G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov Today* 14:231-240.
- Heroes E, Lesage B, Gornemann J, Beullens M, Van Meervelt L, Bollen M (2012) The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *Febs J*.

- 
- Hipkin RW, Wang Y, Schonbrunn A (2000) Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem* 275:5591-5599.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, et al. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16:86-88.
- Hu XD, Huang Q, Yang X, Xia H (2007) Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus. *J Neurosci* 27:4674-4686.
- Imamura T, Huang J, Dalle S, Ugi S, Usui I, Luttrell LM, Miller WE, Lefkowitz RJ, Olefsky JM (2001) beta -Arrestin-mediated recruitment of the Src family kinase Yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 276:43663-43667.
- Innamorati G, Sadeghi H, Birnbaumer M (1998) Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem* 273:7155-7161.
- Invitti C, de Martin M, Brunani A, Piolini M, Cavagnini F (1990) Treatment of Cushing's syndrome with the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 (sandostatin). *Clin Endocrinol (Oxf)* 32:275-281.
- Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SG, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B, von Zastrow M (2013) Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 495:534-538.
- Iyer V, Tran TM, Foster E, Dai W, Clark RB, Knoll BJ (2006) Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol* 147:249-259.
- Jacobs S, Schulz S (2008) Intracellular trafficking of somatostatin receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:58-62.
- Jallad RS, Musolino NR, Salgado LR, Bronstein MD (2005) Treatment of acromegaly with octreotide-LAR: extensive experience in a Brazilian institution. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:168-175.



- 
- Just S, Illing S, Trester-Zedlitz M, Lau EK, Kotowski SJ, Miess E, Mann A, Doll C, Trinidad JC, Burlingame AL, von Zastrow M, Schulz S (2013) Differentiation of opioid drug effects by hierarchical multi-site phosphorylation. *Mol Pharmacol* 83:633-639.
- Kao YJ, Ghosh M, Schonbrunn A (2011) Ligand-Dependent Mechanisms of sst2A Receptor Trafficking: Role of Site-Specific Phosphorylation and Receptor Activation in the Actions of Biased Somatostatin Agonists. *Mol Endocrinol*.
- Kelker MS, Dancheck B, Ju T, Kessler RP, Hudak J, Nairn AC, Peti W (2007) Structural basis for spinophilin-neurabin receptor interaction. *Biochemistry* 46:2333-2344.
- Kelly E (2006) G-protein-coupled receptor dephosphorylation at the cell surface. *Br J Pharmacol* 147:235-236.
- Kim K, Li L, Kozlowski K, Suh HS, Cao W, Ballermann BJ (2005) The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMR1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1327-1334.
- Klenk C, Vetter T, Zurn A, Vilardaga JP, Friedman PA, Wang B, Lohse MJ (2010) Formation of a ternary complex among NHERF1, beta-arrestin, and parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 285:30355-30362.
- Kliwer A, Mann A, Petrich A, Poll F, Schulz S (2012) A transplantable phosphorylation probe for direct assessment of G protein-coupled receptor activation. *PLoS One* 7:e39458.
- Koch BD, Schonbrunn A (1984) The somatostatin receptor is directly coupled to adenylate cyclase in GH4C1 pituitary cell membranes. *Endocrinology* 114:1784-1790.
- Koenig JA, Edwardson JM, Humphrey PP (1997) Somatostatin receptors in Neuro2A neuroblastoma cells: operational characteristics. *Br J Pharmacol* 120:45-51.
- Kohout TA, Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 63:9-18.
- Kovacs JJ, Whalen EJ, Liu R, Xiao K, Kim J, Chen M, Wang J, Chen W, Lefkowitz RJ (2008) Beta-arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science* 320:1777-1781.
- Kraus - *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*; 4th, enlarged and improved Edition; WILEY-VCH Verlag GmbH&co.KG&A (ISBN: 978-3-527-31397-6).

- 
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272:5-8.
- Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.
- Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C (2004) Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1014:121-131.
- Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ (2002) Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab* 13:451-457.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ (1996) Octreotide. *N Engl J Med* 334:246-254.
- Lancranjan I, Bruns C, Grass P, Jaquet P, Jervell J, Kendall-Taylor P, Lamberts SW, Marbach P, Orskov H, Pagani G, Sheppard M, Simionescu L (1996) Sandostatin LAR: a promising therapeutic tool in the management of acromegalic patients. *Metabolism* 45:67-71.
- Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275:23120-23126.
- Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K, Filipek S (2012) G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta Biochim Pol* 59:515-529.
- Le AV, Tavalin SJ, Dodge-Kafka KL (2011) Identification of AKAP79 as a protein phosphatase 1 catalytic binding protein. *Biochemistry* 50:5279-5291.
- Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ (2006) New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol Cell* 24:643-652.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512-517.
- Lesche S, Lehmann D, Nagel F, Schmid HA, Schulz S (2009) Differential effects of octreotide and pasireotide on somatostatin receptor internalization and trafficking in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 94:654-661.
- Lewis I, Bauer W, Albert R, Chandramouli N, Pless J, Weckbecker G, Bruns C (2003) A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential. *J Med Chem* 46:2334-2344.

- 
- Lin F, Wang H, Malbon CC (2000) Gravin-mediated formation of signaling complexes in beta 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J Biol Chem* 275:19025-19034.
- Liu Q, Cescato R, Dewi DA, Rivier J, Reubi JC, Schonbrunn A (2005) Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Mol Pharmacol* 68:90-101.
- Liu Q, Dewi DA, Liu W, Bee MS, Schonbrunn A (2008) Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding. *Mol Pharmacol* 73:292-304.
- Liu Q, Schonbrunn A (2001) Agonist-induced phosphorylation of somatostatin receptor subtype 1 (sst1). Relationship to desensitization and internalization. *J Biol Chem* 276:3709-3717.
- Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179:171-188.
- Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39:239-264.
- Luttrell LM, Gesty-Palmer D (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* 62:305-330.
- Ma P, Wang Y, van der Hoek J, Nedelman J, Schran H, Tran LL, Lamberts SW (2005) Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of a novel multiligand somatostatin analog, SOM230, with octreotide in patients with acromegaly. *Clin Pharmacol Ther* 78:69-80.
- Marchese A, Benovic JL (2001) Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276:45509-45512.
- Marchese A, Chen C, Kim YM, Benovic JL (2003) The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28:369-376.
- Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:601-629.
- Maurer R, Reubi JC (1985) Somatostatin receptors. *Jama* 253:2741.
- Millar RP, Newton CL (2009) The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol* 24:261-274.

- 
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:234-244.
- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Hollt V, Schulz S, Steinke R, Lehnert H (2003) Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5150-5157.
- Nagel F, Doll C, Poll F, Kliewer A, Schroder H, Schulz S (2011) Structural Determinants of Agonist-Selective Signaling at the sst2A Somatostatin Receptor. *Mol Endocrinol*.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296:1636-1639.
- Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang TY, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ (2011) Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal* 4:ra51.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J Biol Chem* 276:19452-19460.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275:17201-17210.
- Oberg K (2005) Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: recent advances in molecular genetics, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Oncol* 17:386-391.
- Oberg KE, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Krenning EP (2010) Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 139:742-753, 753 e741.
- Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:60-71.
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5:993-996.
- Palczewski K (1994) Structure and functions of arrestins. *Protein Sci* 3:1355-1361.

- 
- Park PS, Lodowski DT, Palczewski K (2008) Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:107-141.
- Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198.
- Patel YC, Srikant CB (1994) Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* 135:2814-2817.
- Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, Mayor F, Jr. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 69:46-56.
- Petersenn S, Heyens M, Ludecke DK, Beil FU, Schulte HM (2000) Absence of somatostatin receptor type 2 A mutations and gip oncogene in pituitary somatotroph adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:35-42.
- Petersenn S, Rasch AC, Bohnke C, Schulte HM (2002) Identification of an upstream pituitary-active promoter of human somatostatin receptor subtype 5. *Endocrinology* 143:2626-2634.
- Petrich A, Mann A, Kliewer A, Nagel F, Strigli A, Martens JC, Poll F, Schulz S (2013) Phosphorylation of Threonine 333 Regulates Trafficking of the Human sst5 Somatostatin Receptor. *Mol Endocrinol*.
- Peeverelli E, Mantovani G, Calebiro D, Doni A, Bondioni S, Lania A, Beck-Peccoz P, Spada A (2008) The third intracellular loop of the human somatostatin receptor 5 is crucial for arrestin binding and receptor internalization after somatostatin stimulation. *Mol Endocrinol* 22:676-688.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Holtt V, Schulz S (2001) Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* 276:14027-14036.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Holtt V, Schulz S (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 277:19762-19772.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.

- 
- Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ (1995) Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 47:666-676.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257:1264-1267.
- Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8343-8347.
- Plockinger U, Albrecht S, Mawrin C, Saeger W, Buchfelder M, Petersenn S, Schulz S (2008) Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1203-1210.
- Plockinger U, Hoffmann U, Geese M, Lupp A, Buchfelder M, Flitsch J, Vajkoczy P, Jakob W, Saeger W, Schulz S, Dohrmann C (2012) DG3173 (somatoprim), a unique somatostatin receptor subtypes 2-, 4- and 5-selective analogue, effectively reduces GH secretion in human GH-secreting pituitary adenomas even in Octreotide non-responsive tumours. *Eur J Endocrinol* 166:223-234.
- Poll F, Doll C, Schulz S (2011) Rapid dephosphorylation of G protein-coupled receptors by protein phosphatase 1beta is required for termination of beta-arrestin-dependent signaling. *J Biol Chem* 286:32931-32936.
- Poll F, Lehmann D, Illing S, Ginj M, Jacobs S, Lupp A, Stumm R, Schulz S (2010) Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of sst2A somatostatin receptor phosphorylation. *Mol Endocrinol* 24:436-446.
- Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69:511-534.
- Prevost G, Lanson M, Thomas F, Veber N, Gonzalez W, Beaupain R, Starzec A, Bogden A (1992) Molecular heterogeneity of somatostatin analogue BIM-23014C receptors in human breast carcinoma cells using the chemical cross-linking assay. *Cancer Res* 52:843-850.
- Ragusa MJ, Allaire M, Nairn AC, Page R, Peti W (2011) Flexibility in the PP1:spinophilin holoenzyme. *FEBS Lett* 585:36-40.

- 
- Rajagopal K, Lefkowitz RJ, Rockman HA (2005) When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest* 115:2971-2974.
- Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-McDonald W, Lam CM, Dewire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ (2011) Quantifying Ligand Bias at Seven-Transmembrane Receptors. *Mol Pharmacol*.
- Reichlin S (1983) Somatostatin. *N Engl J Med* 309:1495-1501.
- Reisine T, Bell GI (1995) Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience* 67:777-790.
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ (2012) Molecular Mechanism of  $\beta$ -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Reiter E, Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17:159-165.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415:206-212.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459:356-363.
- Roth A, Kreienkamp HJ, Meyerhof W, Richter D (1997) Phosphorylation of four amino acid residues in the carboxyl terminus of the rat somatostatin receptor subtype 3 is crucial for its desensitization and internalization. *J Biol Chem* 272:23769-23774.
- Roy J, Cyert MS (2009) Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal* 2:re9.
- Saslow SB, O'Brien MD, Camilleri M, von der Ohe M, Homburger HA, Klee GG, Pitot HC, Rubin J (1997) Octreotide inhibition of flushing and colonic motor dysfunction in carcinoid syndrome. *Am J Gastroenterol* 92:2250-2256.
- Schally AV, Nagy A (1999) Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 141:1-14.
- Schioth HB, Fredriksson R (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 142:94-101.
- Schmid HA, Silva AP (2005) Short- and long-term effects of octreotide and SOM230 on GH, IGF-I, ACTH, corticosterone and ghrelin in rats. *J Endocrinol Invest* 28:28-35.

- 
- Schonbrunn A (2008) Selective agonism in somatostatin receptor signaling and regulation. *Mol Cell Endocrinol* 286:35-39.
- Schulz S, Pauli SU, Schulz S, Handel M, Dietzmann K, Firsching R, Holtt V (2000) Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of somatostatin receptor subtype sst2A. *Clin Cancer Res* 6:1865-1874.
- Serri O, Brazeau P, Kachra Z, Posner B (1992) Octreotide inhibits insulin-like growth factor-I hepatic gene expression in the hypophysectomized rat: evidence for a direct and indirect mechanism of action. *Endocrinology* 130:1816-1821.
- Shenoy SK, Barak LS, Xiao K, Ahn S, Berthouze M, Shukla AK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2007) Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem* 282:29549-29562.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281:1261-1273.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2011) beta-arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*.
- Shenoy SK, Modi AS, Shukla AK, Xiao K, Berthouze M, Ahn S, Wilkinson KD, Miller WE, Lefkowitz RJ (2009) Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6650-6655.
- Shimon I, Rubinek T, Hadani M, Alhadef N (2004) PTR-3173 (somatoprim), a novel somatostatin analog with affinity for somatostatin receptors 2, 4 and 5 is a potent inhibitor of human GH secretion. *J Endocrinol Invest* 27:721-727.
- Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, Coy DH, Culler MD, Melmed S (1997) Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest* 99:789-798.
- Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2008) Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9988-9993.



- 
- Sibley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K, Lefkowitz RJ (1986) Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9408-9412.
- Spurney RF (2001) Regulation of thromboxane receptor (TP) phosphorylation by protein phosphatase 1 (PP1) and PP2A. *J Pharmacol Exp Ther* 296:592-599.
- Steele FR, Washburn T, Rieger R, O'Tousa JE (1992) *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69:669-676.
- Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ, Inglese J (1994) Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem* 269:27791-27794.
- Stumm RK, Zhou C, Schulz S, Endres M, Kronenberg G, Allen JP, Tulipano G, Holtt V (2004) Somatostatin receptor 2 is activated in cortical neurons and contributes to neurodegeneration after focal ischemia. *J Neurosci* 24:11404-11415.
- Tan CM, Brady AE, Nickols HH, Wang Q, Limbird LE (2004) Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:559-609.
- Tao J, Wang HY, Malbon CC (2003) Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the beta2-adrenergic receptor. *Embo J* 22:6419-6429.
- Tran TM, Friedman J, Baameur F, Knoll BJ, Moore RH, Clark RB (2007) Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Mol Pharmacol* 71:47-60.
- Tran TM, Friedman J, Qunaibi E, Baameur F, Moore RH, Clark RB (2004) Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol Pharmacol* 65:196-206.
- Trejo J, Coughlin SR (1999) The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem* 274:2216-2224.
- Tulipano G, Schulz S (2007) Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 156 Suppl 1:S3-11.

- 
- Tulipano G, Stumm R, Pfeiffer M, Kreienkamp HJ, Holtt V, Schulz S (2004) Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem* 279:21374-21382.
- van der Hoek J, Lamberts SW, Hofland LJ (2004) The role of somatostatin analogs in Cushing's disease. *Pituitary* 7:257-264.
- Vasudevan NT, Mohan ML, Goswami SK, Naga Prasad SV (2011) Regulation of beta-adrenergic receptor function: an emphasis on receptor resensitization. *Cell Cycle* 10:3684-3691.
- Vezzosi D, Bennet A, Courbon F, Caron P (2008) Short- and long-term somatostatin analogue treatment in patients with hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:904-911.
- Vinos J, Jalink K, Hardy RW, Britt SG, Zuker CS (1997) A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science* 277:687-690.
- Violin JD, Lefkowitz RJ (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:416-422.
- Virshup DM, Shenolikar S (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33:537-545.
- von Zastrow M, Kobilka BK (1994) Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem* 269:18448-18452.
- Walters RW, Shukla AK, Kovacs JJ, Violin JD, DeWire SM, Lam CM, Chen JR, Muehlbauer MJ, Whalen EJ, Lefkowitz RJ (2009) beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest* 119:1312-1321.
- Waser B, Cescato R, Liu Q, Kao YJ, Korner M, Christ E, Schonbrunn A, Reubi JC (2012) Phosphorylation of sst2 receptors in neuroendocrine tumors after octreotide treatment of patients. *Am J Pathol* 180:1942-1949.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2:999-1017.
- Wess J (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 80:231-264.
- Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85:1159-1204.

- 
- Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ (2010) Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med*.
- Wise A, Gearing K, Rees S (2002) Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today* 7:235-246.
- Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ (2004) beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8603-8607.
- Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR, 3rd, Lefkowitz RJ (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12011-12016.
- Xiao K, Sun J, Kim J, Rajagopal S, Zhai B, Villen J, Haas W, Kovacs JJ, Shukla AK, Hara MR, Hernandez M, Lachmann A, Zhao S, Lin Y, Cheng Y, Mizuno K, Ma'ayan A, Gygi SP, Lefkowitz RJ (2010) Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15299-15304.
- Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP (1993) Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem* 268:337-341.
- Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG, Ferguson SS (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274:10999-11006.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS (1997) A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* 272:27005-27014.

## 7 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Wörtliches oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde nach besten Willen als solches gekennzeichnet.

Des Weiteren erkläre ich, dass die Hilfe eines Promotionspartners nicht in Anspruch genommen wurde und Dritte im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Andrea Kliewer

Jena, im November 2013

---

## 8 Danksagung

DANKE Lieber Prof. Stefan Schulz. Sie waren natürlich derjenige, der mich zu diesem interessanten Projekt gebracht hat. Ihre vielseitigen anregenden Diskussionen und produktiven Ideen haben maßgeblich zum Gelingen des Projektes beigetragen. Steht's haben sie sich für das Projekt und die Ergebnisse mit dem netten Spruch „und klappt's“ interessiert. Sie gaben mir in diesen Jahren immer viele Impulse, ließen mir aber auch die Freiheit, um kreativ denken und arbeiten zu können. Sie haben mich gefordert und gefördert. Dafür danke ich ihnen genauso wie für ihre stetige Unterstützung und die offene Bürotür.

DANKE Meinen Gutachter – Prof. Frank-Dietmar Böhmer und Prof. Günter Stalla - für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Bewertung meiner Arbeit.

DANKE Lieber Flo für die Betreuung in den ersten anderthalb Jahren. Deine sachkundigen und wertvollen Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung von Experimenten, sowie die Ideen und konstruktiven Gespräche trugen zum Erfolg der Arbeit bei.

DANKE Euch Kollegen der AG Schulz und Stumm. Ihr habt oft den Labor-Alltag aufgelockert und wir hatten viel Spaß bei gemeinsamen Ausflügen oder abendlichen „Besprechungen“ außerhalb der Laborräume.

DANKE Liebe Heidrun und Lieber Andreas, für die angenehme und witzige Arbeitsatmosphäre im Labor und die gemeinsamen auch nicht wissenschaftlichen Diskussionen und Ausflüge. Unsere allwöchentlichen Arbeitsbesprechungen habe ich steht's sehr genossen. Besonders dir, Heidrun, möchte ich danken für die Hilfe und deinen Ehrgeiz bei den oft kniffligen Experimenten.

DANKE Liebe Mädels: Wiebke und Elke. Durch euch sind so manche stressige Tage, unangenehme Ergebnisse und Nachrichten nicht nur ertragbar, sondern sogar mit einem lächeln zu bewältigen gewesen.

DANKE Meinen lieben Eltern. Ihr habt mir das Vertrauen gegeben, meinen Weg zu finden und habt mich dabei immer unterstützt. Ja, ich hatte stets das schöne Gefühl, ihr interessiert euch für meine Arbeit und habt mir auch in mancher schwierigen Situation beigestanden.

DANKE Meiner Schwestern Katja die so mache spontane Stimmung aushalten musste und immer da war wenn ich sie gebraucht habe.

DANKE Dir, mein lieber Martin. Für alles. Ohne Dich wäre ich jetzt nicht da wo ich bin. Ohne deine Geduld und deinen Zuspruch wäre ich manchmal fast verzweifelt, ohne deine Gelassenheit hätte ich manches verbissener gesehen. Danke für Rat und Tat zu jeder Tages- und Nachtzeit. Danke, Martin, Du bist unersetzlich!

## 9 Wissenschaftlicher Beitrag

### Publikationen

Falko Nagel, Christian Doll, Florian Pöll, Andrea Kliewer, Helmut Schröder and Stefan Schulz "Structural Determinants of Agonist-Selective Signaling at the sst2A Somatostatin Receptor" *Molecular Endocrinology* 2011 May; 25(5): 859-66

Andrea Kliewer, Anika Mann, Aline Petrich, Florian Pöll and Stefan Schulz "A transplantable phosphorylation probe for direct assessment of G protein-coupled receptor activation. Pharmacological characterization of novel multireceptor somatostatin analogs" *PLoS ONE* 2012;7(6):e39458

Aline Petrich, Anika Mann, Andrea Kliewer, Falko Nagel, Anne Strigli, Jan Carlo Märtens, Florian Pöll, Stefan Schulz "Phosphorylation of threonine 333 regulates trafficking of the human sst5 somatostatin receptor" *Mol Endocrinol* 2013 Apr;27(4):671-82

Andreas Lehmann, Andrea Kliewer, Falko Nagel and Stefan Schulz "Multi-site phosphorylation regulates internalization and desensitization of the human sst2 somatostatin receptor" *Mol and Cell Endocrinol* (in revision)

Stefan Schulz, Andreas Lehmann, Andrea Kliewer, Falko Nagel "IUPHAR REVIEW: Fine-tuning Somatostatin Receptor Signaling by Agonist-Selective Phosphorylation and Dephosphorylation" *Br J Pharmacol* (in revision)

Andrea Kliewer, Stefan Schulz "Differential Regulation Of Somatostatin Receptor Dephosphorylation By  $\beta$ -Arrestin1 and  $\beta$ -Arrestin2" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (in revision)

---

Andreas Lehmann, Aline Petrich, Andrea Kliewer, Falko Nagel and Stefan Schulz

"The Carboxyl-Terminus Controls the Differential Dephosphorylation of Somatostatin Receptor by Proetin Phosphatase 1 Isoforms" *PLoS ONE* (in revision)

Andrea Kliewer and Stefan Schulz "Review: Somatostatin Dephosphorylation"

(Manuskript)

### Poster

Andrea Kliewer, Anika Mann, Florian Pöll and Stefan Schulz "In vitro characterization of novel pan-somatostatin analogs" *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Frankfurt, Deutschland, März 2011

Andrea Kliewer, Anika Mann, Aline Petrich, Florian Pöll and Stefan Schulz "A transplantable phosphorylation probe for direct assessment of G protein-coupled receptor activation. Pharmacological characterization of novel multireceptor somatostatin analogs" *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Dresden, Deutschland, März 2012 und *Meeting of the Signal Transduktion Society*, Weimar, Deutschland, Oktober 2012

Andrea Kliewer and Stefan Schulz "Differential roles of  $\beta$ -arrestin1 and 2 in sst2 somatostatin receptor dephosphorylation" *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*, Halle, Deutschland, März 2013

Andrea Kliewer and Stefan Schulz "Differential roles of  $\beta$ -arrestin1 and 2 in sst2 somatostatin receptor dephosphorylation" *Gordon Research Conference "Molecular Pharmacology"*, Lucca, Italien, April 2013



---

Andrea Kliewer, Aline Petrich, Florian Pöll and Stefan Schulz „ Differential Regulation of PP1-mediated Somatostatin Receptor Dephosphorylation by  $\beta$ -Arrestin1 and 2,, *Spetses Summer School 2013*, Spetses Island, Griechenland, September 2013

---

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Andrea Kliewer  
Geburtsdaten: 14.01.1984  
Geburtsort: Jena  
Adresse: Friedrich-Schelling-Str. 6, 07745 Jena  
e-Mail: Andrea.Kliewer@med.uni-jena.de

### Schulbildung

1990 – 1993 7. Grundschule Jena  
1993 – 2001 Freie Waldorf Schule Jena  
2001 – 2003 **Freie Waldorf Schule Weimar**  
Abschluss: Abitur

### Berufsausbildung

2003 – 2005: **Ausbildung** zur staatlich geprüften Rettungsassistentin

### Studium

10/2005 – 08/2010 **Studium der Biologie** an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
10/2009 – 07/2010 **Diplomarbeit** am Leibniz-Institut für Altersforschung, Fritz-Lipmann Institut Jena: „Untersuchungen zur Rolle von CD44 in der Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen“  
Betreuer: Prof. Dr. Jan Tuckermann

---

**Berufstätigkeit**

seit 09/2010

**Doktorand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena:** „Mechanismen der agonist-selektiven Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Somatostatin-Rezeptoren“

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Schulz

**Auslandsaufenthalt**

07/2008 – 10/2008

Inflammatory Bowel Disease Center, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA