

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Technischen Universität München

## Interaktion und Gewebeverteilung von Komponenten des cGMP-Kinase Signalweges

**Angela Geiselhöringer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann  
2. apl.-Prof. Dr. J. Graw  
3. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 27.08.2002 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt am 22.10.2002 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

<b>A. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
A.1. Signaltransduktion durch NO.....	1
A.2. Vielfalt und Struktur der cGMP-Kinasen .....	2
A.3. Wirkungsmechanismen der cGMP-Kinasen .....	3
A.4. Identifizierung, Struktur und Funktion von IRAG .....	6
A.5. Ziele dieser Arbeit .....	7
<b>B. Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
B.1. Organismen und Plasmide.....	8
B.2. Anzucht und Stammhaltung .....	9
B.2.1. Nährmedien .....	9
B.2.2. Hemmstoffe und Medienzusätze .....	10
B.2.3. Kultivierung und Stammhaltung .....	11
B.3. Molekularbiologische Methoden.....	11
B.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS.....	11
B.3.2. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten.....	11
B.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	12
B.3.4. Enzymatische Modifikation von DNS .....	12
B.3.5. Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten.....	13
B.3.6. Agarose-Gelelektrophorese .....	14
B.3.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	14
B.3.8. Sequenzierung von DNS .....	15
B.3.9. Transfer von DNS in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	16
B.4. Proteinbiochemische Methoden .....	19
B.4.1. Expression von Proteinen.....	19
B.4.2. Reinigung bakteriell exprimierter Proteine .....	20
B.4.3. Herstellung und Reinigung spezifischer Antiseren in Kaninchen.....	21
B.4.4. Proteinbestimmung nach Bradford.....	22

B.4.5.	Konzentrierung von Proteinen aus Lösungen .....	23
B.4.6.	Analyse und Detektion von Proteinen.....	23
B.4.7.	cGMP-Agarose-Affinitätschromatographie, Co-Immunpräzipitation und Phosphorylierung.....	26
<b>B.5.</b>	<b>Kultur eukaryontischer Zellen.....</b>	<b>27</b>
B.5.1.	Verwendete Zelllinie .....	27
B.5.2.	Zellkultur .....	27
B.5.3.	Transfektion von COS-7 Zellen .....	28
<b>B.6.</b>	<b>Zwei-Hybrid System.....</b>	<b>29</b>
<b>B.7.</b>	<b>Isolierung und Präparation von Mausgeweben.....</b>	<b>31</b>
B.7.1.	Gewinnung von Protein aus Mausgeweben .....	31
B.7.2.	Organpräparation für die Immunhistochemie .....	31
<b>B.8.</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>32</b>
B.8.1.	Immunhistologische Färbung mittels Peroxidase.....	32
B.8.2.	Immunhistologische Färbung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper .....	34
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
<b>C.1.</b>	<b>Generierung eines spezifischen IRAG-Antikörpers.....</b>	<b>35</b>
<b>C.2.</b>	<b>Gewebsexpression von IRAG und der cGMP-Kinase I.....</b>	<b>38</b>
C.2.1.	Immunoblotanalyse von IRAG .....	38
C.2.2.	Immunoblotanalyse der cGKI .....	40
<b>C.3.</b>	<b>Lokalisierung von IRAG und der cGKI im Gewebe .....</b>	<b>43</b>
C.3.1.	Lichtmikroskopische Untersuchung.....	43
C.3.2.	Konfokale Laser-Scan Mikroskopie.....	53
<b>C.4.</b>	<b>Interaktion von IRAG mit der cGMP-Kinase.....</b>	<b>55</b>
C.4.1.	Spezifische Interaktion von IRAG mit cGKI $\beta$ im Zwei-Hybrid System.....	55
C.4.2.	Charakterisierung der Interaktion zwischen IRAG und cGKI $\beta$ .....	61
<b>D.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
<b>D.1.</b>	<b>Physiologische Bedeutung der Lokalisierung von IRAG und der cGKI im Gewebe.....</b>	<b>64</b>
<b>D.2.</b>	<b>Bedeutung der intrazellulären Proteinlokalisierung bezüglich der Spezifität des NO/cGMP-Signalweges .....</b>	<b>68</b>
<b>D.3.</b>	<b>Interaktion von IRAG mit der cGKI.....</b>	<b>69</b>
<b>D.4.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>72</b>

---

<b>E.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>F.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>75</b>
<b>F.1.</b>	<b>Primer .....</b>	<b>75</b>
<b>F.2.</b>	<b>Restriktionsenzyme .....</b>	<b>77</b>
<b>F.3.</b>	<b>Verwendete Antikörper .....</b>	<b>78</b>
<b>F.4.</b>	<b>Firmenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>F.5.</b>	<b>Geräteverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>G.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>G.1.</b>	<b>Zitierte Veröffentlichungen .....</b>	<b>81</b>
<b>G.2.</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>88</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1:	NO-Signaltransduktionsweg.....	2
Abb. A-2:	Schematische Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.....	3
Abb. A-3:	Regulation der glatten Muskulatur über den Kalzium-abhängigen und -unabhängigen Mechanismus.....	4
Abb. A-4	Wirkungsmechanismen der cGKI.....	6
Abb. A-5	Autoradiogramm des trimeren IRAG-cGKI $\beta$ -IP <sub>3</sub> RI Komplexes und schematische Struktur von IRAG.....	7
Abb. B-1:	Schema des Zwei-Hybrid Systems.....	30
Abb. C-1:	Bakterielle Expression von IRAG <sub>SD</sub> .....	35
Abb. C-2:	Spezifität und Sensitivität des IRAG-Antikörpers.....	36
Abb. C-3:	Spezifität des gereinigten IRAG-Antikörpers im Gewebe.....	37
Abb. C-4:	Proteinexpression von IRAG in verschiedenen Geweben.....	39
Abb. C-5:	Immunoblotanalyse nach Präparation der glatten Muskelschicht des Dünndarms.....	40
Abb. C-6:	Proteinexpression der cGKI in verschiedenen Geweben.....	41
Abb. C-7:	Expression von IRAG und cGKI in der Aorta.....	44
Abb. C-8:	Wandschichten des Magen-Darmkanals in schematischer Darstellung.....	45
Abb. C-9:	Lokalisierung der Proteine IRAG und cGKI im Magen.....	46
Abb. C-10:	Expression von IRAG und der cGKI im Darm.....	48
Abb. C-11:	Lokalisierung der Proteine IRAG und cGKI im Uterus.....	49
Abb. C-12:	Immunhistochemische Lokalisierung von IRAG und der cGKI in der Trachea.....	50
Abb. C-13:	Expression von cGKI $\alpha$ in Purkinjezellen des Cerebellums.....	51
Abb. C-14:	Lokalisierung von IRAG und cGKI in der Aorta.....	53
Abb. C-15:	Immunhistochemische Lokalisierung von IRAG und cGKI im Darm.....	54
Abb. C-16:	IRAG-Konstrukte, die als Köder in der Zwei-Hybrid Analyse verwendet wurden.....	56
Abb. C-17:	cGK-Konstrukte und deren Interaktion mit IRAG in Hefezellen.....	59
Abb. C-18:	Interaktion von IRAG mit der cGKI $\beta$ , cGKI $\alpha$ und der cGKII in Hefen.....	60
Abb. C-19:	Position und Aminosäuresequenzen der Interaktionsstellen von IRAG und cGKI $\beta$ .....	61
Abb. C-20:	Phosphorylierung und Co-Präzipitation von IRAG durch cGKI $\beta$ .....	62
Abb. C-21:	Assoziation der cGKI $\beta$ mit dem IP <sub>3</sub> RI.....	63
Abb. D-1:	Spezifische Interaktion von IRAG mit der cGKI $\beta$ in der Zelle.....	70

## Tabellenverzeichnis

Tabelle B-1:	Verwendete Organismen.....	8
Tabelle B-2:	Verwendete Plasmide.....	8
Tabelle B-3:	Hemmstoffe und Medienzusätze.....	10
Tabelle C-1:	Zusammenfassung der IRAG und cGKI Proteinexpression in verschiedenen Geweben.....	42
Tabelle C-2:	Zusammenfassung der IRAG und cGKI Proteinexpression in der Immunhistochemie.....	52
Tabelle C-3:	Basischarakterisierung der Köderproteine.....	57
Tabelle F-1:	Primer, die für die Generierung der verschiedenen pEG202-LexA/ IRAG Konstrukte verwendet wurden.....	75
Tabelle F-2:	Primer, die für die Generierung von „Preys“ verwendet wurden.....	76
Tabelle F-3:	Primer, die zur Sequenzierung verschiedener Konstrukte und zur Amplifikation von IRAG für die Proteinexpression verwendet wurden..	77
Tabelle F-4:	Verwendete Restriktionsenzyme.....	77
Tabelle F-5:	Verwendete Antikörper.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>ABC</b>	Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase Komplex	<b>Leu</b>	Leucin
<b>AG</b>	Antigen	<b>LiAc</b>	Lithiumacetat
<b>AK</b>	Antikörper	<b>LM</b>	longitudinale Muskulatur
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>M, mM</b>	Mol, Millimol
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase	<b>MCS</b>	Multiple Klonierungsstelle
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat	<b>Mes</b>	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>mg</b>	Milligramm
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>MG od. MW</b>	Molekulargewicht
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat	<b>min</b>	Minute
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>MIP</b>	mikrosomale Membranen des bovinen Trachealmuskels
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin	<b>ml</b>	Milliliter
<b>cDNS</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>cGK</b>	cGMP-abhängige Proteinkinase	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosin-Monophosphat	<b>µM</b>	Mikromol
<b>CM</b>	zirkuläre Muskulatur	<b>MP</b>	myenterischer Plexus
<b>Cy3</b>	Indocarbocyanin	<b>NBT</b>	Nitroblautetrazolium
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin	<b>NGS</b>	Normales Ziegen Serum
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintriphosphat	<b>NO</b>	Nitric Oxide
<b>dCTP</b>	Desoxycytosintriphosphat	<b>NOS</b>	Nitric Oxide Synthase
<b>dGTP</b>	Desoxyguanosintriphosphat	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	<b>OT</b>	Objekträger
<b>DMF</b>	Dimethylformamid	<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PAS</b>	Protein A Sepharose
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>PBS</b>	Phosphate buffered Saline
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>ddNTP</b>	Didesoxynukleosidtriphosphat	<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>PI</b>	Proteaseinhibitoren
<b>dTTP</b>	Desoxythymidintriphosphat	<b>PMSF</b>	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
<b>EDTA</b>	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	<b>POD</b>	Peroxidase
<b>ENS</b>	enterisches Nervensystem	<b>pro</b>	Promotor
<b>ERG</b>	Eppendorf-Reagenzgefäß	<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>EtOH</b>	Ethanol	<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat	<b>SAP</b>	Shrimps Alkaline Phosphatase
<b>g</b>	Gravitätskonstante oder Gramm	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Gal</b>	Galaktose	<b>sec</b>	Sekunde
<b>sGC</b>	lösliche Guanylylzyklase	<b>SS-DNS</b>	Single-Stranded Carrier DNA
<b>Glu</b>	Glukose	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat	<b>TBST</b>	Tris-gepufferte Saline Tween
<b>h</b>	Stunde	<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>His</b>	Histidin	<b>TEMED</b>	N,N,N',N',Tetramethyl-ethylendiamin
<b>HT</b>	Hypoxanthin, Thymidin	<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
<b>IgG</b>	Immunglobulin G	<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5,-trisphosphat	<b>U</b>	Unit, Einheit
<b>IP<sub>3</sub>RI</b>	Inositol-1,4,5,-trisphosphat Rezeptor Typ I	<b>üN</b>	über Nacht
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid	<b>Ura</b>	Uracil
<b>IRAG</b>	IP <sub>3</sub> -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>kb</b>	Kilobasen	<b>WT</b>	Wildtyp
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton	<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
<b>KP-Puffer</b>	Kaliumphosphatpuffer (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )		
<b>l</b>	Liter		

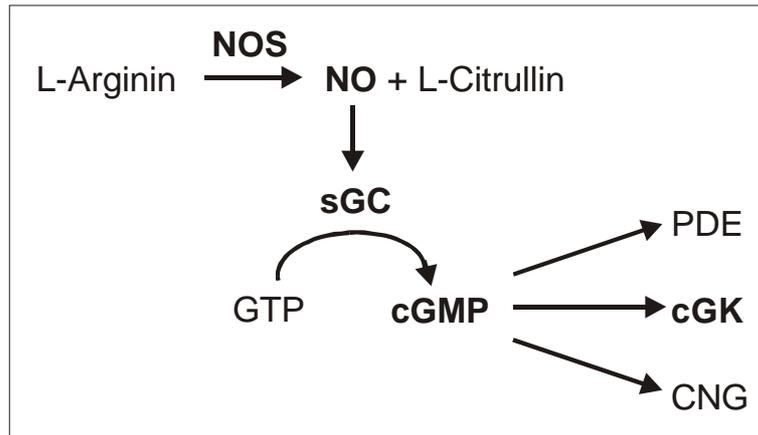
## A. Einleitung

### A.1. Signaltransduktion durch NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiger Botenstoff, der eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen spielt. Sein Wirkungsspektrum umfasst verschiedene Mechanismen, die u.a. bei der Regulation des Blutdrucks, der Thrombozytenaktivität, der Sinneswahrnehmung und eventuell für Lernen und Gedächtnis beteiligt sind. NO fungiert auch als Neurotransmitter in Neuronen. Da NO in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt, hat es ebenfalls bei der Immunantwort eine große Bedeutung. Endothelzellen, Thrombozyten, Makrophagen und Nervenzellen können NO selber synthetisieren. Als Substrat für die NO-Synthese fungiert der terminale Stickstoff der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin. Dieser Stickstoff wird oxidiert und es entsteht NO und Citrullin (Loscalzo & Welch 1995; Übersicht: Ignarro et al., 1999). Katalysiert wird diese Reaktion von der Familie der NO-Synthasen (NOS), in der man zwei Isoformen unterscheidet: die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die hauptsächlich in Makrophagen und Neutrophilen gefunden wird und Kalzium-unabhängig ist, und die konstitutive Form, die in Endothelzellen und Thrombozyten (endotheliale oder eNOS) und in Nervenzellen (neuronale oder nNOS) vorkommt und Kalzium-abhängig ist (Förstermann et al., 1991). Das synthetisierte NO kann sehr leicht durch die Zellmembran zu einer Zielzelle diffundieren, dort die lösliche Guanylylzyklase (sGC) aktivieren, die aus GTP zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) bildet, zur ADP-Ribosylierung und zur Entstehung reaktiver Sauerstoff-Radikale (Peroxide) führen.

Der sekundäre Botenstoff cGMP wird auch durch die partikuläre Guanylylzyklase (pGC) generiert, deren Aktivität unter der Kontrolle von natriuretischen Peptiden steht. Durch cGMP werden verschiedene Enzyme reguliert (s. Abb. A-1):

- 1) es aktiviert oder hemmt cAMP-spezifische Phosphodiesterasen (PDE) (Sonnenburg & Beavo, 1994), wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteuert wird;
- 2) im olfaktorischen System oder in der Retina werden zyklisches-Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG) geöffnet (Biel et al., 1998), die für die Signalverarbeitung des Riech- und Sehprozesses verantwortlich sind;
- 3) es aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) (Pfeifer et al., 1999; Ruth et al., 1999; Hofmann et al., 2000), die u.a. die Thrombozytenaggregation hemmen (Horstrup et al., 1994; Massberg et al., 1999), zur Relaxation des glatten Muskels führen (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000) und möglicherweise eine Rolle für das Gedächtnis spielen, z.B. für LTP (long term potentiation) im Hippocampus oder LTD (long term depression) im Kleinhirn (Kleppisch et al., 1999; Wu et al., 1998).



**Abbildung A-1: NO-Signaltransduktionsweg.** NO wird aus L-Arginin gebildet, wobei die NO-Synthase (NOS) die Reaktion katalysiert. NO aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), die die Bildung von cGMP vermittelt. cGMP aktiviert anschließend verschiedene Effektoren, z.B. die cGK. Weitere Erklärungen siehe Text.

## A.2. Vielfalt und Struktur der cGMP-Kinasen

In Säugetieren existieren zwei verschiedene Gene für cGKs. Ein Gen kodiert die lösliche cGKI, das zweite die membrangebundene cGKII (Abb. A-2) (Wernet et al., 1989; Sandberg et al., 1989). Es handelt sich um Homodimere, deren monomere Untereinheiten ein Molekulargewicht von 76-78 kDa (cGKI) bzw. von 87 kDa (cGKII) aufweisen. Sie gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die ihr Substrat spezifisch an den Aminosäuren Serin und/oder Threonin phosphorylieren, und sie besitzen eine regulatorische und katalytische Domäne. Die regulatorische Domäne setzt sich aus einem Aminoterminus, der in eine Isoleucin/Leucinzipper-Region und eine Linker-Region unterteilt werden kann, und zwei cGMP-Bindungstaschen zusammen. Der Aminoterminus besitzt drei Funktionen:

- 1) Dimerisierung durch die Isoleucin/Leucinzipper-Region;
- 2) Autoinhibierung der katalytischen Domäne bei Abwesenheit von cGMP;
- 3) intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms (Atkinson et al., 1991; Hofmann et al., 1992).

Durch alternatives Spleißen des Aminoterminus (ersten 90-100 Aminosäuren) der cGKI entstehen die beiden Isoformen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  (Wernet et al., 1989). Die katalytische Domäne enthält eine ATP- und Substratbindungsstelle, letztere transferiert das  $\gamma$ -Phosphat vom ATP auf ein Serin/Threonin des Substrates (Abb. A-2).

Das cGKI $\alpha$  Isoenzym wird hauptsächlich in Lunge, Herz und Kleinhirn exprimiert, das cGKI $\beta$  Isoenzym überwiegt in glattmuskulären Geweben wie z.B. Aorta, Blutgefäße, Uterus und Intestinum sowie in Thrombozyten und Hippocampus (Lincoln et al., 1988; Keilbach et al., 1992b; Geiselhöringer et al., 2001). cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  sind lösliche Proteine, die über ihre Aminotermini mit verschiedenen Proteinen interagieren (Cornwell et al., 1991; Surks et al., 1999; Yuasa et al., 1999 und 2000; Huber et al., 2000). Die cGKII

wird im Thalamus, Bulbus olfactorius, Cortex, in Chondrozyten, in der Niere und im Bürstensaumepithel des Dünndarms exprimiert (El-Husseini et al., 1995; Markert et al., 1995; Pfeifer et al., 1996; Gambaryan et al., 1996). Die cGKII wird durch Myristoylierung in der Plasmamembran verankert. Nur die membrangebundene cGKII kann den CFTR Chloridkanal (zystische Fibrose Transmembran-Leitfähigkeitsregulator) phosphorylieren (Vaandrager et al., 1998).

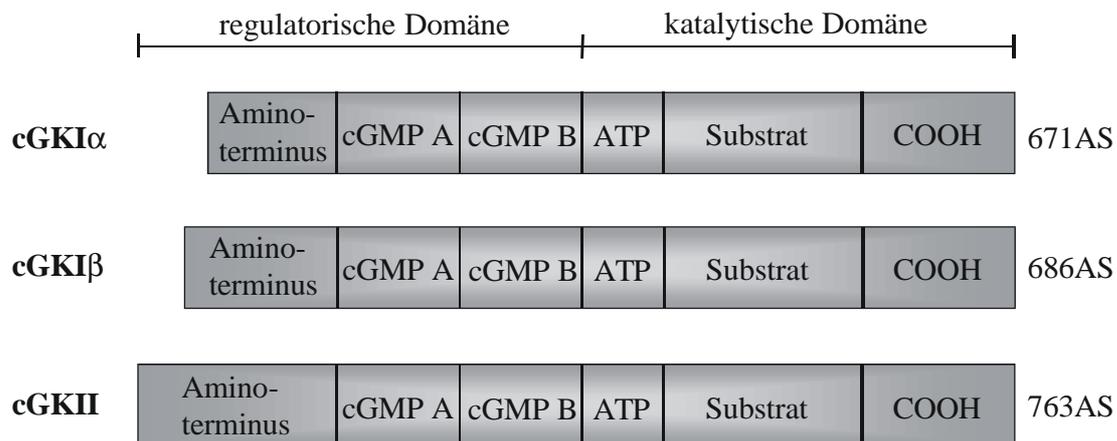


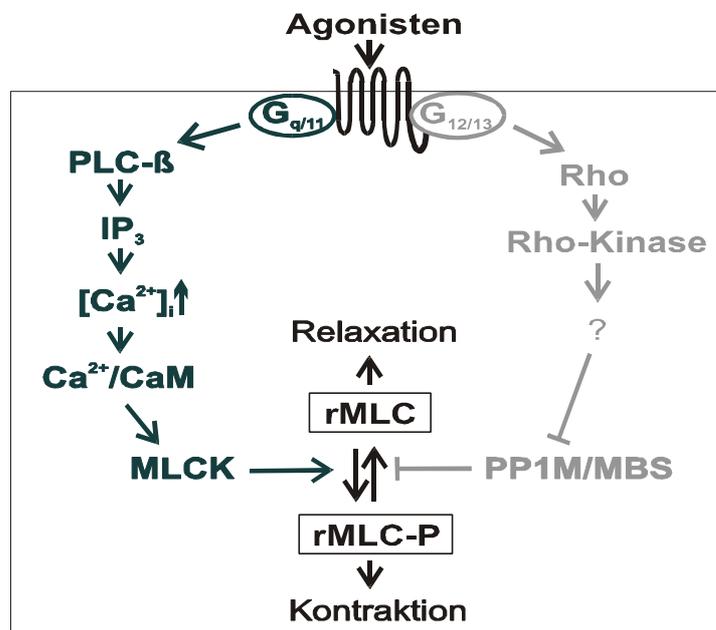
Abbildung A-2: Schematische Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen.

### A.3. Wirkungsmechanismen der cGMP-Kinasen

Die cGKs regulieren eine Vielzahl physiologischer Mechanismen. Die cGKII ist an der Regulation der intestinalen Chlorid/Wasser-Sekretion durch die Phosphorylierung des CFTR Chloridkanals (Vaandrager et al., 1997; Pfeifer et al., 1996), der enchondralen Ossifikation des Knochenwachstums (Pfeifer et al., 1996) und der Reninfreisetzung in der Niere (Wagner et al., 1998) durch die Phosphorylierung von noch unbekannt Proteinen beteiligt. Durch die cGKI wird u.a. die Proliferation (Yu et al., 1997; Komalavilas et al., 1999) und die Relaxation (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000) des glatten Muskels reguliert und die Aggregation von Thrombozyten gehemmt (Horstrup et al., 1994; Massberg et al., 1999).

Die Kontraktilität glatter Muskelzellen ist in vielen Organen für deren Physiologie verantwortlich. In Blutgefäßen spielen sie eine wichtige Rolle für den Gefäßtonus. Treten Defekte in der Relaxation der Blutgefäße auf, so kann es zu Gefäßkrankheiten führen, z.B. Hypertonie, Arteriosklerose oder koronarer Herzerkrankung. Wie wichtig die NO/cGMP/cGKI-Signaltransduktion für die Regulation des glatten Muskeltonus ist, wird dadurch gezeigt, dass *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäuse unter Bluthochdruck leiden. Zusätzlich haben diese Mäuse eine Pylorus-Stenose und eine verzögerte Magen-Darm-Passage (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Die Kontraktilität des glatten Muskels wird durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration und durch Modulation der Kalziumsensitivität der kontraktilen

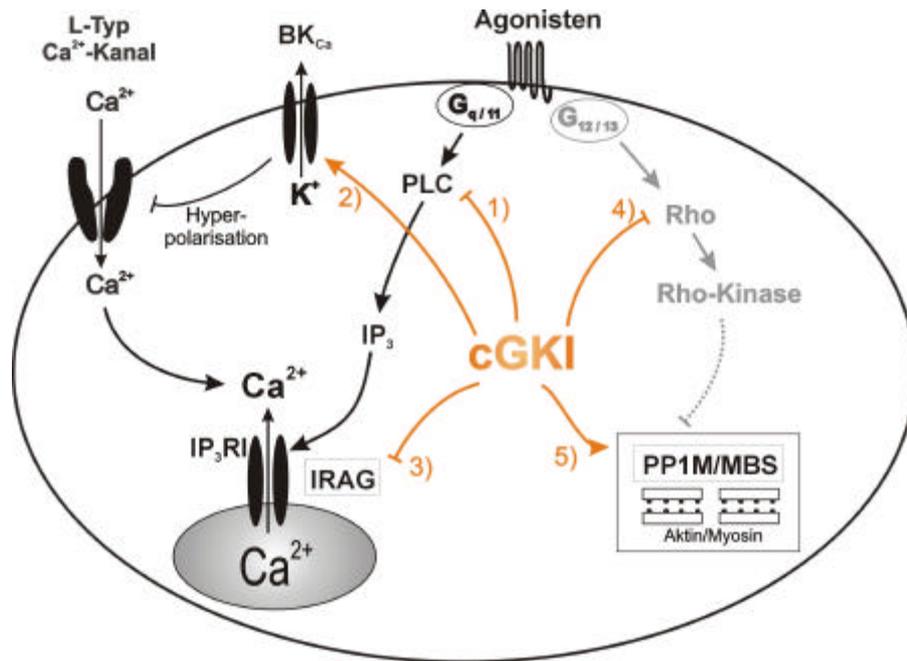
Elemente reguliert (Somlyo & Somlyo, 2000; Berridge et al., 2000; Pfitzer, 2001). Verschiedene Agonisten, z.B. Noradrenalin, Acetylcholin und Angiotensin II aktivieren über GTP-bindende Proteine ( $G_q$  oder  $G_{11}$ ) die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ), wodurch es zur Synthese von Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) kommt.  $IP_3$  stimuliert seinerseits die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Aktivierung des  $IP_3$ -Rezeptors Typ I ( $IP_3RI$ ), welcher ein Kalziumkanal des ER ist. Außerdem strömt extrazelluläres Kalzium durch L-Typ Kalziumkanäle in die Zelle, das an Calmodulin bindet und daraufhin die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert, die die regulatorische MLC phosphoryliert (rMLC-P). Daraufhin kontrahiert der glatte Muskel (Abb. A-3). Als Folge der sinkenden Kalziumkonzentration wird die rMLC-P von der Myosinphosphatase (PP1M) dephosphoryliert, der glatte Muskel entspannt sich wieder. Zusätzlich kann die Kontraktibilität des glatten Muskels Kalzium-unabhängig durch eine Veränderung der Kalziumsensitivität des Aktin/Myosin-Gerüsts reguliert werden (Lee et al., 1997). Agonisten-stimulierte Rezeptoren aktivieren weitere G-Proteine ( $G_{12}$  oder  $G_{13}$ ), wodurch das kleine GTP-bindende Protein Rho die Rho-Kinase aktiviert. Es folgt eine noch ungeklärte Kaskade, die mit der Inhibierung der PP1M durch Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-bindenden Untereinheit (MBS) endet. Da die MLCK von diesem Mechanismus nicht beeinflusst wird, steigt die Konzentration der rMLC-P, der Muskel kontrahiert (Abb. A-3).



**Abbildung A-3: Regulation der glatten Muskulatur über den Kalzium-abhängigen** (dunkelgrüne Beschriftung) **und –unabhängigen** (graue Beschriftung) **Mechanismus.** Calmodulin (CaM), Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ), Myosinkinase (MLCK), Myosinphosphatase (PP1M), regulatorische Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase (MBS), regulatorische Myosin leichte Kette (rMLC), Phospholipase C (PLC); Agonisten sind z.B. Noradrenalin oder Angiotensin II; weitere Erklärungen siehe Text.

Die cGKI ist an der Relaxation des glatten Muskels sowohl durch die Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels als auch durch die Veränderung der Kalziumsensitivität der kontraktilen Elemente beteiligt, indem sie ihre Substratproteine phosphoryliert und dadurch deren Aktivität moduliert. Derzeit sind mehrere Mechanismen für ihre Wirkung in der Diskussion (Abb. A-4):

- 1) die cGKI reguliert die  $IP_3$ -Synthese durch die Phosphorylierung der Phospholipase  $C\beta_3$  (Ruth et al., 1993; Murthy & Makhlof, 1998; Xia et al., 2001);
- 2) die Phosphorylierung des Kalzium-aktivierten Kaliumkanals ( $BK_{Ca}$ ) erhöht dessen Öffnungswahrscheinlichkeit, es folgt eine Hyperpolarisation der Zelle. Dadurch werden spannungsabhängige Kalziumkanäle (z.B. L-Typ Kalziumkanäle) geschlossen und folglich sinkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999; Swayze & Braun, 2001);
- 3) die Phosphorylierung von IRAG ( $IP_3$ -Rezeptor assoziiertes cGKI Substrat) inhibiert die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. IRAG wurde erst kürzlich als cGKI-Substrat identifiziert (Schlossmann et al., 2000) und wird unter A.4. genauer beschrieben;
- 4) möglicherweise wird auch Rho (kleines GTP-bindendes Protein) von der cGKI phosphoryliert, wodurch es nicht mehr zu einem GDP/GTP-Austausch kommt und die Rho-Kinase inaktiv bleibt. PP1M bleibt dadurch aktiv, was eine reduzierte Sensitivität des kontraktilen Apparates zum intrazellulären Kalzium zur Folge hat (Somlyo & Somlyo, 2000; Pfitzer, 2001);
- 5) die cGKI $\alpha$  Isoform interagiert mit der MBS, der regulatorischen Untereinheit der PP1M (Surks et al., 1999; Nakamura et al., 1999), jedoch konnte noch keine direkte Veränderung der PP1M-Aktivität durch cGKI $\alpha$ -vermittelte MBS-Phosphorylierung festgestellt werden.



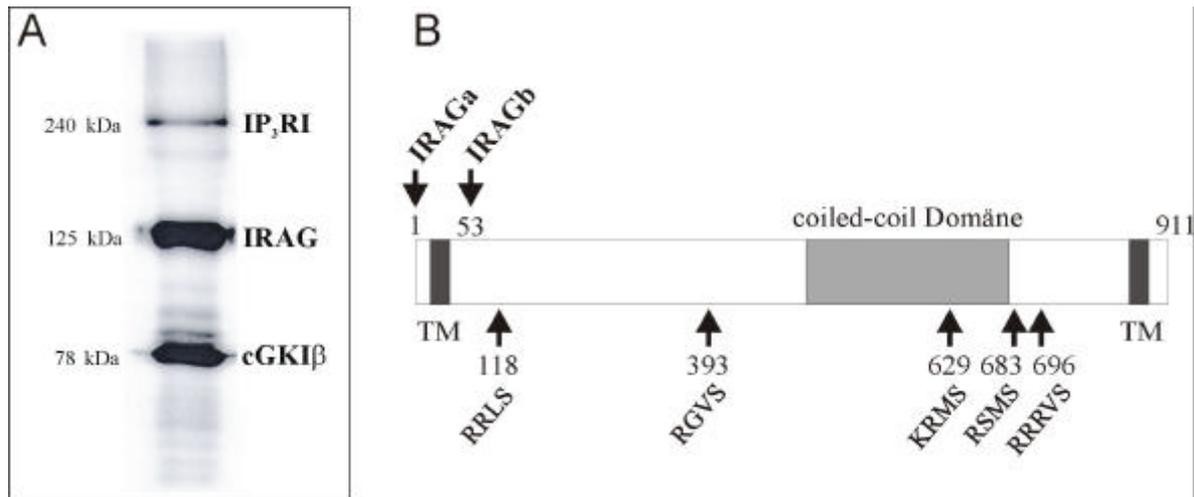
**Abbildung A-4: Wirkungsmechanismen der cGKI (orange Pfeile).** Die cGKI spielt bei der Regulation des glatten Muskeltonus sowohl durch Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration, als auch durch Kalzium-Desensibilisierung (graue Beschriftung) eine wichtige Rolle. Erläuterungen siehe Text.

#### A.4. Identifizierung, Struktur und Funktion von IRAG

Schon vor längerer Zeit wurde beschrieben, dass in Membranen des glatten Muskels Substratproteine der cGK zu finden sind (Casnellie et al., 1974). Erst vor kurzem wurde ein neues 125 kDa cGKI-Substratprotein identifiziert, das als IRAG (IP<sub>3</sub>-Rezeptor assoziiertes cGK Substrat) bezeichnet wurde (Schlossmann et al., 2000). Es konnte aus den mikrosomalen Membranen des bovinen Trachealmuskels mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. IRAG wird durch die cGKI phosphoryliert und liegt als trimere Komplex mit dem IP<sub>3</sub>RI und der cGKIβ im glatten Muskel vor (Abb. A-5).

Es gibt zwei Isoformen von IRAG, IRAGa und IRAGb, die sich nur durch eine zusätzliche putative N-terminale Transmembrandomäne des IRAGa unterscheiden. Beide Isoformen verfügen über eine C-terminale Transmembrandomäne (TM) (die wahrscheinlich der Verankerung in der Membran dient), eine sog. coiled-coil Domäne (die für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sein könnte) und fünf Phosphorylierungsstellen mit Konsensussequenzen für die cGK (Abb. A-5).

Heterolog exprimiertes IRAG (in COS-7 Zellen) zeigte zudem eine perinukleäre Lokalisierung. Alle Daten zusammen ließen vermuten, dass IRAG eine wichtige Rolle als Modulator der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern spielt. Tatsächlich konnte in funktionellen Studien gezeigt werden, dass IRAG die IP<sub>3</sub>-induzierte Kalziumfreisetzung nach Aktivierung der cGKIβ mit 8-pCPT-cGMP in COS-7 Zellen hemmt (Schlossmann et al., 2000). Der genaue Mechanismus, wie IRAG die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum hemmt, ist noch nicht aufgeklärt.



**Abbildung A-5:** A) Autoradiogramm des trimeren Komplexes, bestehend aus IP<sub>3</sub>RI, IRAG und cGKIβ; das jeweilige Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Mikrosomale Membranen der bovinen Rindertrachea wurden solubilisiert, mit einem spezifischen cGKI-AK immunpräzipitiert und anschließend phosphoryliert (Schlossmann et al., 2000). B) Schematische Struktur von IRAG: Aminosäurepositionen und Konsensussequenzen der fünf identifizierten Phosphoserine für die Phosphorylierung durch die cGKIβ sind angegeben. TM, Transmembrandomäne.

## A.5. Ziele dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Proteinexpression von IRAG und der cGKI-Isoformen in verschiedenen Mausgeweben zu untersuchen. Für die Detektion von IRAG existierte nur ein Peptidantikörper, der in Westernblotanalysen relativ unspezifisch war (Schlossmann et al., 2000). Deshalb war es notwendig, gegen IRAG einen spezifischen polyklonalen Antikörper in Kaninchen zu generieren. Das dazu nötige rekombinante IRAG-Protein (Antigen) sollte in Bakterien exprimiert werden. Anschließend sollte mit spezifischen Antikörpern das Vorkommen von IRAG, cGKIα und cGKIβ in vielen verschiedenen Organen (Gehirn, periphere und glattmuskuläre Gewebe) mittels Westernblotanalyse aufgeklärt werden. Um einen Anhaltspunkt möglicher bzw. weiterer Funktionen dieser Proteine in der NO-Signaltransduktion, v.a. für das vor kurzem identifizierte Protein IRAG zu erhalten, sollte auch die Lokalisierung im Gewebe mittels immunhistochemischer Methoden untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war es, die molekularen Wechselwirkungen in dem multimeren Komplex IRAG-cGKI-IP<sub>3</sub>RI zu untersuchen, der in mikrosomalen Membranen des bovinen Trachealmuskels identifiziert wurde (Schlossmann et al., 2000). Anhand einer Zwei-Hybrid Analyse in Hefen sollte die Interaktion von IRAG mit der cGK aufgeklärt und deren Interaktionsstellen identifiziert werden. Zusätzlich sollten die Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen nach *in vivo* Expression in COS-7 Zellen mittels Phosphorylierung und Immunpräzipitation charakterisiert werden.

## B. Material und Methoden

### B.1. Organismen und Plasmide

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Organismen (Tabelle B-1) und Plasmide (Tabelle B-2) mit ihren relevanten Eigenschaften und ihrer Herkunft aufgeführt. Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann und Low (1990).

**Tabelle B-1: Verwendete Organismen.**

Organismus	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φlacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS	F', <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Invitrogen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EGY48	<i>MATα trp1 his3 ura3 6LexA-operator-LEU2</i>	Brent Laboratory <sup>a</sup> Clontech

**Tabelle B-2: Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Selektionsmarker	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pRSET C	Ap <sup>R</sup>	T7pro-RBS-EK(His) <sub>6</sub> -MCS	Proteinexpression	Invitrogen
pcDNA3.1-	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	CMVpro-MCS	Klonierungsvektor	Invitrogen
pBS II KS+	Ap <sup>R</sup>	T3/T7pro-MCS	Klonierungsvektor	Stratagene
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	<i>lacZα</i> (Blau-Weiß-Selektion)	Subklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> -BluntII-TOPO	Km <sup>R</sup>	<i>ccdB</i> (lethales Gen)	Subklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pMT3-cGKIα	Ap <sup>R</sup>	pMT3 (SV40pro-DHFR) mit cGKIα	Proteinexpression; Template für PCR <sup>b</sup>	Ruth et al., 1997
pMT3-cGKIβ	Ap <sup>R</sup>	pMT3 (SV40pro-DHFR) mit cGKIβ	Proteinexpression; Template für PCR <sup>b</sup>	Ruth et al., 1997
pcDNA3.1-IRAGa	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	pcDNA3.1- mit IRAGa	Proteinexpression	Schlossmann et al., 2000
Maxi 21	Ap <sup>R</sup>	pBS II KS+ mit IRAG cDNS	Template für PCR <sup>b</sup>	Schlossmann et al., 2000

pAL1-cGKII	Ap <sup>R</sup>	pAL1 (Derivat von pUC19 mit T3 und T7pro) mit cGKII	Template für PCR <sup>b</sup>	Uhler et al., 1993
pcDNA3-IP <sub>3</sub> RI	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	pcDNA3 mit peripherem IP <sub>3</sub> RI (S1-/S2-)	Proteinexpression; Template für PCR <sup>b</sup>	Kaznachejeva et al., 1998
pCMVI-9-IP <sub>3</sub> RI	Ap <sup>R</sup>	CMVpro; mit neuronalem IP <sub>3</sub> RI (S1-/S2+)	Proteinexpression	Mignery et al., 1990
pEG202*	HIS3, Ap <sup>R</sup>	ADHpro-LexA-MCS	Expression der Köderproteine	Brent Laborat. <sup>a</sup> Clontech
pJG4-5*	TRP1, Ap <sup>R</sup>	GAL1pro-Aktivierungsdomäne der Transkription-HA-Tag	Expression der „Fischproteine“	Brent Laborat. <sup>a</sup> Clontech
pSH18-34*	URA3, Ap <sup>R</sup>	8 LexA Operatoren- <i>lacZ</i>	Reporterplasmid; Indikator der Transkriptionsaktivierung	Brent Laborat. <sup>a</sup> Clontech
pJK101*	URA3, Ap <sup>R</sup>	GAL1pro-LexA Operator- <i>lacZ</i> (konstitutiv aktives <i>lacZ</i> )	Bestätigung der Bindung des Köderproteins an den LexA Operator	Brent Laborat. <sup>a</sup> Clontech
pRFHM1*	HIS3, Ap <sup>R</sup>	ADHpro-LexA-Bicoid Domäne	Negativkontrolle für die Aktivierung der Transkription	Brent Laborat. <sup>a</sup> Clontech
pSH17-4*	HIS3, Ap <sup>R</sup>	ADHpro-LexA-GAL4 Aktivierungsdomäne	Positivkontrolle für die Aktivierung der Transkription	Brent Laborat. <sup>a</sup> Clontech

\* Plasmide, die im Zwei-Hybrid System (A.6) verwendet wurden.

<sup>a</sup> Brent Laboratory, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston

<sup>b</sup> Die entstandenen PCR-Amplifikate wurden zur Weiterklonierung verwendet.

## B.2. Anzucht und Stammhaltung

### B.2.1. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisierung 15 (Hefemedien) bis 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Temperaturempfindliche Zusätze sind sterilfiltriert und nach Abkühlen der Medien auf 50°C (Festmedien) oder vor Inokulation (Flüssigmedien) zugesetzt worden. Für Festmedien wurden 20 g Agar pro Liter zugesetzt und mit dem Medium autoklaviert.

#### Medien für *E. coli*

##### SOB-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
KCl	186 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
pH 7,0	

Nach dem Autoklavieren werden je 10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 M MgSO<sub>4</sub> zugegeben.

##### NZY<sup>+</sup>-Medium

NZ Amine (Caseinhydrolysat)	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
pH 7,5	

Nach dem Autoklavieren werden je 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 M MgSO<sub>4</sub> und 20 ml 20% Glukose zugegeben.

<b>SOC-Medium</b>	<b>LB-Medium (Luria-Bertani)</b>	
SOB-Medium + 10 ml 50% Glukose	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l
	pH 7,4	

### Medien für *S. cerevisiae*

Alle Hefemedien sind als Fertigprodukte bei der Firma Clontech gekauft worden. Die Grundmedien (Vollmedium und Minimalmedien) wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Zu den Minimalmedien wurden verschiedene Dropout-Supplements (bestehend aus Aminosäuren und Nukleosiden) (Clontech) gegeben, um selektive Mangelmedien zu erhalten.

<b>YPD-Medium</b>	Vollmedium, bestehend aus Pepton, Hefeextrakt und Dextrose; pH 6,5
<b>YPAD-Medium</b>	s. YPD mit 30 mg / l Adeninhemisulfat
<b>Minimal SD Base</b>	Minimalmedium, bestehend aus Yeast Nitrogen Base (YNB), Ammoniumsulfat und Dextrose; pH 5,8
<b>Minimal SD Base/Gal/Raf</b>	s. Minimal SD Base, statt Dextrose als Kohlenstoffquelle sind Galaktose und Raffinose enthalten
<b>Verwendete Dropouts</b>	-Ura -Ura-His -Ura-His-Leu -Ura-His-Trp -Ura-His-Trp-Leu
<b>X-Gal-Platten</b>	900 ml Minimalmedium + Dropout + Agar autoklavieren + 100 ml 0,7 M Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer) pH 7,0 (autoklaviert) + 2 ml X-Gal 20 mg/ml

## B.2.2. Hemmstoffe und Medienzusätze

**Tabelle B-3: Hemmstoffe und Medienzusätze**

Medienzusätze	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 50% EtOH/H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	50 µg/ml
Chloramphenicol	35 mg/ml in MeOH	35 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in MeOH	10 µg/ml
IPTG	1 M IPTG in 50% EtOH/H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	2 mM
X-Gal	20 mg/ml in DMF	40 µg/ml

### B.2.3. Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB- oder SOB-Medium. Hefen wurden in YPD- oder in Minimalmedium kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Plastikröhrchen oder Erlenmeyerkolben angezogen, die bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (Hefen) und 225 rpm inkubiert wurden. Zum Überimpfen dienten Einzelkolonien, die von den entsprechenden Agarplatten abgenommen wurden. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen 1:1000 bzw. mit einer gewissen Zellzahl (bestimmt durch Trübungsmessung bei OD<sub>600</sub>) beimpft.

*E. coli* und Hefe Stämme können 4 bis 6 Wochen bei 4°C auf Agarplatten gehalten werden. Dazu werden Einzelkolonieausstriche über Nacht inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Ausgehend von diesen Kulturen können Glycerinkulturen angelegt werden, die über mehrere Jahre stabil bei -80°C sind. *E. coli* wurde mit 50%igem Glycerin 2:1, Hefen mit 65%igem Glycerin 1:1 in Kryoröhrchen aufbewahrt. Die Zugabe der Glycerinlösung bewirkt, dass die Zellen unempfindlicher gegenüber der Lagerung bei tiefen Temperaturen sind.

#### Glycerinlösungen zur Stammhaltung:

50% Glycerin/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

65% Glycerin/0,1 M MgSO<sub>4</sub>/25 mM Tris-HCl, pH 8,0

Die Glycerinlösungen wurden autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## B.3. Molekularbiologische Methoden

### B.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS

Für die Gewinnung hochwertiger Plasmid-DNS für präparative Zwecke (Klonierung und Sequenzierung) wurden die kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) und Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip dieser Isolierungsmethode ist der Zellaufschluß durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und eine anschließende DNS-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Die Präparation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

### B.3.2. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten

Die Reinigung, Aufkonzentrierung und Umpufferung von DNS-haltigen Lösungen nach enzymatischer Modifikation sowie die Abtrennung der amplifizierten PCR-Fragmente von den Agenzien der PCR-Reaktion und die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen). Diese Methode

nützt die Eigenschaft der DNS aus, an eine spezifisch dafür entwickelte Säulenmatrix zu binden. Die Elution der DNS kann anschließend mit dem im Kit vorhandenen Elutionspuffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  erfolgen. Alle benötigten Lösungen und das Arbeitsprotokoll sind im Kit enthalten.

### **B.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine  $\text{OD}_{260}$  von 1,0:

- 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNS
- 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger RNS
- 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  abgeschätzt werden. Dieser Quotient soll über 1,7 liegen.

### **B.3.4. Enzymatische Modifikation von DNS**

#### **B.3.4.1. Spaltung von DNS mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen (auch kurz Restriktionsenzyme genannt) bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Basensequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten (Sambrook et al, 1989). Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit definierten Enden entstehen. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung entweder glatte Enden (blunt ends) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende „sticky ends“. Die DNS-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Roche und NEB bezogen (F.2). Die Erkennungssequenzen, Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen wurden den entsprechenden Produktbeschreibungen der Hersteller entnommen.

Für analytische Zwecke wurden 0,2 bis 0,5  $\mu\text{g}$  DNS mit 3 bis 5 U Enzym, für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten (für Klonierungen) wurden 2 bis 5  $\mu\text{g}$  DNS mit 5 bis 10 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50  $\mu\text{l}$  für 1 bzw. 3 h inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### **B.3.4.2. Dephosphorylierung linearer DNS durch alkalische Phosphatase**

Alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP = shrimps alkaline phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluss (Religation) während der

Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz von Fremd-DNS zu erhöhen. Zu der gereinigten, linearisierten DNS (etwa 5 pmol) wurden 5 U SAP (Roche) und der entsprechende Puffer gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65°C) konnte die Vektor-DNS für die Ligation eingesetzt werden.

#### **B.3.4.3. Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase**

Die T4-DNS-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNS oder RNS. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden. Die Ligase wurde eingesetzt, um Fremd- und Vektor-DNS kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNS zu verknüpfen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS (Insert, in 2 bis 4-fachen molarem Überschuß) wurden in Ligasepuffer gemischt und für 3-16 h bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend 20 min gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> dialysiert (Dialysemembran der Porengröße 0.025 µm, Millipore), um den hohen Salzgehalt zu reduzieren. Das rekombinante Plasmid konnte im Anschluss in *E. coli* transformiert (B.3.9.1) werden.

#### **B.3.5. Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten**

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1 kb Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert mit DNS-Fragmenten von ca. 100 bp und markiert die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNS-Fragmenten von etwa 5 kb.

Die zu isolierende DNS-Bande wurde möglichst rasch im UV-Licht sichtbar gemacht, der entsprechende Gelbereich mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reagenzgefäß (ERG) überführt. Die DNS wurde anschließend mittels QIAquick Gel Extraction-Kit (Quiagen) isoliert (B.3.2.).

##### **10x TBE**

0,9 M Tris (USB)  
0,9 M Borsäure (Merck)  
20 mM EDTA (ICN)

##### **Elektrophoresepuffer**

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

**Auftragspuffer (6x dye)**

18% Ficoll Typ 400 (Sigma)

0,12 mM EDTA, pH 8,0

6x TBE

0,1% Bromphenolblau (Serva)

0,1% Xylencyanol FF (Sigma)

**Ethidiumbromidstammlösung**

10 mg/ml (Sigma), wässrig

**B.3.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 0,2 bis 12 kb wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) verwendet. Für analytische und präparative Zwecke wurden 1-2% (g/v) Agarose (Seakem LE, Biozym) in 1x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen; vor dem Ausgießen der etwas abgekühlten Agaroselösung in eine horizontale Kammer wurde Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 300 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TBE als Laufpuffer über 1 h bei 100 V.

**B.3.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifikation von definierten DNS-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Saiki et al., 1988). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNS-Polymerase. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Polymerisation) wird eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den beiden Primern liegenden DNS-Abschnittes erreicht. Über Basenaustausche in den Sequenzen der verwendeten Primer ist es möglich, gerichtet Mutationen in der Sequenz des Produktes zu erzeugen, was die Generierung artifiziereller Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme ermöglicht.

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um DNS-Fragmente zur Konstruktion von Expressionsvektoren zu gewinnen.

**B.3.7.1. PCR-Primer**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden bei MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Sequenzen und Restriktionsschnittstellen sind im Anhang (F.1) wiedergegeben. Die lyophilisierte Primer-DNS wurde in soviel  $H_2O_{\text{bidest.}}$  gelöst, dass die Konzentration 100 pmol/ $\mu\text{l}$  betrug. Davon wurden Arbeitslösungen von 25 pmol/ $\mu\text{l}$  hergestellt.

### B.3.7.2. Reagenzien

Für die PCR wurden folgende Polymerasen verwendet: Taq/Pwo-Polymerasengemisch im Expand<sup>TM</sup>High-Fidelity PCR-Kit (Roche) und Platinum<sup>®</sup>Pfx DNA Polymerase Kit (Gibco). Die Reaktionsansätze für die PCR wurden gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet. Ein Vorteil dieser Polymerasen ist der geringe Nukleotid-Fehleinbau aufgrund der 3'→5'-Exonukleaseaktivität („Proofreading“).

Die Arbeitslösung der dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP [NEB]) wurde auf 10 mM eingestellt.

### B.3.7.3. Standard-PCR

(für DNS-Fragmente bis ca. 1 kb)		
Startdenaturierung	94°C, 5 min	
Denaturierung	94°C, 15 sec	} 35x
Primeranlagerung (Annealing)	55°C, 30 sec	
Polymerisation (Elongation)	72°C, 30 sec	
finale Polymerisation (Elongation)	72°C, 5 min	

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe der zu amplifizierenden DNS-Fragmente (Elongationszeit und -temperatur) und Primersequenzen (Annealingtemperatur) optimiert. Die PCR-Reaktionen wurden im UNO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt.

Die amplifizierten DNS-Fragmente, die für die Konstruktion von Plasmiden eingesetzt wurden, sind aufgereinigt (B.3.2) und nach ihrer Klonierung sequenziert (B.3.8) worden, um mögliche Fehler der Polymerasen zu erkennen.

### B.3.7.4. Klonierung von PCR-Amplifikaten

Zur Subklonierung von gereinigten PCR-Amplifikaten wurde das TOPO TA Cloning Kit (für Taq-Amplifikate mit A-Überhängen) bzw. das Zero Blunt TOPO Cloning Kit (für Pfx-Amplifikate ohne Überhänge) (Invitrogen) verwendet. Im Kit sind jeweils kompetente *E. coli* TOP10 Zellen und der entsprechende Klonierungsvektor (pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO mit Blau-Weiß-Selektion bzw. pCR<sup>®</sup>-BluntII-TOPO mit dem *ccdB* Gen) enthalten. Das genaue Arbeitsprotokoll ist dem jeweiligen Kit beigelegt.

### B.3.8. Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). DNS-Fragmente wurden mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert und durch den Einbau verschieden fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Sequenzierautomaten („ABI Prism<sup>TM</sup> Sequence-Analyser“, Perkin-Elmer Applied

Biosystems). Dabei erkennt ein Laser die Abfolge der fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmente, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Aus den Rohdaten wird von einem Computerprogramm (Multiscan 100ES, Sony) die DNS-Sequenz errechnet.

### Durchführung des „Terminator Cycle Sequencing“:

Ansatz:	DNS (50-500 ng)	x $\mu$ l
	Ready Reaction Mix <sup>a</sup> (RRM)	4 $\mu$ l
	Primer (0,8 pmol/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 20 $\mu$ l

<sup>a</sup>enthält AmpliTaq DNS Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Perkin-Elmer Applied Biosystems)

Synthese der DNS-Abbruchfragmente:

Denaturierung	95°C	2 min	} 25x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	50°C	40 sec	
Polymerisation	60°C	4 min	

Die Reinigung des Sequenzierproduktes erfolgte mit „Centri Sep Spin Columns“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers.

Die getrocknete DNS wurde in 20  $\mu$ l „Template Suppression Reagent“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) gelöst und vor der Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

## B.3.9. Transfer von DNS in *E. coli* und *S. cerevisiae*

Die Einschleusung von Plasmid-DNS in Bakterien- oder Hefezellen bezeichnet man als Transformation. Dafür benötigt man kompetente Zellen, die in der Lage sind, exogene DNS aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transformationstechniken der Elektroporation und des Hitzeschocks zum Einschleusen fremder DNS in Zellen verwendet. Bei geeignetem Selektionsdruck (z.B. durch Zugabe von Antibiotika), wird ein in die Zelle geschleustes Plasmid stabil an die Tochterzellen weitergegeben.

### B.3.9.1. Transformation von *E. coli*

#### B.3.9.1.1. Elektroporation von *E. coli* XL1-Blue

Durch einen kurzen Hochspannungsimpuls kann eine lokale Perforation der Zellhülle erreicht werden, die eine Transformation von Plasmid-DNS in die Zelle ermöglicht.

**Herstellung elektrokompetenter Zellen** (Hanahan, 1983 modifiziert):

LB-Medium wird mit einer *E. coli* XL1-Blue Übernachtskultur 1:1000 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 (logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt und anschließend geerntet. Das Zellpellet wird erst mit eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und anschließend mit eiskalter 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Nach

Dekantieren des Überstandes werden die Zellen 1:1 in 10% Glyzerin resuspendiert und als 60 µl Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Zellen werden jeweils 10 min mit 4000xg (g über Tabelle bestimmt bzw. an der Zentrifuge [F.5] ersichtlich) bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert.

#### **Durchführung der Elektroporation:**

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem dialysierten Ligationsansatz (100-500 ng DNS) (B.3.4.3) oder mit etwa 10 ng Plasmid-DNS vorsichtig gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser und Gene Controller von BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Spannung 2,5 kV; Kapazität 25 µF; Widerstand 200 Ω, durchschnittliche Zeitkonstante 4,5 ms. Nach der Transformation wurden die Bakterien in LB- oder SOC-Medium zur phänotypischen Expression für 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidisolierung (B.3.1) und entsprechender Restriktionsanalyse auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

#### **B.3.9.1.2. DNS-Transfer in *E. coli* XL2-Blue MRF<sup>+</sup> und BL21(DE3)pLysS mittels Hitzeschock**

*E. coli* XL2-Blue MRF<sup>+</sup> (Stratagene) wurde vom Hersteller kompetent geliefert, dabei konnte die Transformationseffizienz durch Zugabe von β-Mercaptoethanol (25 mM Endkonzentration) gesteigert werden.

*E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) Zellen wurden gemäß den Angaben des Herstellers aufbereitet. Zellen, die in SOB-Medium eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 erreicht hatten, wurden durch Behandlung mit 50 mM  $\text{CaCl}_2$  kompetent gemacht.

Die kompetenten Zellen wurden mit dem Ligationsansatz gemischt und auf Eis 30 min inkubiert. Durch anschließenden Hitzeschock der Zellen bei  $42^{\circ}\text{C}$  erfolgte das Einschleusen der rekombinanten DNS. Nach einer Erholungsphase in  $\text{NZY}^+$ - bzw. SOC-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde die Bakteriensuspension auf selektiven LB- bzw. SOB-Platten ausplattiert. Die Transformanten sind im Anschluss auf das Vorhandensein der Plasmid-DNS untersucht worden.

#### **B.3.9.2. Transformation von *S. cerevisiae***

Die Transformation wurde mit Hilfe der Lithiumazetat Methode (Gietz et al., 1992 und 1995) durchgeführt. Durch die Anwesenheit alkalischer Kationen wird die Fremd-DNS von den Zellen leichter aufgenommen, die Zugabe einer Träger-DNS erleichtert das Einschleusen der Plasmide zusätzlich. In dieser Arbeit war es notwendig, zwei bis drei verschiedene Plasmide in jede Zelle zu transformieren (B.6). Dabei darf es nicht zum Ausschleusen der Plasmide kommen. Das Vorhandensein der Plasmide erlaubt den Hefen die Synthese verschiedener Aminosäuren bzw. von Uracil, was zur Selektion von

erfolgreich transformierten Hefen ausgenutzt werden kann, indem diese auf den entsprechenden Mangelmedien gehalten werden.

### Durchführung der Transformation:

- ÜN-Kultur von EGY48 1:20 verdünnen und OD<sub>600</sub> vermessen (als Referenz diente YPD-Medium)
- 50 ml YPAD-Medium mit einem 2,5 x 10<sup>8</sup> Zellen entsprechendem Volumen animpfen und bis zu einer Zelldichte von 2 x 10<sup>7</sup> Zellen pro ml bei 30°C und 225 rpm inkubieren
- Hefen ernten (3000xg, 5 min) und mit 25 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> waschen
- Zellpellet in 1 ml 100 mM Lithiumacetat (LiAc) lösen und in ein 1,5 ml ERG überführen
- 15 sec bei 13.000xg zentrifugieren und Pellet in 500 µl 100 mM LiAc resuspendieren
- 50 µl Zellsuspension zu folgendem Transformationsmix (pro Transformation) geben und vortexen:
 

50% PEG	240 µl
1 M LiAc	36 µl
SS-DNS	50 µl
Plasmid-DNS + H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	25 µl (je Plasmid 1 µg Maxiprep-DNS)

 Mix sehr gut mischen, bevor die Hefen zugegeben werden
- Gesamten Ansatz (Hefen mit Transformationsmix) erst 30 min bei 30°C inkubieren und anschließend 20 min bei 42°C (Hitzeschock)
- 15 sec bei 13.000xg zentrifugieren und Zellpellet nach Entfernung des Transformationsmixes in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendieren
- 100 µl bzw. 100 µl einer 1:10 Verdünnung der Hefesuspension auf Glu-His-Ura(-Trp) ausplattieren und zwei Tage bei 30°C inkubieren

### Einzelstrang Träger DNS (SS-DNS)

DNS-NA <sup>+</sup> Type III Salmon Testis (Sigma)	250 mg
TE Puffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0)	100 ml

? aliquotieren und bei -20°C lagern, vor Gebrauch 5 min kochen

### Lithiumacetat pH 8.4 – 8.9

LiAc (Sigma)	51 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 500 ml

pH mit verdünnter Essigsäure einstellen  
steril filtrieren

### Polyethylenglycol (PEG 3350, Sigma)

PEG	50 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 100 ml

steril filtrieren oder autoklavieren

## B.4. Proteinbiochemische Methoden

### B.4.1. Expression von Proteinen

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine in *E. coli* exprimiert, um einen polyklonalen Antikörper gegen IRAG zu generieren. Proteine, die in eukaryontischen COS-Zellen heterolog exprimiert wurden, sind für Co-Immunpräzipitationen und Phosphorylierungsstudien verwendet worden.

#### B.4.1.1. Proteinexpression in COS-7 Zellen

Zur heterologen Proteinexpression in COS-7 Zellen kam es, nachdem diese mittels der Kalziumphosphatmethode (Chen & Okayama, 1987) co-transfiziert wurden (B.5). Die rekombinanten Plasmide, die transfiziert wurden, enthielten den starken CMV-Promotor und eine Kozaksequenz, um die Translationshäufigkeit zu erhöhen. In Rahmen dieser Arbeit sollte IRAGa mit cGKI $\alpha$ , IRAGa mit cGKI $\beta$ , IRAGa mit cGKI $\beta$  und IP<sub>3</sub>RI, sowie cGKI $\beta$  mit IP<sub>3</sub>RI transient in COS-7 Zellen co-exprimiert werden.

#### Ernten der exprimierten Proteine:

- Medium absaugen
- Transfizierte Zellen mit PBS (B.5.2) waschen
- Abschaben der Zellen mit 2 ml eiskaltem PBS, das Proteaseinhibitoren (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Leupeptin, 300  $\mu\text{M}$  PMSF und 1 mM Benzamidin) enthält, Zellen in 50 ml Röhren überführen; Vorgang wiederholen
- Zellen bei 4°C mit 1000xg 10 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 5 ml PBS + PI waschen, erneut zentrifugieren (5 min)
- Überstand vollständig absaugen, Pellet in 20 mM KP-Puffer, pH 7,4 (hyposmolarer Lysispuffer) + PI + 1 mM EDTA resuspendieren (für 4 Kulturschalen ca. 150  $\mu\text{l}$ , mit 50  $\mu\text{l}$  nachspülen)
- Zellsuspension sofort in flüssigen N<sub>2</sub> geben, auf Eis auftauen und zur Homogenisierung mit einer 22G-Kanüle scheren (d.h. 4-6x aufziehen)
- Proteinbestimmung nach Bradford (B.4.4) durchführen, dazu Zellysate 1:200 verdünnen
- 50  $\mu\text{l}$  Aliquots bei -80°C aufbewahren

#### Proteaseinhibitoren (PI):

Benzamidin: in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>; 1 M Stammlösung, Endkonzentration 1 mM (1:1000 verdünnen)

Leupeptin: in EtOH; 2 mg/ml Stammlösung, Endkonzentration 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (1:4000 verdünnen)

PMSF: in EtOH; 200 mM Stammlösung, Endkonzentration 300  $\mu\text{M}$  (75  $\mu\text{l}$  auf 50 ml)

#### B.4.1.2. Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Die Expression von IRAGb<sub>SD</sub>-Protein (löslicher Teil bis zur coiled-coil Domäne) (C.1) erfolgte in dem Xpress<sup>TM</sup> System der Firma Invitrogen, das den Expressionvektor pRSET und den *E. coli* BL21(DE3)pLysS Stamm enthält. Der Vektor (in vorliegender Arbeit pRSET-C), in den das IRAG-PCR-Amplifikat gerichtet über *Bam*HI/*Kpn*I kloniert wurde,

besitzt einen T7-Promotor, der eine hohe Proteinexpression ermöglicht, und eine (His)<sub>6</sub>-Sequenz, die der Aufreinigung des rekombinanten Proteins dient (B.4.2). Das sequenzierte rekombinante Plasmid wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert (B.3.9.1.2). Dies sind Protease-defiziente Zellen, die zusätzlich das  $\lambda$  Lysogen, das unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors die T7-Polymerase exprimiert, und ein Plasmid besitzen, das konstitutiv T7-Lysozym zur Unterdrückung basaler Proteinexpression exprimiert. Die Anwesenheit von IPTG induziert die Zellen zur Expression von Protein.

Vor der Isolierung des Proteins im großen Maßstab wurden zunächst in kleinerem Ansatz die Bedingungen ausgetestet, u.a. die geeignete IPTG-Konzentration, die Induktionszeit und die Löslichkeit, um eine möglichst hohe Expression zu erzielen. Anschließend konnte IRAG-Protein in großem Maßstab gewonnen werden.

### Arbeitsprotokoll:

- *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit pRSET-IRAGb<sub>SD</sub> auf selektiven LB-Agarplatten (mit Chloramphenicol und Ampicillin) direkt aus dem Glyzerolstock austreichen und üN bei 37°C inkubieren
- Bakterien von der Platte abkratzen und in SOB-Medium resuspendieren
- 500 ml selektives SOB Medium (in 2 l Kolben) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 mit der Bakteriensuspension animpfen und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen lassen; davon 1 ml als Kontrolle entnehmen (Zellpellet in 200 µl Lysepuffer resuspendieren und bei -80°C einfrieren)
- Proteinexpression durch Zugabe von 2 mM IPTG (Endkonzentration, B.2.2) induzieren und Zellen weitere 3 h bei 37°C inkubieren
- Zellen ernten (JA10-Rotor, 5000 rpm in Beckmann-Zentrifuge J2-HS, 15 min, 4°C), Pellet in 100 ml Lysepuffer resuspendieren und bei -80°C einfrieren
- Nach dem Auftauen des Zellysates ein Aliquot abnehmen (Kontrolle, ob Expression erfolgreich war), den Rest des Lysates mit Ultraschall behandeln (auf Eis-EtOH-Bad, Stufe 7, 50% „duty“, 6 x 10 sec; das trübe Lysat wird durch Ultraschall klarer)
- Lysat zentrifugieren (JA10-Rotor, 10000 rpm, 45 min, 4°C), Überstand aufbewahren (IRAGb<sub>SD</sub> ist ein lösliches Protein) und Sediment in Sonication-Puffer + PI resuspendieren (Kontrolle, ob Ultraschallbehandlung erfolgreich war)
- Anschließend Expression und Löslichkeit von IRAGb<sub>SD</sub> mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. durch Westernblotanalyse (B.4.6) überprüfen. Dafür wurden die Zellen vor und nach der Induktion und das Lysat vor und nach der Ultraschallbehandlung aufgetragen.
- Das aus insgesamt 2,5 l Bakterienkultur gewonnene Protein wurde anschließend aufgereinigt (B.4.2).

#### Sonication-Puffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
150 mM NaCl  
pH 8,0

#### Lysepuffer

Sonication-Puffer + 10 µg/ml Lysozym + Protease-inhibitoren (1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 0,1 µg/ml Leupeptin)

### B.4.2. Reinigung bakteriell exprimierter Proteine

Die Reinigung des IRAG-Proteins (B.4.1.2), das einen N-terminalen His-„Tag“ besitzt, erfolgte über eine Ni-NTA-Säule (Qiagen). Es handelt sich hierbei um eine Metall (Ni<sup>2+</sup>)-Chelat (NTA: nitrilo-tri-acetic acid)-Affinitätschromatographie, eine elegante Methode, um

Proteine, die einen His-„Tag“ tragen, schnell und einfach zu reinigen. Die Affinität zwischen dem (His)<sub>6</sub>-markierten Protein und der Ni-NTA-Säule ist sehr hoch, so dass man unter stringenten Bedingungen unspezifische Bindungen verhindern kann. Die Elution des Proteins kann entweder durch Erniedrigung des pH-Wertes (His-Reste werden protoniert und dissoziieren von Ni-NTA ab) oder durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol erreicht werden. Die Bindungskapazität pro ml Säule beträgt 5 bis 10 mg des Proteins. Vor der Reinigung von IRAGb<sub>SD</sub> in großem Maßstab wurden die optimalen Bedingungen für ein möglichst reines Protein im Batch-Verfahren ausgetestet. Die Reinigung für große Proteinmengen wurde anschließend wie folgt durchgeführt:

- Etwa 16 ml Ni-NTA Agarose-Beads in 30% EtOH (Qiagen) mit Sonication-Puffer äquilibriert (3x gewaschen und abzentrifugiert) und 1:1 in Sonication-Puffer (B.4.1.2) aufgenommen (insgesamt 16 ml, entspricht 8 ml gepackter Säule)
- Aufgetautes Proteinlysat (aus 2,5 l Bakterienkultur, B 4.1.2) mit äquilibrierten Ni-NTA Beads, 30 mM (Endkonz.) Imidazolpuffer (verhindert unspezifische Bindungen an die Säule) und fehlende Protease-inhibitoren (1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 0,1 µg/ml Leupeptin) 1 h bei 4°C und 20 min bei RT geschwenkt
- Gesamten Ansatz auf eine Pharmazia-Säule XK 16 gegeben und Ni-NTA Beads absacken lassen, Durchlauf aufgefangen; darauf geachtet, dass Säule nie „trocken lief“
- Säule mit 25 Volumen (200 ml) Waschpuffer mit PI gewaschen (Waschfraktion aufbewahrt)
- Protein mit insgesamt 44 ml Imidazolpuffer mit PI eluiert, dabei die ersten Elutionen (1 bis 12) in 2 ml Fraktionen, die späteren in 5 ml Fraktionen aufgefangen
- Mittels Coomassie-Gel (B.4.6.2) wurde überprüft, ob das Protein an die Säule gebunden hat und die Eluierung effizient war. Die Fraktionen 4 bis einschließlich 8, enthielten das meiste Protein und wurden gepoolt. Diese 10 ml enthielten 3mg/ml Protein. Insgesamt konnten etwa 50 mg reines Protein gewonnen werden.
- Durch eine Westernblotanalyse (B.4.6.3) wurde kontrolliert, ob das Protein rein genug für die Injektion in Kaninchen ist. Der Westernblot wurde dazu mit einem Anti-His- (monoklonal; Qiagen) bzw. einem Anti-IRAG-Peptid- (Schlossmann et al., 2000) Antikörper inkubiert.

#### Waschpuffer pH 6,0

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
150 mM NaCl  
10% Glycerin

#### Imidazolpuffer pH 6,0

0,5 M Imidazol  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
10% Glycerin

### B.4.3. Herstellung und Reinigung spezifischer Antiseren in Kaninchen

Ein spezifisches Antiserum gegen das rekombinante IRAGb<sub>SD</sub> (in *E. coli* exprimiert, B.4.1.2) ist in Kaninchen erzeugt worden. Eine Tierversuchsgenehmigung mit der Nummer 2112531.6-12/2000 lag vor. Den Kaninchen wurde Präimmenserum zur Kontrolle abgenommen. Für die erste Immunisierung wurde das rekombinante Protein (400 µg ad 1 ml PBS; B.5.2) mit 1 ml kompletten Freund'schem Adjuvans (Sigma) emulgiert und in Kaninchen (1-1,5 kg Gewicht, weiblich) intradermal, subkutan und intramuskulär injiziert. Im Abstand von 4 Wochen wurde mit 150 µg Protein in PBS, das mit 1 ml inkomplettem

Freund'schen Adjuvans gemischt wurde, injiziert. Das Adjuvans bewirkt eine Verstärkung der Immunantwort. Dieser Vorgang wurde 2x wiederholt. 10 Tage nach jeder Immunisierung (Antikörpertiter im Blut am höchsten) wurde den Kaninchen 15 bis 30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Blutgerinnung (1–2 h bei RT) wurden die partikulären Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 3000xg) entfernt. Aliquots des Präimmenserums und der Antiseren wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Antiseren enthalten nicht nur die gewünschten, spezifischen Antikörper, sondern noch weitere unspezifische Antikörper, die bei immunologischen Methoden zu unerwünschten Kreuzreaktionen führen können. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie lassen sich diese unspezifischen Immunglobuline entfernen (Keilbach, 1992a). Hierzu wurden 5 mg des spezifischen Antigens (IRAGb<sub>SD</sub>) an eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) immobilisiert. Diese Antigen-gekoppelte Sepharose wurde mit 7 ml Antiserum inkubiert, wobei die spezifischen Antikörper an das Antigen binden, und die unspezifischen ausgewaschen werden. Die spezifischen Antikörper wurden durch 3,75 M MgCl<sub>2</sub> oder durch 0,1 M Glycin, pH 2,5 eluiert. Anschließend wurden diese dialysiert und die Konzentration mittels Bradford (B.4.4) ermittelt. Die Ausbeute betrug etwa 5-6 mg IgG pro Aufreinigung. Der gereinigte Antikörper wurde mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Sensitivität und Spezifität des Serums und des gereinigten polyklonalen Antikörpers wurde mit bakteriell exprimiertem IRAGb<sub>SD</sub> und mit verschiedenen Gewebslysaten ausgetestet.

#### **B.4.4. Proteinbestimmung nach Bradford**

Die in saurer Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffes Coomassie Blau (braune Leukoform) werden durch Bindung an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen wieder in den ursprünglichen blauen Farbstoff überführt. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Durch Messung der Extinktion bei 595 nm lässt sich über eine Eichkurve die Proteinkonzentration einer Probe ermitteln (Bradford, 1976).

##### **Färbelösung:**

200 mg Coomassie Blue G 250 (Serva) in 100 ml Ethanol lösen

ad 1,8 l mit H<sub>2</sub>O auffüllen

200 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zugeben und über Nacht rühren

Lösung filtrieren bis OD<sub>595</sub> konstant bleibt (ca. 0,35 gegen H<sub>2</sub>O), lichtgeschützt bei RT lagern

##### **Durchführung:**

- Proteinprobe in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von ca. 0,05 µg/µl verdünnen
- 100 µl der Probe in Plastikkuvette (1 cm Schichtdicke) mit 1 ml Färbelösung mischen, 5 min im Dunklen inkubieren
- OD<sub>595</sub> messen (Referenz: 100 µl H<sub>2</sub>O + 1 ml Färbelösung) und Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden (1-10 µg BSA in 100 µl H<sub>2</sub>O) bestimmen

### B.4.5. Konzentrierung von Proteinen aus Lösungen

Proteinlösungen wurden mittels der Ultrafiltration aufkonzentriert. Dafür wurden Ultrafiltrationskammern (Mikrokonzentratoren) der Firma Amikon verwendet. Je nach Protein und Lösungsvolumen wurden verschiedene Kammern (3 ml, 10 ml) und Filter (Ausschluß von 10 kDa- und 30 kDa-Protein) benutzt. Die niedermolekularen Bestandteile der Probe werden vom Protein durch Ultrafiltration abgetrennt. Durch Zentrifugation wird dabei der benötigte Druck (bis zu 4,5 bar) der Lösungen auf die Membranen erzeugt.

### B.4.6. Analyse und Detektion von Proteinen

#### B.4.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde standardgemäß mit der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dafür wurde eine Mini-Gel Apparatur (Mini Protean II Cell, Bio-Rad) verwendet. Je nach gewünschten Trenneigenschaften wurden Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid (7,5% bis 10%) gegossen. Zunächst wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgehoben, das Sammelgel darauf gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit Laemmli-Puffer (Endkonzentration 1x) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die polymerisierten Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut, die denaturierten Proben aufgetragen und bei 150 V vertikal in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Protein Molecular Weight Marker“ (NEB) verwendet. Dieser Marker enthält Proteine mit dem Molekulargewicht von 6,5 bis 175 kDa. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie gefärbt (B.4.6.2) oder auf eine PVDF-Membran transferiert (Millipore) (B.4.6.3).

#### 10x SDS-Laufpuffer pH 8,3

250 mM Tris-HCl  
1,92 M Glycin  
1% SDS

#### Acrylamid

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid  
(Rotiphorese Gel 30, Roth)

#### 4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8  
0,4% SDS

#### 4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8  
0,4% SDS

#### 9% Trenngel

Acrylamid	4,5 ml
4x Trenngelpuffer	3,75 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	6,75 ml
30% APS (in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> )	25 µl
TEMED (Roth)	10 µl

#### Sammelgel

Acrylamid	0,65 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	3,05 ml
30% APS	12,5 µl
TEMED	5 µl

**4x Laemmli-Puffer**

240 mM Tris-HCl, pH 6,8  
 200 mM DTT oder  
 (20%  $\beta$ -Mercaptoethanol)  
 8% SDS  
 40% Glycerin  
 0,004% Bromphenolblau

**B.4.6.2. Coomassie-Färbung**

Die Proteingele wurden 30 min in der auf ca. 50°C vorgewärmten Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Hintergrundfärbung wurde durch den Entfärber, der mehrmals gewechselt wurde entfärbt. Zur Dokumentation und Aufbewahrung wurden die Gele auf einem Filterpapier 1 h bei 80°C im Vakuum getrocknet.

**Coomassie Blau Lösung**

Coomassie Blau R 250	1.5 g
Methanol	455 ml
Essigsäure	90 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l

**Entfärber**

Essigsäure	100 ml
Methanol	300 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1 l

**B.4.6.3. Westernblot**

Die Anwesenheit bestimmter Proteine in Zell- und Gewebsextrakten wurde durch Westernblotanalyse nachgewiesen. Dazu wurden die Proteinproben durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore) transferiert. Durch Bindung spezifischer Antikörper an die Membran konnten native wie auch heterolog exprimierte Proteine durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper und anschließende Enzymsubstrat-vermittelte Farbreaktion detektiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den Angaben des Herstellers, Spenderorganismus und entsprechender Verdünnung im Anhang (F.3) zu finden.

Die Quantifizierung von IRAG erfolgte durch den Vergleich der Intensität der Banden mit unterschiedlichen Mengen reinem, rekombinantem IRAG<sub>SD</sub>.

**Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren:**

Für das Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) wurden Filterpapiere (GB001 Gel Blotting Papier; Schleicher & Schüll) und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, mit den entsprechenden Puffern getränkt und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei von unten (Anode) nach oben (Kathode) zwischen zwei Graphitplatten aufgebaut:

6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 1  
 4 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 2  
 Membran  
 SDS-Gel  
 6 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte durch Blotten mit konstanter Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 1 h.

### **Immundetektion:**

Die Membran wurde mit 5% Magermilchpulver (MP) in 1x TBST geschwenkt (üN bei  $4^\circ\text{C}$  oder 1 h bei RT), um freie Protein-Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Waschen mit 1x TBST ist die Membran über 90 Minuten mit dem entsprechend verdünnten spezifischen primären Antikörper (in 1x TBST + 3% BSA + 0,05%  $\text{NaN}_3$ ) bei RT inkubiert worden. Im Anschluss an dreimaliges Waschen in 1x TBST/1% MP (je 5 min) wurde der Blot mit einem sekundären Antikörper (Konjugat aus Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG und Meerrettich-Peroxidase oder alkalischer Phosphatase) für 1 Stunde geschwenkt. Es folgten wieder 3 Waschschritte, wobei der letzte nur mit TBST erfolgte.

Um die Meerrettich-Peroxidase nachzuweisen, wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion (Roswell und White, 1978) benutzt. Dazu wurde das Luminol-beinhaltende ECL (enhanced chemiluminescence)-System (Amersham) verwendet. Die beiden enthaltenen Lösungen wurden 1:1 gemischt und für zwei min mit der Membran inkubiert. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert die Peroxidase das Luminol, wobei Chemilumineszenz entsteht. Diese konnte mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert werden.

Zur Sichtbarmachung der alkalischen Phosphatase wurde die Membran mit Entwicklungspuffer (20 ml AP-Puffer + 80  $\mu\text{l}$  BCIP + 80  $\mu\text{l}$  NBT) solange inkubiert, bis ein blauer Farbkomplex nachzuweisen war. Die Färbung wurde durch Waschen mit Wasser oder TBST beendet.

#### **Anodenlösung I**

300 mM Tris-HCl, pH 10,4  
20% Methanol

#### **Anodenlösung II**

25 mM Tris-HCl, pH 10,4  
20% Methanol

#### **Kathodenlösung**

25 mM Tris-HCl, pH 7,6  
40 mM g-Aminohexansäure  
20% Methanol

#### **AP-Puffer**

100 mM Tris-HCl, pH 9,5  
100 mM NaCl  
5 mM  $\text{MgCl}_2$

#### **10x TBST-Puffer**

100 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1,5 M NaCl  
0,1% Tween 20

#### **BCIP-Lösung**

25 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (Sigma)  
in 50% Dimethylformamid (DMF)

#### **NBT-Lösung**

50 mg/ml Nitroblau-Tetrazolium (Sigma) in 70% DMF

## B.4.7. cGMP-Agarose-Affinitätschromatographie, Co-Immunpräzipitation und Phosphorylierung

### B.4.7.1. cGMP-Agarose-Affinitätschromatographie

Zellysatproteine (B.4.1.1) oder mikrosomale Membranproteine (300 bis 500 µg ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) wurden mit 200 µl 2% Lubrol-PX + PI (B.4.1.1) solubilisiert (20 min auf Eis, alle 5 min mischen), zentrifugiert (11000xg, 10 min, 4°C) und der Überstand zu cGMP-Agarose (Biolog) gegeben. Die cGMP-Agarose wurde vorher 3x mit Lubrolpuffer + PI gewaschen und 1:1 mit Lubrolpuffer + PI versetzt; pro Fällung wurden 15 µl gepackte Säule eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 4-facher Menge Lubrolpuffer + PI (800 µl) für 2 h bei 4°C geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurde der cGMP-Agarose-Proteinkomplex 3x mit Lubrolpuffer + PI gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand bis zur Trockene abgenommen. Die Proteine sind mit 20 µl 1x Laemmli-Puffer (B.4.6.1) von der cGMP-Agarose eluiert, 3 min bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE (B.4.6.1) und Westernblot (B.4.6.3) analysiert worden.

### B.4.7.2. Co-Immunpräzipitation

Spezifische Antikörper gegen cGKIcommon (C.2.2) und IRAG (20 bzw. 50 µl pro Fällung) (F.3) wurden an Protein A-Sepharose (PAS; Sigma) vorgebunden. Dazu wurde die PAS 3x mit Lubrolpuffer + PI (B.4.1.1) gewaschen, 1:1 im gleichen Puffer aufgenommen (15 µl gepackte Säule pro Fällung) und mit 400 µl Puffer und Antikörper 1 h bei 4°C geschüttelt. Die Antikörper-gekoppelte PAS wurde 3x gewaschen, dazu solubilisierte Proteine (analog B.4.7.1) und Puffer geben und 2 h bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde die PAS gewaschen, die Proteine eluiert und analysiert (B.4.7.1).

### B.4.7.3. Phosphorylierung von gefällten Proteinen

Präzipitierte Proteine (B.4.7.1 und B.4.7.2) wurden nach dem Waschen des cGMP-Agarose- bzw. des PAS-Komplexes im Phosphorylierungspuffer in Gegenwart oder Abwesenheit von 8-pCPT-cGMP (cGMP-Analagon, das nicht von intrazellulären Phosphodiesterasen gespalten wird) (Biolog) für 2 min bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteine sofort mit 7 µl 4x Laemmli-Puffer (B.4.6.1) eluiert (Reaktion gestoppt), 3 min bei 95°C denaturiert und durch SDS-PAGE, Westernblot (B.4.6) und Autoradiographie analysiert.

#### Reaktionsansatz (20 µl)

5x Mes	4 µl
2% Lubrol-PX	1 µl
PI (je 1 µl + 47 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> )	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 µl
+/- 8 pCPT-cGMP 30 µM	2 µl
γ <sup>32</sup> P-ATP 1 mM (1500 cpm/pmol) (Amersham Pharmacia)	2 µl

#### 10x Mes pH 6,9

Mes	4,88 g
MgAc (100 mM)	5 ml
EDTA (100 mM)	1 ml
NaCl (5 M)	2,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 50 ml

**2% Lubrol-PX**

Lubrol-PX (Sigma) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen.  
Aliquots bei -20°C einfrieren

**Lubrolpuffer**

20 mM Tris-HCl, pH 8,0  
80 mM NaCl  
0,1% Lubrol-PX

## B.5. Kultur eukaryontischer Zellen

### B.5.1. Verwendete Zelllinie

Die Proteinexpression fand in den von Affennierenzellen abgeleiteten COS-7 Zellen (American Type Culture Collection) statt, die durch Behandlung der Zellen mit einer Mutante des Affenvirus SV 40 entstanden sind. Da COS-7 Zellen weder cGKI noch IRAG-Protein enthalten (Schlossmann et al., 2000), sind sie für die funktionelle Studie dieser Proteine nach heterologer Expression (B.4.1.1) geeignet.

### B.5.2. Zellkultur

COS-7 Zellen wurden in Dulbecco's MEM Medium (DMEM, Gibco) mit einer Mischung aus 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep, Gibco), 10% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco), 1% nichtessentiellen Aminosäuren (Gibco) und 2% 50x HT-Medium (Biochrom) kultiviert. Dem Medium wurde FCS zugesetzt, um die Versorgung mit bestimmten Wachstumsfaktoren, Hormonen, Anheftungsfaktoren u.ä. zu gewährleisten. Um das Wachstum von Bakterien und Pilzen in der Zellkultur zu unterdrücken, wurde PenStrep zugegeben. COS-7 Zellen wachsen in adhärennten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Plastik-Kulturgefäßen aus Polystyrol (Corning). Die Zellen wurden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%, zur Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums, kultiviert.

#### **Aussäen und Passagieren von Zellen:**

Etwa alle 4 Wochen wurde ein frischer Gefrierstock mit COS-7 Zellen von -196°C aufgetaut und in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Corning) mit 15 ml Medium ausgesät. Wenn die Kulturgefäße konfluent bewachsen waren, war es nötig, die Zellen in ein neues Gefäß umzusetzen und dabei zu verdünnen („Passagieren“). Alle notwendigen Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zum Ablösen von der Gefäßwand trypsiniert. Nach Trypsin-Inaktivierung durch Zugabe von Medium wurden die Zellen gut resuspendiert und je nach Verwendungszweck weiterverarbeitet:

- 1.) Die Zellen wurden bei 1000xg zentrifugiert und mit Einfriermedium als Gefrierstock eingefroren.
- 2.) Zum Passagieren der Zellen wurde etwa 1/10 der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt.
- 3.) Zur Transfektion wurden Zellen in Kulturpetrischalen (10 cm; Corning) ausgesät.

<b>Trypsin:</b>	10x Trypsin-EDTA (Gibco) mit PBS 1:10 verdünnen		
<b>Einfriermedium:</b>		<b>PBS (Phosphat-gepufferte Saline):</b>	
DMEM-Medium	20 ml	NaCl	40 g
FCS	2 ml	KCl	1 g
Nichtessentielle Aminosäuren	0,2 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O	14,5 g
DMSO (10% Endkonzentration)	2,2 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g
		H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 5 l
		pH mit HCl auf 7,4 einstellen und autoklavieren	

### B.5.3. Transfektion von COS-7 Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNS (rekombinante Plasmide) in eukaryontische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Bei einer transienten Transfektion wird die zirkuläre Fremd-DNS unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert, allerdings sind die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Bei Co-Transfektionen wurden gleichzeitig mehrere Gene in die Wirtszellen eingeschleust.

#### Kalziumphosphat-Methode:

Zur Expression von IRAG, cGKI und IP<sub>3</sub>RI in COS-7 Zellen wurde die Kalziumphosphat-Transfektion nach Chen & Okayama (1987) angewandt. Dadurch kommt es zur Bildung eines Kalziumphosphat-DNS-Präzipitates. Dieser feinkörnige Niederschlag setzt sich auf den Zellen ab und wird durch Endozytose aufgenommen.

#### Durchführung:

- Zellen in Kulturschalen (10 cm) mit 9 ml Medium aussäen (ca. 160000)
- Nach 24 h (Zellen etwa 50% konfluent) Zellen wie folgt transfizieren; Ansatz pro Schale:
  - 10 bis 15 µg Plasmid-DNS
  - ad 210 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> in 1,8 ml Kryo-Röhrchen (Nunc) verdünnen
  - 30 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> tropfenweise zugeben, mehrfach schütteln
  - 240 µl 2x HBS in 4,5 ml Kryo-Röhrchen vorlegen und DNS-CaCl<sub>2</sub>-Lösung (240 µl) tropfenweise zugeben, gut schütteln und
  - 30 min bei RT inkubieren; nach 15 min für 10 sec vortexen;
  - gesamten Ansatz (480 µl) ins Zellkulturmedium tropfen, dabei Schale gleichzeitig schwenken
- Nach 24 h evtl. Medium wechseln (Medium mit Transfektionsansatz absaugen, mit PBS (B.5.2) waschen, 10 ml frisches Medium zugeben)
- Zellen nach 48 bis 72 h Inkubation ernten (B.4.1.1); die Transfektionseffizienz betrug 10-30% (Schlossmann et al., 2000).

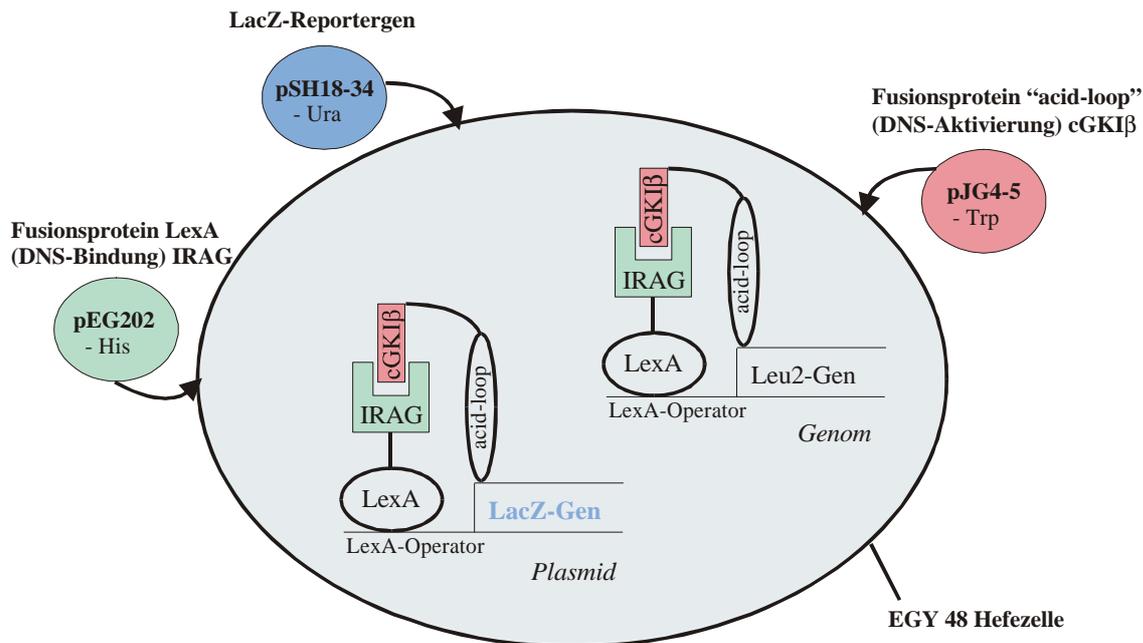
Für die Transfektionskombinationen IRAGa/cGKI, cGKIβ/ IP<sub>3</sub>RI bzw. IRAGa/cGKIβ/IP<sub>3</sub>RI wurden für IRAG 3 µg, für cGKI 2 µg und für den IP<sub>3</sub>RI 9 µg Maxiprep-DNS eingesetzt; ad 10 bzw. 15 µg DNS wurde mit pBS II KS+ aufgefüllt (zur Erhöhung der Transformationseffizienz).

2x HBS: 280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05; sterilfiltrieren und bei –20°C lagern

## B.6. Zwei-Hybrid System

Das Zwei-Hybrid System ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen in Hefen. Es eignet sich sowohl zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern eines bekannten Proteins unter Verwendung einer cDNS-Bibliothek als auch zur Untersuchung, ob zwei bestimmte Proteine miteinander interagieren. (Ausubel et al., 1995; Chien et al., 1991; Gyuris et al., 1993). Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Transkriptionsaktivatoren und –inhibitoren aus zwei Domänen aufgebaut sind, nämlich einer DNS-Bindungsdomäne und einer Aktivierungs-/Inhibitionsdomäne. So ist es möglich, einen funktionellen Transkriptionsfaktor zu erhalten, der durch die Fusion einer Bindungsdomäne LexA (Transkriptioninhibitor, bindet spezifisch an LexA-Operatoren) mit einer Aktivierungsdomäne GAL4 (Transkriptionsaktivator) entsteht (Brent und Ptashne, 1985). Dadurch werden Gene exprimiert, deren Promotor von LexA-Operatoren kontrolliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen IRAG und der cGMP-abhängigen Kinasen I und II aufgeklärt werden (Interaktion zweier bestimmter Proteine). Ein Köderprotein („Bait“; verschiedene IRAG-Konstrukte; siehe F.1) wird als Fusionsprotein mit LexA durch das Plasmid pEG202 exprimiert, wodurch es an Reporter gene „fixiert“ wird, da LexA an deren Operatoren binden wird. Bei den Reporter genen handelt es sich um *lacZ*, das durch die Transformation des Plasmids pSH18-34 in Hefen eingeschleust wird, und um *Leu2*, das im Genom des verwendeten Hefestamms (*S. cerevisiae* EGY48, B.1) vorliegt. Beide Gene werden von 8 bzw. 6 LexA-Operatoren kontrolliert und sind unter normalen Umständen inaktiv. Als drittes Plasmid wird pJG4-5 in EGY48 transformiert. Ebenfalls kommt es zur Expression eines Fusionsproteins, das aus einem „Fischprotein“ („Prey“, verschiedene cGK-Konstrukte; siehe F.1) und dem DNS-aktivierenden „Acid loop“ Protein (besitzt eine Reihe saurer Aminosäuren) besteht. Dieses Fusionsprotein steht unter der Kontrolle eines GAL1-Promotors und wird daher nur in Gegenwart von Galaktose als Kohlenstoffquelle exprimiert. Auf diese Weise kann der Zeitpunkt der Expression durch Zugabe von Galaktose ins Medium bestimmt werden. Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen IRAG und cGK, wird die Transkription der unter den LexA-Operatoren stehenden Gene (Reporter gene) durch den „Acid loop“ aktiviert; es liegt ein funktioneller Transkriptionsfaktor vor. Somit können die Hefezellen Leucin selbst synthetisieren und auf Leucin-defizienten Medien überleben. Durch die Aktivierung des *lacZ* Gens bilden diese Hefen zusätzlich  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Enzym ist in der Lage chromogenes Substrat (X-Gal) umzusetzen, was durch Blaufärbung der Hefen sichtbar wird (Abbildung B-1 und C-18).



**Abbildung B-1: Schema des Zwei-Hybrid Systems am Beispiel IRAG/cGKI $\beta$**

Uracil (Ura), Histidin (His) und Tryptophan (Trp) dienen als Selektionsmarker für die Transformation mit den entsprechenden Plasmiden. Weitere Erklärungen siehe Text.

### Durchführung:

- Konstruktion der Köderplasmide (B.3) (pEG202 mit verschiedenen IRAG-Konstrukten (F.1), *EcoRI/BamHI* kloniert bzw. pEG202 mit cGK-Konstrukten, *EcoRI/XhoI* oder *EcoRI* (cGKII) kloniert) und der „Fischplasmide“ (pJG4-5 mit cGK-Konstrukten (F.1) bzw. IRAG, *EcoRI/XhoI* oder *EcoRI* (cGKII) kloniert). Der korrekte Leserahmen und die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft (B.3.8). Alle verwendeten Primer zur Generierung der verschiedenen Fragmente sind im Anhang (F.1) aufgeführt.
- Basischarakterisierung der Köderproteine: Ein „Bait“ ist für den Einsatz im Zwei-Hybrid System nur dann geeignet, wenn es bestimmte Bedingungen erfüllt. Es darf keine unspezifische oder vorzeitige Transkriptionsaktivierung auslösen, es muß in den Zellkern gelangen und an die LexA-Operatoren binden, eine Proteinexpression des LexA-Fusionsproteins muß nachweisbar sein. Dazu wurden vier verschiedene Versuche nach Ausubel et al. (1995) durchgeführt. EGY48 wurde dazu mit verschiedenen Plasmidkombinationen (s. Tabelle C-3) transformiert (B.3.9.2); Eigenschaften der verwendeten Plasmide siehe B.1.
- Für den eigentlichen Versuch (interagieren IRAG und cGK miteinander?) wurden Hefen mit 3 Plasmiden (pEG202-Bait, pJG4-5-Prey, pSH18-34 (Reporter)) transformiert (B.3.9.2). Um eine Interaktion erkennbar zu machen, wurden die Transformanten anschließend auf verschiedene Selektivmedien ausgestrichen.

#### Erscheinungsbild positiver Klone:

Selektivmedium	Erscheinungsbild
Glu-His-Ura-Trp+X-Gal	weiße Kolonien
Gal/Raf-His-Ura-Trp+X-Gal	blaue Kolonien
Glu-His-Ura-Trp-Leu	kein Wachstum
Gal/Raf-His-Ura-Trp-Leu	Wachstum

- Die „Fischproteine“ wurden anschließend noch auf ihre Spezifität hin überprüft (Ausubel et al., 1995), um falsch positive Klone auszuschließen.

## B.7. Isolierung und Präparation von Mausgeweben

Verschiedene Mausgewebe wurden in dieser Arbeit zur Gewinnung von Protein und für immunhistochemische Zwecke benötigt. Dafür wurden die Mauslinien C57BL/6 (Wildtypiere) und cGKI<sup>-/-</sup> (Totalknock-out der cGKI; Pfeifer et al., 1998) verwendet. Die Tiere waren etwa 4 bis 6 Wochen alt, als sie durch Genickbruch oder durch Ether getötet wurden. Für alle Tierversuche lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern mit der Nr. 211.2531-120/99 vor.

### B.7.1. Gewinnung von Protein aus Mausgeweben

Kleinere Hirnareale (z.B. der Hippocampus) wurden freundlicherweise von Hr. Dr. Thomas Kleppisch präpariert. Die verschiedenen Gewebe (s. Tabelle C-1) (je ca. 100 mg) wurden nach der Isolierung aus der Maus mit PBS (B.5.2) gespült, um Kontaminationen mit Blutzellen, oder, im Fall von Magen-Darmpräparationen mit Speiseresten und Kot, weitestgehend auszuschließen. Überflüssiges Fett- oder Fremdgewebe wurde mit einer Pinzette abgezupft. Um Proteinabbau durch Proteasen zu vermeiden, wurden die Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die einzelnen Gewebe auf Eis mit 0,25 bis 1 ml Extraktionspuffer versetzt und mit dem Ultra Turrax (IKA Werk) homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 min, 13000xg, 4°C), der Überstand abgenommen und, falls notwendig, nochmals zentrifugiert. Die so gewonnene Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration (B.4.4) ist das Gewebe 1:50 bis 1:500 verdünnt worden. Die Konzentration variierte je Gewebe von 2 µg/µl bis zu 50 µg/µl Protein.

Zur Präparation der glatten Muskelschicht der Darmwand (longitudinale und zirkuläre Muskulatur, LM/CM) wurde der Dünndarm mit kaltem PBS gespült und vom mesenterialen Gewebe befreit. Unter Spannung (Darm auf eine serologische Pipette aufziehen) wurde der Dünndarm vorsichtig mit dem Skalpell eingeritzt. Die glatte Muskelschicht konnte anschließend mit einer Pinzette von den restlichen Darmschichten abgetrennt werden. Aus der glatten Muskelschicht und dem restlichen Dünndarmgewebe wurde wie oben beschrieben Protein gewonnen.

**Extraktionspuffer:** 20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 8,0; + 2,5 mM DTT; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM Benzamidin; 2,5 mM PMSF und 1 µg/ml Leupeptin frisch zugeben

### B.7.2. Organpräparation für die Immunhistochemie

Die Mausorgane wurden nach Entnahme mit PBS (B.5.2) gespült, von Fett- und Fremdgewebe befreit und fixiert. Als Fixierung wurde Cellfix (2% Formalin, 0,2% Glutaraldehyd in PBS) bzw. etwa 8%ige Formalinlösung (in PBS) verwendet. Je nach Größe des Organs wurde 1 bis 3 h bei RT fixiert. Zur Erhaltung von Gewebestrukturen

wurde die Fixierlösung in Blase, Magen oder Darm eingespritzt. Nach der Fixierung wurde 2-3x mit PBS für insgesamt 2 h bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Organe wie folgt dehydratisiert:

50% EtOH  
70% EtOH  
80% EtOH  
90% EtOH  
100% EtOH 3x  
50% EtOH/Roticlear (Toluol-Ersatz, Roth)  
100% Roticlear 3x

Jeder Schritt der Entwässerung dauerte 30-60 min. Eine Lagerung der Organe war in PBS oder 70% EtOH möglich. Das Gewebe wurde während des 70% EtOH-Schrittes in kleine Stücke zum Einbetten geschnitten. Nach der Dehydratisierung wurden die Gewebestücke in flüssiges Paraffin (60°C, "Paraplast", Sigma) eingelegt. Es handelte sich dabei um 3 Paraffin-Schritte (I bis III), wobei das Gewebe in jedem Paraffin 2 bis 4 h verweilte. Anschließend sind die Organstücke in Paraffin III eingebettet worden. Nach dem Erkalten (Härtung) des Paraffins wurden die Organe bei 4°C gelagert.

## B.8. Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Lokalisierung von IRAG und der cGKI-Isoformen in verschiedenen Mausgeweben festzustellen. Dazu wurden Paraffinschnitte des in Paraffin eingebetteten Organs (A.7) angefertigt. Diese waren je nach Gewebe 6-12 µm dick. Zum Schneiden wurde ein Microtom (Microm HM 335 E) verwendet. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger (OT) platziert und 4-12 h bei 37°C getrocknet. Nach dem Entparaffinisieren und Rehydratisieren des Gewebes (auf OT) folgte die histologische Färbung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese mittels eines Immunperoxidase Systems (Vectastain ABC System; Vector Laboratories) oder mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die anschließend durch konfokale Laser-Scan Mikroskopie detektiert wurden, durchgeführt.

**Entparaffinisieren:** 100% Roticlear, 2x 6 min

**Rehydratisieren:** 100% EtOH, 2x ca. 4 min

90% EtOH ca. 4 min

80% EtOH ca. 4 min

70% EtOH ca. 4 min

in PBS (B.5.2) waschen; darauf achten, dass die Gewebeschnitte nicht austrocknen!

### B.8.1. Immunhistologische Färbung mittels Peroxidase

Hierzu wurde das Vectastain ABC System (Vector Laboratories) verwendet, das sich aus Avidin (Glykoprotein, das eine extrem hohe Affinität zu dem Vitamin Biotin besitzt) und einer biotinylierten Peroxidase (aus Meerrettich) zusammensetzt. Werden diese beiden

Substanzen gemischt, so bilden sie einen sehr stabilen **Komplex**. Zunächst werden die Gewebeschnitte mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der gegen den Organismus des ersten gerichtet und biotinyliert ist (Vectastain). Dazu wird der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex gegeben. Die Peroxidaseaktivität wird anschließend durch ein Substrat, Diaminobenzidin (DAB; Sigma) detektiert, das ein braunes Präzipitat auf den Schnitten bildet. Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind im Anhang (F.3) mit der Angabe der jeweiligen Verdünnung und der Herkunft aufgelistet. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte ohne primären Antikörper oder mit Antigen präadsorbiertem (depletierem) Antikörper inkubiert. Im Fall der cGKI konnte zusätzlich das Gewebe von *cGKI<sup>-/-</sup>* Mäusen (B.7.) verwendet und mit den entsprechenden cGKI-Antikörpern inkubiert werden.

### **Durchführung:**

- OT mit entparaffinisierten und rehydratisierten Schnitten (B.8) in eine feuchte Kammer legen und mit einem Fettstift (ImmEdge<sup>TM</sup> Pen, Vectastain) umranden
- Zum Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität 3-10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-30% Methanol in PBS (B.5.2) auf die Gewebeschnitte geben und für 10 min bei RT inkubieren
- Um das Gewebe stärker zu permeabilisieren, können bis zu 1% Tween in o.g. Puffer gegeben werden. Verbessert Antigenzugang v.a. bei Membran-gebundenen Proteinen (z.B. IRAG)
- Schnitte kurz in PBS waschen und anschließend mit 5% NGS (Normal Goat Serum; Vectastain) in PBS 1 h bei RT inkubieren (freie Proteinbindungsstellen werden blockiert)
- Primären Antikörper in 3%-NGS-PBS verdünnen (siehe F.3), auf die Schnitte aufträufeln und üN bei 4°C inkubieren
- Antikörper abnehmen und 3x 5 min mit 0,5% NGS-PBS waschen
- Sekundären Antikörper (biotinylierte Goat-anti-rabbit IgG; Vectastain) 1:200 in 3%-NGS-PBS verdünnen und für 1 h bei RT auf die Schnitte geben
- Lösung A und B in PBS geben (je 1:100) und sofort gut vortexen, 30 min im Dunklen stehen lassen
- In der Zwischenzeit Schnitte 3x 10 min mit 0,5%-NGS-PBS waschen
- AB-Komplex auf die gewaschenen Schnitte träufeln und 1 h im Dunklen inkubieren
- 3x 10 min mit PBS waschen
- Färbung mit 0,05% DAB in PBS (+ 1 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 2,5 ml) 2-10 min; Reaktion durch Waschen mit PBS (3x 5 min) stoppen
- OT mit Aquatex (Merck) einbetten, dabei Deckgläser möglichst luftblasenfrei auflegen, mind. 15 min trocknen lassen
- Stets darauf achten, dass die Gewebeschnitte nicht austrocknen!

Die gefärbten Schnittpräparate wurden anschließend mit dem Mikroskop Axioskop (Zeiss) im Hellfeld bei einer Vergrößerung von 100-400x ausgewertet und fotografiert. Zur Dokumentation wurde entweder eine Nikon Kamera Typ F 301 mit einem Kodakfilm (EPY 64 T) oder eine digitale Kamera (Nikon D1x) verwendet. Zur Nachbearbeitung der Bilder wurde das Computerprogramm „Adobe Photoshop 5.5“ verwendet.

## B.8.2. Immunhistologische Färbung mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper

Dafür wurden FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat) bzw. Cy3- (Indocarbocyanin) gekoppelte sekundäre Antikörper (Dianova) eingesetzt. Alle verwendeten Antikörper sind mit ihrer Herkunft und Verdünnung im Anhang (F.3) aufgeführt. Die spezifische Bindung der Antikörper wurde durch Weglassen des primären Antikörpers oder durch Ersatz mit Kaninchen-IgG überprüft. Zusätzlich wurde der IRAG-AK mit Antigen präinkubiert, oder im Fall der cGKI *cGKI*<sup>-/-</sup> Gewebe verwendet.

### Durchführung:

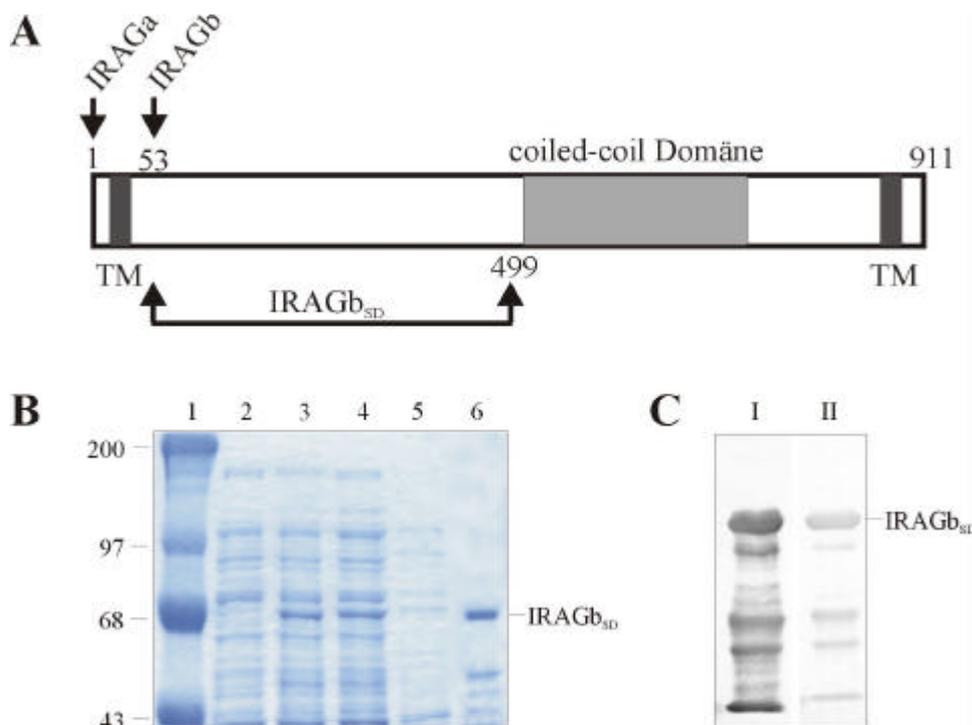
- OT mit entparaffinisierten und rehydratisierten Schnitten (B.8) in eine feuchte Kammer legen und mit einem Fettstift (ImmEdge™ Pen, Vectastain) umranden
- Um das Gewebe stärker zu permeabilisieren, bis zu 1% Tween in 0,5% NGS-PBS für 10-20 min bei RT inkubieren (für IRAG)
- Schnitte kurz in PBS (B.5.2) waschen und anschließend mit 5% NGS (Normal Goat Serum; Vectastain) in PBS 1 h bei RT inkubieren (freie Proteinbindungsstellen werden blockiert)
- Primären Antikörper in 3%-NGS-PBS verdünnen (F.3), auf die Schnitte aufträufeln und üN bei 4°C inkubieren
- Antikörper abnehmen und 3x 5 min mit 0,5% NGS-PBS waschen
- Sekundären Antikörper (FITC bzw. Cy3-gekoppelt; s. F.3) in 3%-NGS-PBS verdünnen, auf die Schnitte geben und 1-1,5 h bei RT im Dunklen inkubieren
- 2x 5 min mit 0,5% NGS-PBS, 1x 5 min mit PBS waschen; darauf achten, dass Schnitte mit Alu abgedeckt sind, sonst bleicht Fluoreszenz aus
- Gewebeschnitte niemals austrocknen lassen
- OT mit ProLong® Antifade Kit (Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers einbetten (immer frisch herstellen!), dabei Deckgläser möglichst luftblasenfrei auflegen. Dieses Einbettmedium schützt Fluoreszenzfärbungen für mehrere Wochen vor dem Ausbleichen. OT üN bei 4°C im Dunklen trocknen lassen; die Lagerung erfolgt ebenfalls bei 4°C im Dunklen.

Die Analyse der Schnitte erfolgte durch konfokale Laser-Scan Mikroskopie (Leica DM IRB). Die fluorochromen Konjugate wurden von einem Krypton-Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm (zur Detektion von FITC) bzw. von einem Helium-Neon Laser bei 543 nm (für Cy3) angeregt und die optischen Einzelschnitte mit einem 63er Objektiv (Ölimmersion) und verschiedenen Zoomfaktoren aufgenommen. Bei den Kontroll-experimenten zur Spezifität der einzelnen Antikörper wurde besonders darauf geachtet, die Einstellung der Lochblende („pinhole“) und die Empfindlichkeit des Restlichtverstärkers konstant zu halten.

## C. Ergebnisse

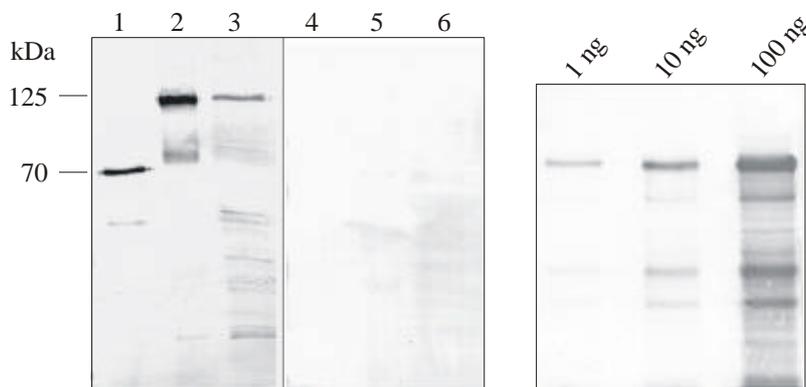
### C.1. Generierung eines spezifischen IRAG-Antikörpers

Um das neu identifizierte Mitglied der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade „IRAG“ protein-biochemisch untersuchen zu können, war es notwendig einen spezifischen Antikörper gegen IRAG herzustellen. Dazu wurde ein ca. 70 kDa großes Fragment von IRAG, IRAGb<sub>SD</sub> (SD, soluble domain), der lösliche Teil bis zur coiled-coil Domäne (Abb. C-1), mit einem His-„Tag“ in dem Protease-defizienten *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS exprimiert. Die Expression mit einem His-„Tag“ ermöglichte es, IRAGb<sub>SD</sub> mittels Ni-NTA-Agarose affinitätschromatographisch aus dem Proteinlysate der Bakterien zu isolieren. Die bakterielle Expression von IRAGb<sub>SD</sub> und die anschließende Reinigung ergab eine Proteinausbeute von etwa 50 mg bei einem Ansatz von insgesamt 2,5 l Bakterienkultur (B.4.1.2 und 4.2). Die Reinheit des Proteins wurde durch Coomassie-Färbung und Westernblotanalyse (B.4.6) abgeschätzt und betrug etwa 98% (Abb. C-1).



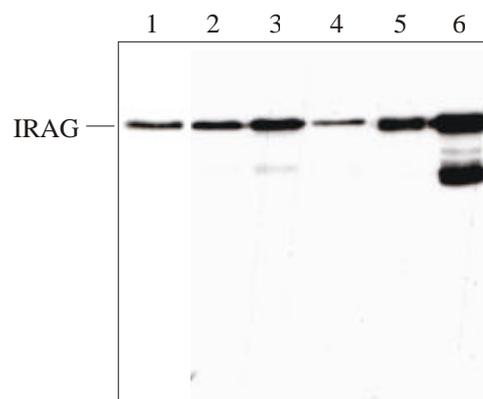
**Abbildung C-1: Bakterielle Expression von IRAGb<sub>SD</sub>.** A) Lokalisation des zur AK-Produktion verwendeten IRAGb<sub>SD</sub>; dieses lösliche Fragment besteht aus 447 AS (AS 53-499). B) Coomassie-Gel: Spur 1: Proteinmarker, angegeben sind kDa; Spur 2: Kontrolle, vor der Proteininduktion mit IPTG; Spur 3: Proteinexpression nach 3 h IPTG-Induktion; Spuren 4 und 5: zeigen den Überstand (Spur 4) und das Sediment (Spur 5) des mit Ultraschall behandelten Bakterienlysates. Das meiste IRAGb<sub>SD</sub>-Protein befindet sich im Überstand und ist somit löslich. Spur 6: Protein nach affinitätschromatographischer Reinigung, aufgetragen sind etwa 9 µg. C) Westernblot des gereinigten Proteins: links (I) erfolgte eine Immundetektion (B.4.6.3) mit dem Peptid-AK 130-3, rechts (II) mit einem monoklonalen His-AK; ein AP-gekoppelter sekundärer AK wurde verwendet (F.3); es sind jeweils 3 µg IRAGb<sub>SD</sub> aufgetragen. Das Protein ist etwa 70 kDa groß, bei den zusätzlichen Banden mit niedrigerem Molekulargewicht handelt es sich um Abbaubanden, da sie mit präadsorbiertem Antikörper nicht mehr zu detektieren sind.

Das reine rekombinante Protein wurde drei Kaninchen injiziert, damit diese polyklonale Antikörper gegen IRAG produzieren. Vier Wochen nach der ersten Injektion mit dem Antigen wurden die Kaninchen erneut immunisiert, dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Präimmunsersum zur Kontrolle abgenommen (B.4.3). Nach dem zweiten „Boost“ konnten die Seren gewonnen werden, die auf das Vorhandensein der spezifischen Antikörper untersucht wurden. Dazu wurden Westernblots vom Antigen (gereinigtes rekombinantes IRAG<sub>SD</sub>) oder von mikrosomalen Membranen des bovinen Trachealmuskels (MIP) angefertigt und mit den Seren bzw. präadsorbierten Seren (Antikörper mit 0,1 mM Antigen 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend 1:1000 verdünnt) immundetektiert (Abb. C-2). Die Sensitivität und die Spezifität der Seren stieg mit der Zahl der Immunisierungen, da die Kaninchen nach etwa vier Wochen statt IgM vermehrt IgG bilden. Um auch in Geweben, die vergleichsweise geringe Konzentrationen an IRAG aufweisen, das Protein mittels Westernblot detektieren zu können, ist es wichtig, dass der Antikörper IRAG im ng-Bereich erkennt. Durch Westernblots mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens konnte gezeigt werden, dass bereits 1 ng des rekombinanten IRAG<sub>SD</sub> erkannt wird (Abb. C-2). Das bedeutet, der Titer des Antikörpers ist hoch genug, um IRAG in Geweben detektieren zu können. Die Seren der drei immunisierten Kaninchen unterschieden sich nicht in der Sensitivität und der Spezifität.



**Abbildung C-2: Spezifität und Sensitivität des IRAG-Antikörpers.** Linkes Bild zeigt die Spezifität: Westernblot mit 50 ng IRAG<sub>SD</sub> (1 u. 4), 10 µg MIP (2 u. 5) und 50 µg Uterus-Protein (3 u. 6), wobei Spur 1-3 mit Serum und Spur 4-6 mit Antigen präadsorbiertem Serum, jeweils 1:1000 verdünnt, immundetektiert wurde. IRAG hat ein Molekulargewicht von 125 kDa; bei den Proteinbanden, die kleiner sind, handelt es sich um IRAG-Abbau, da diese Banden durch Präadsorbition mit Antigen nicht mehr zu detektieren sind. Das Gleiche gilt für das rekombinante Protein. Auf der rechten Seite ist die Sensitivität des Antikörpers durch einen Westernblot mit verschiedenen Mengen des IRAG<sub>SD</sub> zu sehen, wobei bereits 1 ng Antigen erkannt wird. Ein AP-gekoppelter sekundärer Antikörper wurde verwendet (F.3).

Im Anschluss wurden die spezifischen Antikörper affinitätschromatografisch gereinigt, indem das Antigen an einer CNBr-aktivierten Sepharose immobilisiert und mit Antiserum inkubiert wurde. Die IRAG-IgGs wurden mittels 3,75 M MgCl<sub>2</sub> bzw. 0,1 M Glycin, pH 2,5 eluiert, während unspezifische Antikörper ausgewaschen wurden. Die Elution erfolgte in mehreren Fraktionen. Die Eluate, die nach photometrischer Vermessung (B.4.4) die höchsten Antikörperkonzentrationen enthielten, wurden gepoolt und dialysiert. Die unterschiedlichen Elutionsbedingungen ergaben keinen Unterschied hinsichtlich der Reinheit und Spezifität der Antikörper in der Immunoblotanalyse. Nur das Volumen der Antikörper nach der Dialyse war nach MgCl<sub>2</sub>-Elution etwa doppelt so viel wie nach 0,1 M Glycin-Elution. Dies konnte entweder durch eine niedrigere Verdünnung des Antikörpers oder durch Aufkonzentrieren (B.4.5) kompensiert werden. Die Empfindlichkeit und Spezifität des gereinigten IRAG-Antikörpers wurde anhand verschiedener Gewebelysate im Westernblot untersucht. Identische Membranen wurden entweder mit IRAG-IgGs oder mit präadsorbiertem Antikörper immundekoriert. Es wurde häufig nur eine Proteinbande detektiert, deren Mobilität im SDS-PAGE (9%; B.4.6.1) einem Molekulargewicht von 125 kDa, der Größe von IRAG, entsprach. Zusätzliche Banden mit niedrigerem Molekulargewicht stellten sich als IRAG-Abbau heraus, da bei Präadsorbition des Antikörpers mit 0,1 mM Antigen keine dieser Banden angefärbt werden konnte (Abb C-3). Es fällt allgemein auf, dass IRAG sehr leicht durch Proteasen abgebaut wird. Bei der Identifizierung des trimeren cGKI-Komplexes (A.1.4) stellten sich zwei weitere potentielle Substrate der cGKI (G<sub>3</sub> und G<sub>4</sub>), als IRAG-Abbau heraus (Schlossmann et al., 2000; Koller, 2002)



**Abbildung C-3: Spezifität des gereinigten IRAG-Antikörpers im Gewebe.** Immunoblot mit verschiedenen Gewebelysaten (B.7.1). Gefärbt wurde der Blot mit gereinigtem IRAG-AK (1:500) und POD-konjugiertem sekundären AK (F.3). Spur 1-4: Mausgewebe (1: Aorta, 2: Uterus, 3: Blase, 4: Blase aus *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäusen; es wurden jeweils 50 µg Protein pro Spur aufgetragen), Spur 5: Membranen humaner Thrombozyten (10 µg), Spur 6: mikrosomale Membranen des bovinen Trachealmuskels (15 µg). Ein identischer Blot wurde mit präadsorbierten AK inkubiert, wobei sich keinerlei Färbung detektieren ließ.

Die Generierung eines IRAG-Antikörpers brachte ein nützliches Werkzeug zur weiteren proteinbiochemischen Untersuchung von IRAG hervor. Der Antikörper ist sehr sensitiv, da er bereits 1 ng Antigen im Westernblot erkennt. Die Spezifität ist auch sehr hoch, da nach Präadsorption des Antikörpers keine unspezifischen Banden detektiert werden konnten. Des Weiteren ist dieser Antikörper zur Detektion von IRAG aus Geweben verschiedener Spezies (Maus, Mensch, Rind) geeignet.

## **C.2. Gewebsexpression von IRAG und der cGMP-Kinase I**

Das Proteinexpressionsmuster von IRAG, ein neues Substratprotein der cGKI, war bisher nicht aufgeklärt worden. Lediglich Northernblot Untersuchungen an humanen und bovinen Geweben und wenige Westernblotanalysen von boviner Aorta und Trachea mittels eines Peptidantikörpers existierten (Schlossmann et al., 2000). Um eine Vorstellung zu bekommen, welche Funktion IRAG in dem NO/cGMP/cGKI-Signalweg haben könnte, ist es wichtig zu wissen, in welchen Organen und in welcher Konzentration das Protein tatsächlich exprimiert wird, und ob IRAG in den gleichen Geweben wie die cGKI vorkommt. Das Vorkommen der cGKI in Mausgeweben wurde ebenfalls bisher nicht genauer hinsichtlich der cGKI-Isoformen untersucht. In dieser Arbeit sollte deshalb das Proteinexpressionsmuster der cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und von IRAG aufgeklärt werden.

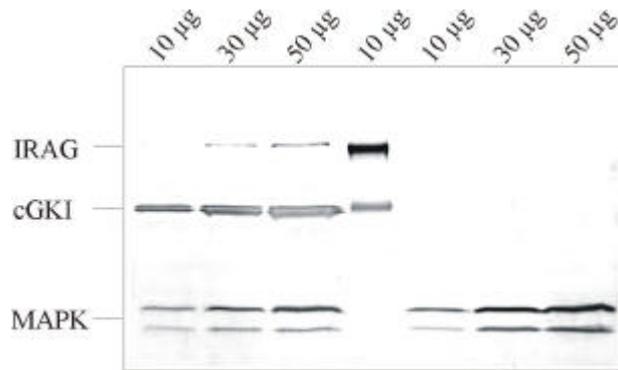
### **C.2.1. Immunoblotanalyse von IRAG**

Das Vorkommen von IRAG wurde mit einem spezifischen Antikörper (B.4.3; C.1) in Gesamtproteinextrakten verschiedener Mausgewebe mittels Immunoblots (B.4.6.3) analysiert. Bei der Gewinnung von Protein aus Mausgeweben wurde stets darauf geachtet, dass die Organe frei von Fremdgewebe (z.B. Fettgewebe) und Blut sind (B.7.1), da dies das Ergebnis verfälschen könnte. Es wurden insgesamt 24 verschiedene Gewebe untersucht. IRAG wird nicht bzw. unterhalb der Detektionsgrenze in folgenden Geweben exprimiert: Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Hoden, Skelettmuskel, Gesamthirn, Thalamus-Region, Kleinhirn, Bulbus olfactorius und Hippocampus. Es wurden jeweils bis zu 100  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen und analysiert. Geringe Expression von IRAG zeigte sich im Herzen, Nebenhoden, Milz und Ileum. Stark wird IRAG in Aorta, Trachea, Lunge, Uterus, Blase, Magen und Colon exprimiert (Abb. C-4). Es fiel sofort auf, dass es sich dabei mit Ausnahme der Lunge um glattmuskuläre Organe handelt. In der Lunge finden sich ebenfalls Strukturen, die glatte Muskelzellen enthalten. Es handelt sich hierbei um die Bronchien, die einen ähnlichen Aufbau wie die Trachea haben. Zusätzlich zeigte IRAG eine hohe Expression in murinen und humanen Thrombozyten.



**Abbildung C-4: Proteinexpression von IRAG in verschiedenen Geweben.** Gezeigt ist ein Westernblot verschiedener Gewebe, der mit dem IRAG-AK (F.3) immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde (B.4.6). Die jeweilige Gesamtproteinmenge, die aufgetragen wurde, ist angegeben. Es handelt sich um Mausgewebe mit Ausnahme der Thrombozytenmembranen, die human sind.

Eine Sonderstellung nahm der Dünndarm ein, der in Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt wird. Sowohl im Magen als auch im Colon wurde IRAG stark, im Ileum nur schwach exprimiert. Im Duodenum und Jejunum konnte keine Expression detektiert werden, was verwunderlich war, da der Verdauungstrakt im Prinzip jeweils den gleichen Aufbau besitzt (siehe Abb. C-8). Dieser besteht aus einer Muscularis (glatte Muskelschicht), Submucosa (Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen) und der Mucosa (Zottengewebe, Epithel). Deshalb wurde die glatte Muskelschicht des Dünndarms präpariert (B.7.1) und analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass IRAG auch im Duodenum und im Jejunum, also im gesamten Dünndarm vorhanden ist. IRAG-Protein konnte nur in der glatten Muskelschicht, nicht in dem restlichen Dünndarmgewebe (Submucosa und Mucosa) gefunden werden (Abb. C-5). Wie bereits erwähnt (C.1.), ist IRAG sehr anfällig gegenüber Proteasen. Da im Dünndarm sehr viele Verdauungsenzyme vorkommen, ist es wahrscheinlich, dass IRAG bei der Präparation des gesamten Dünndarms bzw. der Einzelabschnitte durch diese vollständig proteolytisch wird.



**Abbildung C-5: Immunoblotanalyse nach Präparation der glatten Muskelschicht des Dünndarms.** Die ersten drei Spuren des Westernblots zeigen verschiedene Mengen des Gesamtproteins aus dem glatten Muskel des Dünndarms, gefolgt von Membranen des Trachealmuskels (MIP) und von verschiedenen Mengen des restlichen Dünndarm-Proteins (Protein aus Submucosa und Mucosa). MIP wurde als Kontrolle hinsichtlich der Mobilität von IRAG und cGKI im SDS-Gel verwendet (Vergleich des MG), MAP-Kinase ist als interner Standard eingesetzt worden, wobei es in MIP nicht vorkommt, da es ein lösliches Protein ist. IRAG und auch cGKI können mit spezifischen AK nur in der glatten Muskelschicht detektiert werden. MAPK hingegen in beiden Protein-Präparationen. AK siehe F.3; als sekundärer AK wurde ein AP-gekoppelter AK verwendet.

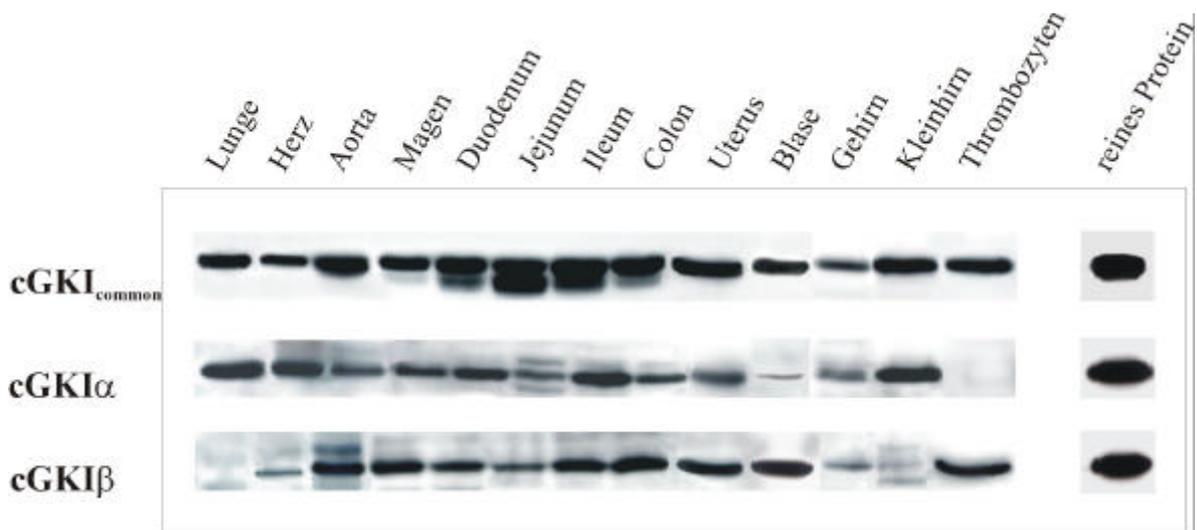
Eine semiquantitative Aussage über die Konzentration von IRAG im Gewebe konnte durch den Vergleich verschiedener Konzentrationen des rekombinanten Proteins und definierten Gewebsmengen mittels Westernblot getroffen werden (nicht gezeigt). Dabei wurde abgeschätzt, dass IRAG-Protein in Membranen des bovinen Trachealmuskels und von Thrombozyten mit etwa 3 µg, in glattmuskulären Geweben mit 200 bis 600 ng und in peripheren Geweben unter 50 ng pro mg Gesamtprotein vertreten ist.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass IRAG primär in Organen mit glatter Muskulatur und in Thrombozyten exprimiert wird, und kaum oder überhaupt nicht in peripheren Geweben oder im Gehirn. Als nächstes sollte die Lokalisierung von IRAG mittels Immunhistochemie in diesen Geweben untersucht werden.

### C.2.2. Immunoblotanalyse der cGKI

Das Proteinexpressionsmuster der cGKI-Isoformen (cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$ ) wurde mit spezifischen Antikörpern mittels Westernblots (B.4.6.3) untersucht. Die beiden Antikörper für die cGKI Splicevarianten sind selektiv für die unterschiedlichen N-terminalen Domänen der Kinase (A.1.2) (Schlossmann et al., unveröffentlicht). Zusätzlich wurde ein cGKIcommon-AK verwendet, der die identische C-terminale Domäne von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  erkennt (F.3). Insgesamt wurden 24 verschiedene Gewebe, die von Blut und Fremdgewebe befreit waren, zu Proteinextrakten verarbeitet (B.7.1) und mit diesen drei Antikörpern analysiert. Die Titer dieser cGKI-Antikörper waren etwa gleich hoch, da eine definierte Menge rekombinanten Enzyms mittels Immunoblotanalyse unter denselben Bedingungen vergleichbar detektiert wurde (Abb. C-6). Dadurch ist es möglich, eine qualitative Bewertung über die Expressionsintensität der beiden Isoformen abzugeben. Die cGKI ist ubiquitär im Körper verteilt, sie kann u.a. im Gehirn (Cerebellum, Hippocampus,

Bulbus olfactorius, Thalamus-Region), in glattmuskulären (Aorta, Uterus, Blase, Magen-Darmtrakt) und in peripheren Geweben (Niere, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Leber, Milz, Hoden) und in Thrombozyten detektiert werden. Das Expressionsmuster der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  wurde mit dem von IRAG verglichen. Es stellte sich heraus, dass das Vorkommen von cGKI $\beta$  ähnlich dem von IRAG ist. cGKI $\beta$  zeigte hohe Expression in Aorta, Magen, Colon, Uterus, Blase und Thrombozyten. cGKI $\alpha$  war hingegen im Kleinhirn, Herz und Lunge stark vertreten (Abb. C-6). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die cGKI im Dünndarm nur in der Darmwand (glatte Muskelschicht) vertreten ist (siehe Abb. C-5).



**Abbildung C-6: Proteinexpression der cGKI in verschiedenen Geweben.** Gezeigt sind Westernblots (jeweils unter denselben Bedingungen entwickelt), von verschiedenen Geweben, die mit den unterschiedlichen cGKI-Antikörpern (F.3) immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurden (B.4.6). Es sind jeweils 50  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen worden, einzige Ausnahme sind die Thrombozytenmembranen mit 20  $\mu$ g. Es handelt sich auch mit Ausnahme der Thrombozyten, die human sind, um Mausgewebe. Jeweils 10 ng reines Protein der entsprechenden cGKI-Isoform wurde mitaufgetragen, im Fall der cGKI<sub>common</sub>-Detektion wurde das  $\beta$ -Isoenzym verwendet. Die cGKI hat ein Molekulargewicht von etwa 78 kDa; die Proteinbanden die zusätzlich unterhalb detektiert wurden, zeigen cGKI-Abbau. Bei den vereinzelt schwachen Proteinbanden, die oberhalb der cGKI-Lauffront liegen, könnte es sich um posttranslationale Modifikationen handeln. Durch z.B. Glycosylierung, Myristoylierung oder Phosphorylierung verändert sich die Mobilität der Enzyme im SDS-Gel.

In Organen, die aus glatter Muskulatur bestehen, liegt die cGKI überwiegend als  $\beta$ -Isoform vor. Da IRAG und die cGKI $\beta$  in vielen Geweben gemeinsam gefunden werden, ist deren Lokalisierung innerhalb dieser Gewebe als nächstes untersucht worden. Auch die beiden cGKI-Splicevarianten überschneiden sich in ihrer Expression, z.B. im Magen-Darmtrakt, deshalb sollte die Lokalisierung der cGKI $\alpha$  ebenfalls analysiert werden.

Eine Zusammenfassung der unter C.2 analysierten Ergebnisse ist in Form einer Tabelle (Tab. C-1) im Anschluss wiedergegeben.

**Tabelle C-1: Zusammenfassung der IRAG und cGKI Proteinexpression in verschiedenen Geweben.** Das Vorkommen von IRAG, cGKI und deren Isoformen in den einzelnen Geweben wurde durch Immunoblotanalyse qualitativ abgeschätzt. Es handelt sich mit Ausnahme der Thrombozyten, die human sind, um Mausgewebe. „+++“ bedeutet hohe, „++“ mittlere, „+“ geringe und „-“ keine (bzw. nicht detektierbare) Expression.

Gewebe	IRAG	cGKI	cGKIb	cGKIa
Gesamthirn	-	+	+	+
Kleinhirn	-	++	+/-	++
Thalamus-Region*	-	+	+	+
Hippocampus*	-	+	+	+
Bulbus olfactorius*	-	+	+	+
Trachea*	++	++	+	+/-
Lunge	++	+++	-	+++
Herz	+	++	+	++
Aorta	+++	+++	+++	++
Magen	+++	+++	+++	++
Duodenum	+	+++	++	++
Jejunum	+	+++	+	+
Ileum	+	+++	++	++
Colon	+++	+++	+++	++
Uterus	+++	+++	+++	++
Hoden*	-	+	+/-	+/-
Nebenhoden*	+	++	+	+
Blase	+++	+++	+++	+
Leber*	-	+	+	+
Milz*	+	++	+/-	++
Bauchspeicheldrüse*	-	++	+	++
Niere*	-	+	+/-	+/-
Skelettmuskel*	-	+	-	+
Thrombozyten <sub>(human)</sub>	+++	+++	+++	-

\* z.T. nicht gezeigte Daten

### C.3. Lokalisierung von IRAG und der cGKI im Gewebe

Ein Forschungsschwerpunkt in unserem Labor ist die Untersuchung von Proteinen, welche die zytosolische Kalziumkonzentration im glatten Muskel modulieren. Der intrazelluläre Kalziumspiegel beeinflusst u.a. die Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzellen und damit den Tonus von Gefäßen und gastrointestinalen Organen. Die cGKI spielt bei der NO-induzierten Relaxation der glatten Muskulatur eine wichtige Rolle, jedoch ist nicht bekannt, welche der cGKI-Isoformen daran beteiligt ist. Auch IRAG moduliert die intrazelluläre Kalziumkonzentration in COS-7 Zellen und könnte somit an der Relaxation glatter Muskelzellen beteiligt sein. Nachdem die Westernblotanalyse von C.2 gezeigt hat, dass IRAG und v.a. die I $\beta$  Isoform, weniger das I $\alpha$  Enzym der cGKI stark in glattmuskulären Geweben exprimiert werden, sollte diese Proteinexpression bezüglich der Lokalisierung im Gewebe genauer charakterisiert werden. Eine Fragestellung dabei war, ob sich diese Proteine tatsächlich in der glatten Muskulatur befinden. Besonders im Fall von IRAG kann die Lokalisierung neue Informationen hinsichtlich der Funktion in der NO-Signaltransduktion liefern.

Die Lokalisierung von IRAG und der cGKI wurde mittels immunhistochemischer Untersuchungen (B.8) festgestellt. Paraffinschnitte verschiedener Organe (B.7.2) wurden entweder mit Peroxidase- oder Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern inkubiert, und anschließend durch DAB-Färbung (B.8.1) bzw. konfokale Laser-Scan Mikroskopie (B.8.2) analysiert.

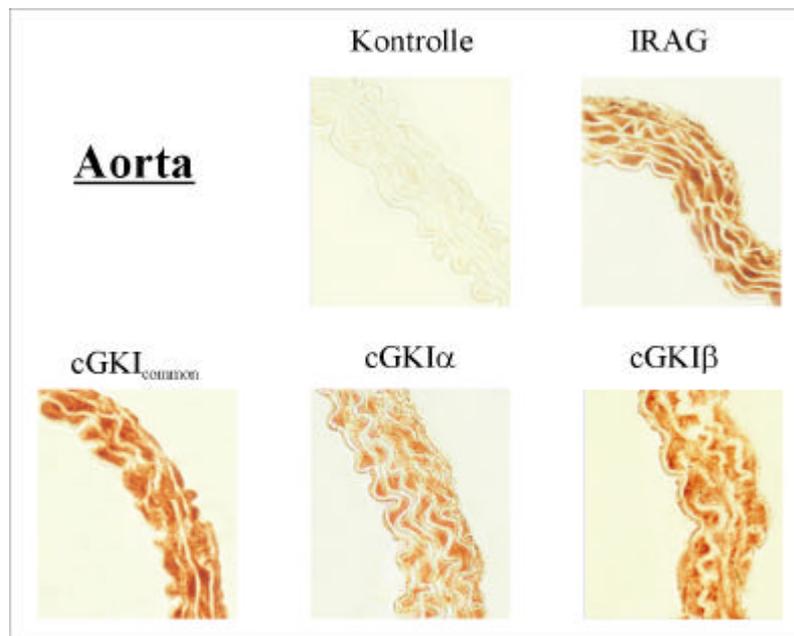
#### C.3.1. Lichtmikroskopische Untersuchung

Die mit spezifischen primären Antikörpern und dem biotinylierten POD-konjugierten sekundären Antikörper (F.3) inkubierten Paraffinschnitte wurden mit DAB (Diaminobenzidin) gefärbt. Die Auswertung der gefärbten Schnittpräparate erfolgte mit dem Mikroskop Axioskop im Hellfeld bei einer 100 bis 400-fachen Vergrößerung. In der vorliegenden Arbeit wurden v.a. die Aorta, der Magen-Darm-Trakt, der Uterus, die Trachea - also vorwiegend glattmuskuläre Gewebe - sowie das Cerebellum eingehend immunhistochemisch analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte ohne primären Antikörper oder mit präadsorbiertem Antikörper inkubiert. *cGKI*<sup>-/-</sup> Gewebe wurde im Fall der cGKI zusätzlich als Kontrolle verwendet (B.8.1), das mit allen cGKI-Antikörpern inkubiert wurde. Aus Platzgründen ist aber immer nur eine Kontrolle aufgeführt.

#### Aorta

Die Aorta ist eine Arterie vom elastischen Typ und besteht aus folgenden Schichten: Intima, Media und Adventitia. Die Intima begrenzt das Gefäßlumen durch einschichtige Endothelzellen. Die Adventitia, bestehend aus Bindegewebe, verbindet die Aorta mit ihrer Umgebung. Die Media wird von einer dichten Schicht zirkulär oder spiralförmig

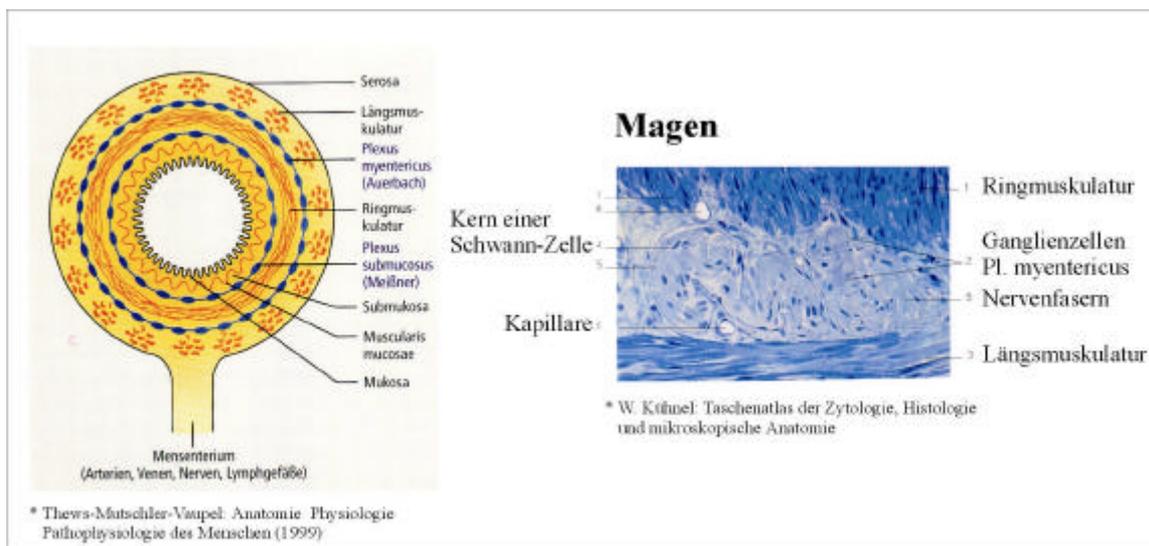
angeordneter, glatter Muskelfasern gebildet, zwischen denen Bindegewebsfasern (elastische Fasern und kollagene Fibrillen) liegen. Die Struktur der Aorta erscheint wellblechartig. Durch die immunhistologische Färbung der Aorta mit spezifischen Antikörpern gegen IRAG, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und cGKIcommon (F.3), konnte gezeigt werden, dass diese Proteine in den glatten Muskelzellen der Media exprimiert werden (braune Färbung). Die elastischen Fasern erscheinen weiß (Abb. C-7). Zwischen den Splicevarianten der cGKI konnte kein großer Unterschied festgestellt werden. Allerdings erschien es, rein optisch, dass die cGKI $\beta$  stärker als die  $\alpha$  exprimiert ist. Als Kontrolle für die Spezifität der Antikörperfärbung in Myozyten wurde im Fall der cGKI zusätzlich die Aorta einer *cGKI*<sup>-/-</sup> Maus (Knock-out) verwendet, und mit den verschiedenen cGKI-Antikörpern inkubiert. Bei IRAG wurde der Antikörper mit Antigen präadsorbiert. Es befanden sich immer Wildtyp- und Knock-out-Schnitte auf einem Objektträger, damit dieselben Inkubationsbedingungen gewährleistet waren. Da bei allen Kontrollen keinerlei Färbung nachgewiesen werden konnte, ist aus Platzgründen nur eine Kontrolle einer *cGKI*<sup>-/-</sup> Aorta aufgeführt, die mit dem cGKIcommon-Antikörper inkubiert wurde. Interessant war, dass IRAG auch in *cGKI*<sup>-/-</sup> Aorten gefunden wurde, allerdings reduziert (nicht gezeigt). Diese Beobachtung konnte auch im Fall der Blase mittels Westernblot gemacht werden (Abb. C-3).



**Abbildung C-7: Expression von IRAG und cGKI in der Aorta.** Gezeigt ist ein Querschnitt durch eine Mauseorta. Sowohl IRAG als auch die cGKI werden in den Myozyten der Media exprimiert. Die Paraffinschnitte waren 6  $\mu$ m dick und wurden mittels POD-konjugiertem sekundären AK, dem ABC-Vectastain Kit und DAB gefärbt (B.8.1). Vorliegende Kontrolle zeigt eine *cGKI*<sup>-/-</sup> Aorta, die mit dem cGKIcommon-AK inkubiert wurde. Originalvergrößerung x400. Verwendete AK siehe F.3.

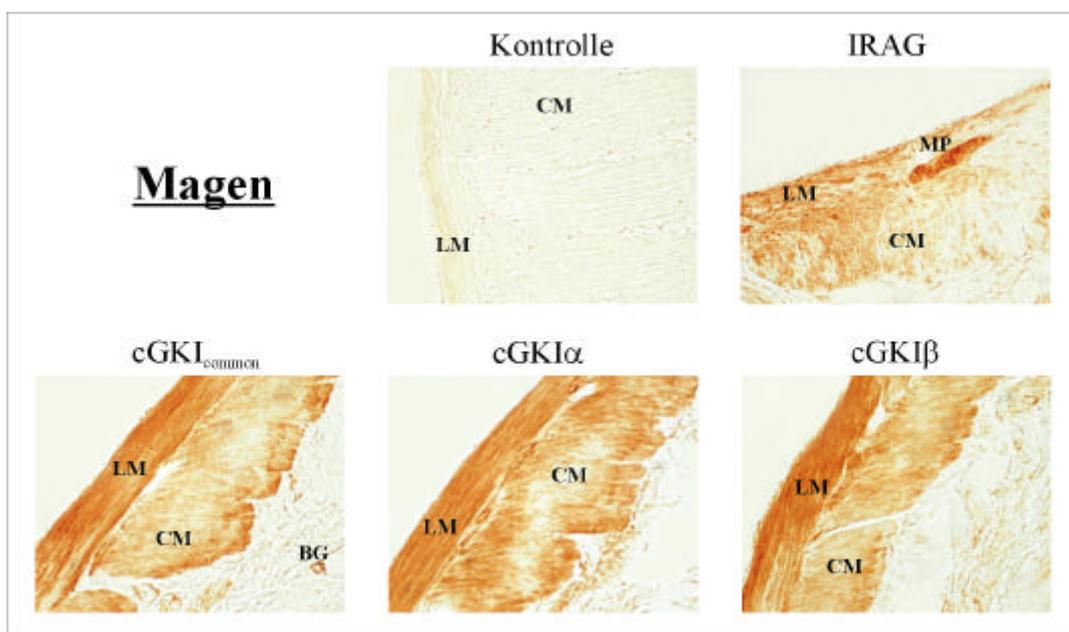
## Magen-Darmtrakt

Der gesamte Magen-Darmkanal ist in allen Abschnitten grundsätzlich gleich gebaut. Er wird in mehrere Schichten von außen nach innen unterteilt (Abb. C-8). Variationen innerhalb dieser Schichten kennzeichnen die einzelnen Darmabschnitte. Die Serosa, Bindegewebshaut, umschließt den Darm. Die Muscularis besteht aus Bündeln glatter Muskulatur, die in eine Längs- und eine Ringmuskulatur unterteilt wird. Sie ist der motorisch wirksame Teil des Darms. Es folgt die Submucosa, lockeres Bindegewebe mit größeren Blut- und Lymphgefäßen, die der Versorgung der Mucosa dient. Die Mucosa kleidet das Darmrohr aus und besteht aus einer Epithelschicht, aus Schleimhautbindegewebe, einem wichtigen Immunorgan, gefolgt von der Muscularis mucosae. Diese Schicht ist aus einander spiralig überkreuzenden, die Schleimhaut umkreisenden Bündelchen glatter Muskelzellen zusammengesetzt; sie ermöglicht die Eigenmotilität der Mucosa. Der Gastrointestinaltrakt verfügt über ein eigenes enterisches Nervensystem (ENS), das die elementaren motorischen und sekretorischen Funktionen steuert. Das ENS besteht aus dem zwischen der Längs- und Ringmuskulatur liegenden Plexus myentericus, beeinflusst den Muskeltonus und den Rhythmus der Kontraktionen (Peristaltik), und dem Plexus submucosus, der sekretorische Funktionen steuert (Abb. C-8).



**Abbildung C-8: Wandschichten des Magen-Darmkanals in schematischer Darstellung.** Zusätzlich ist der myenterische Plexus (MP) eines Magen-Schnittpräparates dargestellt. \* Quellenverweis

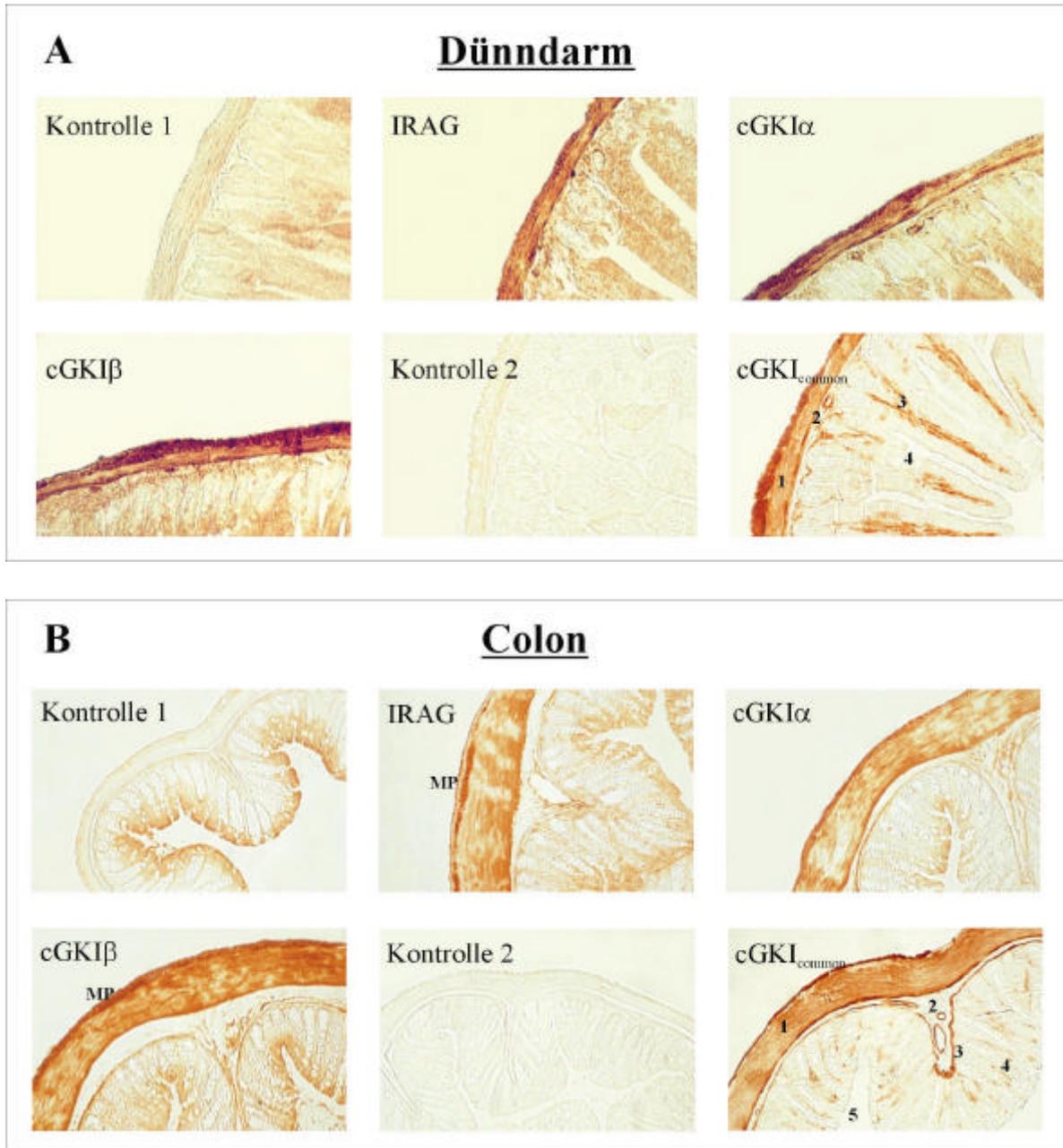
Zunächst wurden Längsschnitte vom Magen angefertigt (12  $\mu\text{m}$ ) und wie beschrieben immunhistologisch gefärbt (Abb. C-9). Als primäre Antikörper sind der cGKI<sub>common</sub>, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und der IRAG-Antikörper verwendet worden. Deutliche Expression der cGKI und ihrer Isoformen konnte in der Muscularis, hier sowohl in der Längs- als auch in der Ringmuskulatur, detektiert werden. Es konnte kein Unterschied zwischen den Isoformen hinsichtlich der Intensität festgestellt werden. Die Färbung mit dem IRAG-Antikörper zeigte geringere, mosaikartige Expression in der glatten Muskulatur, jedoch starke Expression in einem abgegrenzten Areal, das zwischen den beiden Muskelschichten liegt. Es handelt sich dabei um den Plexus myentericus (vgl. Abb. C-8). Die unregelmäßige Färbung der glatten Muskelzellen kann daran liegen, dass das Antigen nur teilweise zugänglich war, da IRAG ein Membranprotein ist. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde wie bereits erwähnt kontrolliert.



**Abbildung C-9: Lokalisierung der Proteine IRAG und cGKI im Magen.** Ein Längsschnitt durch den Magen der Maus (200-fach vergrößert) zeigt deutliche Signale in der Längs- (LM) und der Ringmuskulatur (CM), wenn mit cGKI<sub>common</sub>, cGKI $\alpha$  oder cGKI $\beta$  immundekoriert wurde. Im Fall der cGKI<sub>common</sub> ist ein Blutgefäß (BG) angeschnitten und gefärbt. IRAG ist unregelmäßig in den beiden Muskelschichten, dafür aber stark zwischen diesen exprimiert. Es handelt sich hierbei um den Plexus myentericus (MP). Die dargestellte Kontrolle (mit 0,1 mM Antigen präadsorbierter IRAG-AK) zeigt keinerlei Färbung.

Anschließend wurden auch der Dünndarm, der sich in Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt, und der Dickdarm (Colon) immunhistochemisch untersucht (Abb. C-10). Im Fall der cGKI zeigten sich bei den verschiedenen Antikörpern leichte Unterschiede. Im Dünndarm und im Colon konnte mit dem cGKI $\alpha$  Antikörper Expression in der Muscularis, in der Muscularis mucosae und in der Submucosa detektiert werden. In der Submucosa waren die Blutgefäße sehr schön zu erkennen. In der Muscularis zeigte sich besonders starke Färbung in der Längsmuskulatur. Dass diese Expression spezifisch war, zeigte die Kontrolle der *cGKI*<sup>-/-</sup> Schnitte (Abb. C-10). Die cGKI $\alpha$  wurde in der Muscularis, hier ebenfalls stärker in der Längsmuskelschicht, in der Muscularis mucosae und teilweise in den Blutgefäßen der Submucosa exprimiert, jedoch insgesamt schwächer. Die cGKI $\beta$  war sehr stark in der Muscularis vertreten, besonders im Dickdarm, weniger stark im Vergleich in der Muscularis mucosae. Blutgefäße der Submucosa konnten seltener angefärbt werden. Jedoch zeigte sich teilweise eine deutliche Färbung im Plexus myentericus. Sowohl im Dünndarm als auch im Colon war mit dem cGKI $\alpha$  und I $\beta$  Antikörper leichte Hintergrundfärbung zu erkennen. Im Colon erschien es, als wären die beiden Isoenzyme in der Epithelschicht exprimiert. Durch die jeweiligen Kontrollen mit *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäusen konnte aber gezeigt werden, dass dies unspezifische Signale sind, da diese auch bei den Kontrollschnitten gefärbt waren. Spezifisch war die Detektion der glatten Muskelzellen, denn bei den *cGKI*<sup>-/-</sup> Tieren konnte keine Expression festgestellt werden (Abb. C-10).

IRAG wurde ebenfalls in der Muscularis des Dünndarms (hier am Beispiel des Jejunums gezeigt) und des Colons exprimiert. Die Expression in der glatten Muskelschicht des Dünndarms korreliert mit dem Ergebnis der Westernblotanalyse von C.2.1 (Abb. C-5). Zusätzlich konnte eine starke Färbung des myenterischen Plexus, v.a. im Colon, gezeigt werden (Abb. C-10). Auch im Fall des IRAG-Antikörpers war eine unspezifische Färbung, gezeigt durch die Kontrolle, im Epithel zu erkennen.

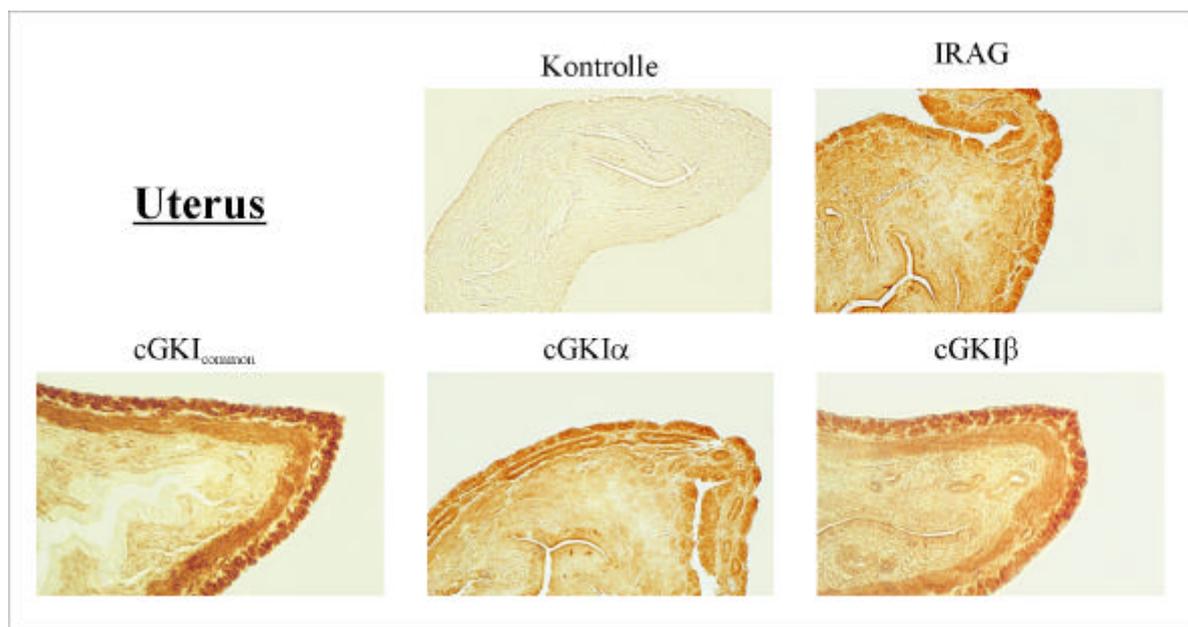


**Abb. C-10: Expression von IRAG und der cGKI im Darm.** Querschnitte des **Dünndarms** (A) (Duodenum im Fall von *cGKI*<sup>common</sup>, restliche Schnitte Jejunum) und des **Colons** (B) (10 µm dick, 100-fach vergrößert). Deutliche Expression von *cGKI*<sup>common</sup>, *cGKI*<sup>α</sup>, *cGKI*<sup>β</sup> und IRAG in der Muscularis (1); die Längsmuskelschicht zeigt meist stärkere Expression. IRAG und die *cGKI*<sup>β</sup> sind im Colon auch im Plexus myentericus (MP) zu finden. Zusätzlich sind v.a. bei *cGKI*<sup>common</sup> die Gefäße der Submucosa (2) und die Muscularis mucosae (3), die die Mucosa (4) durchzieht deutlich zu erkennen. Die Zahlen im Bild der *cGKI*<sup>common</sup> geben die verschiedenen Schichten wieder. Im Colon lassen sich zwischen dem Schleimhautbindegewebe Krypten mit großen Becherzellen (größere weiße Zellen) erkennen. 5 zeigt das Darmlumen. Die beiden Kontrollen für Dünndarm und Colon zeigen *cGKI*<sup>-/-</sup> Gewebe, das mit *cGKI*<sup>β</sup>- (Kontrolle 1) bzw. *cGKI*<sup>common</sup>-AK (Kontrolle 2) inkubiert wurde. Mit dem *cGKI*<sup>β</sup>-AK zeigt sich eindeutig die unspezifische Färbung des Epithels bzw. Hintergrundfärbung (vgl. IRAG und *cGKI*<sup>α</sup>).

### Uterus

Der Uterus (Gebärmutter) wird wie folgt unterteilt: Endometrium (Schleimhaut), Myometrium (Muskulatur) und Perimetrium (Peritonealüberzug). Die Uterusschleimhaut sitzt der Muskulatur direkt auf, ist von einem einschichtigen Epithel besetzt und enthält schlauchartige Drüsen, deren Ausbildung zyklusabhängig ist. Im Endometrium laufen periodische Veränderungen ab. Das Myometrium ist aus Bündeln spiralig angeordneter glatter Muskelzellen, Bindegewebe und Blutgefäßen aufgebaut. Die Muskulatur dient am Ende einer Schwangerschaft der Austreibung.

Die immunhistologische Färbung von querschnittenem Uterus (10 µm) zeigte mit allen 4 Antikörpern (s.o.) ein deutliches Signal im Myometrium (Abb. C-11). Hier wurden die glatten Muskelzellen angefärbt. cGKI $\alpha$  erscheint schwächer exprimiert als cGKI $\beta$ . Im Fall der cGKI kann man auch angeschnittene Blutgefäße sehr schön erkennen. IRAG wurde kaum in Gefäßen, aber stark in den Myozyten der Uterusmuskulatur exprimiert. Die spezifische Bindung des Antikörpers wurde wie oben beschrieben überprüft.

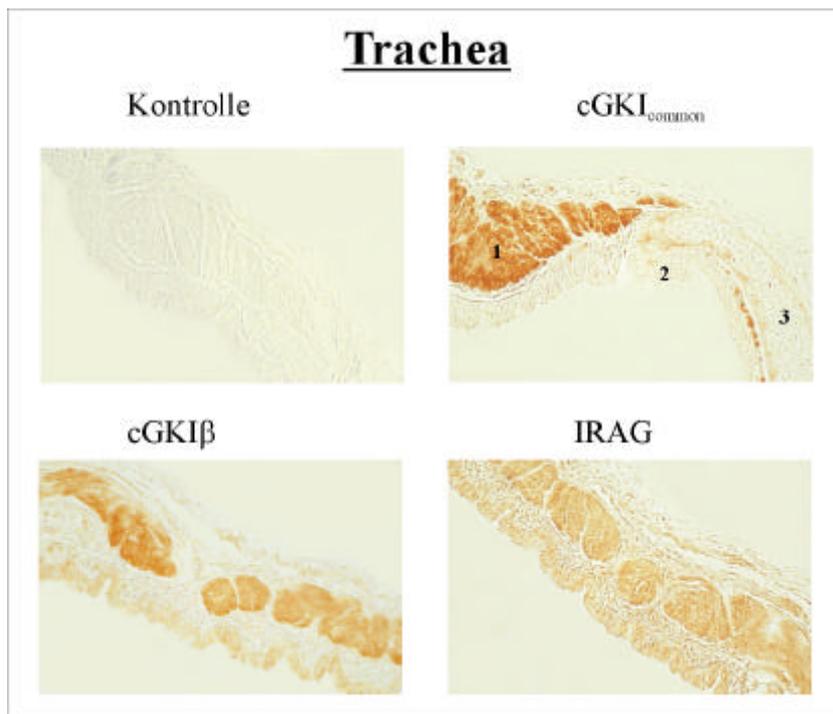


**Abbildung C-11: Lokalisierung der Proteine IRAG und cGKI im Uterus.** Ein Querschnitt durch den Uterus (200-fach vergrößert) zeigt, dass cGKI<sub>common</sub>, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und IRAG im Myometrium der Gebärmutter lokalisiert sind. Sie sind in den glatten Muskelzellen der Uterusmuskulatur exprimiert. Zusätzlich konnte die cGKI in Blutgefäßen detektiert werden. Die Spezifität der Antikörperbindung konnte durch Kontrollen dargestellt werden; vorliegende Kontrolle zeigt den *GKI*<sup>-/-</sup> Uterus, der mit cGKI $\beta$ -AK inkubiert wurde.

### Trachea

Die Trachea (Luftröhre) ist ein weitlumiges, bindegewebiges Rohr, in das hufeisenförmig gekrümmte Knorpelspangen und glatte Muskelfasern eingelagert sind. Die hyalinen Knorpel werden dorsal von Bindegewebe und glatten Muskelzügen (Muscularis trachealis) zu einem Ring geschlossen. Im Querschnitt kann man einen Paries membranaceus von einem knorpeligen Anteil (mit Schleimhaut ausgekleidet) unterscheiden.

Querschnitte der Maustrachea wurden mit Antikörper der cGKI<sub>common</sub>, der cGKI Isoformen und von IRAG inkubiert und anschließend wie beschrieben (B.8.2) gefärbt. Dabei zeigte sich, dass IRAG, die cGKI $\beta$  und cGKI<sub>common</sub> in der M. trachealis des Paries membranaceus exprimiert wurden (Abb. C-12). Das Signal von cGKI<sub>common</sub> war am stärksten. IRAG wurde ebenfalls in den glatten Muskelzellen detektiert, jedoch schwächer. Die cGKI $\alpha$  zeigte nur sehr geringe Färbung. Die Spezifitätskontrolle wurde mit *cGKI*<sup>-/-</sup> Gewebe bzw. präadsorbierten IRAG-Antikörper durchgeführt, wobei sich herausstellte, dass das Signal im Epithel der Schleimhaut im Fall von IRAG und der cGKI $\beta$  unspezifische Hintergrundfärbung ist (nicht gezeigt).

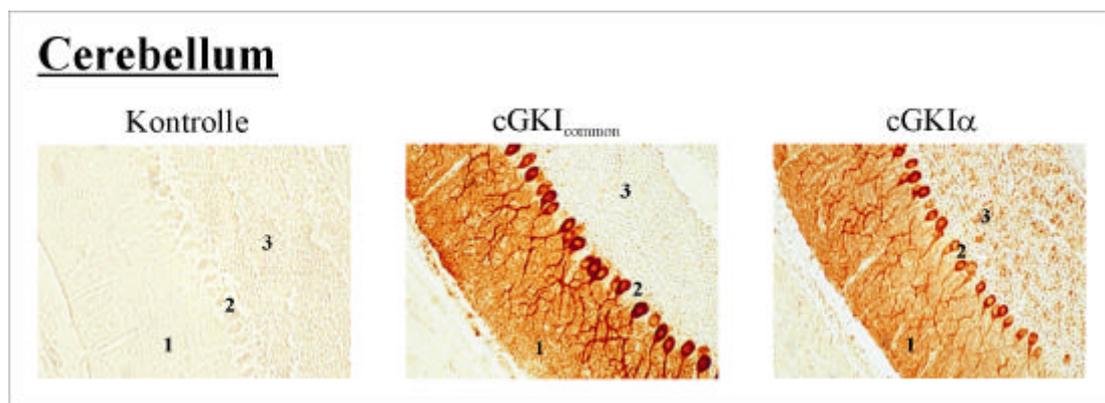


**Abbildung C-12: Immunhistochemische Lokalisierung von IRAG und der cGKI in der Trachea.** Die Zahlen im Bild der cGKI<sub>common</sub> geben die Schichten der quergeschnittenen Trachea wieder. 1: M. trachealis; 2: Schleimhaut mit Epithelschicht; 3: hyaliner Knorpel; IRAG und die cGKI $\beta$  werden im glatten Muskel des Paries membranaceus (Verbindung der Knorpelspangen) exprimiert. Die Schnitte (12  $\mu$ m) wurden wie unter B.8.2 beschrieben behandelt. Kontrolle: *cGKI*<sup>-/-</sup> Gewebe mit cGKI<sub>common</sub>-AK (F.3) inkubiert; Originalvergrößerung x200.

### Cerebellum

Das Cerebellum (Kleinhirn) dient der Koordination und Feinabstimmung der Motorik und der Regulation des Muskeltonus. Die graue Substanz des Cerebellums ist in die Kleinhirnrinde und in die paarig zentral im Marklager gelegenen Kleinhirnerne gegliedert. Die Kleinhirnrinde setzt sich aus der Molekular-, Purkinjezell- und der Körnerschicht zusammen. Der Zellkörper der Purkinjezellen ist etwa 30  $\mu\text{m}$  groß, davon gehen Dendriten-äste aus, die spaltbaumartig durch die Molekularschicht bis an die Kleinhirnoberfläche verzweigen.

Die spezifische Antikörperfärbung mit cGKI<sub>common</sub>, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und IRAG zeigte kein Signal in der Molekular- bzw. in der Körnerschicht der Schnittpräparate (12  $\mu\text{m}$ ). In der Purkinjezellschicht konnte nur mit cGKI<sub>common</sub> bzw. cGKI $\alpha$  Antikörpern eine starke Expression festgestellt werden (Abb. C-13). cGKI $\beta$  und IRAG wurden nicht in Purkinjezellen detektiert. Dieses Resultat stimmt mit der Westernblotanalyse dieser Proteine überein (C.2).



**Abbildung C-13: Expression von cGKI $\alpha$  in Purkinjezellen des Cerebellums.** Sagittalschnitte (200-fach vergrößert) des Kleinhirns weisen starke Proteinexpression der cGKI $\alpha$  in den Purkinjezellen auf. Die immunhistologische Färbung mit dem cGKI<sub>common</sub>-AK zeigt das gleiche Resultat. Man kann sehr schön die Zellkörper (teilweise sind angeschnittene Zellkerne zu erkennen) und die sich verästelnden Dendriten erkennen. 1: Molekularschicht; 2: Purkinjezellschicht; 3: Körnerschicht. Der cGKI<sup>-/-</sup> Kontrollschnitt wurde mit dem cGKI $\alpha$ -AK inkubiert.

Die umfangreiche Untersuchung verschiedener glattmuskulärer Organe und des Kleinhirns hinsichtlich der Lokalisierung von IRAG und der cGKI bestätigten die Vermutungen, dass IRAG im viszeralen glatten Muskel exprimiert wird. Ebenso verhält es sich mit der cGKI, wobei zumindest optisch (Intensität der Färbung) auffällt, dass cGKI $\beta$  stärker als das  $\alpha$  Isoenzym im glatten Muskel vorhanden ist (vergleiche Aorta, Dünndarm, Colon und Uterus). In der Trachea zeigte die cGKI $\alpha$  nur sehr geringe Expression in der glatten Muskulatur. In der Harnblase wurde nur cGKI $\beta$  und IRAG in den glatten Muskelzellen sehr stark exprimiert, cGKI $\alpha$  konnte im Gegensatz dazu nur sehr schwach gefunden werden (nicht gezeigt). Auffällig war auch, dass IRAG nur in der Aorta, aber nicht in kleineren Gefäßen exprimiert wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass verschiedene

Mechanismen für die Regulation des vaskulären Systems existieren. Interessanterweise sieht es so aus, als wäre IRAG zusätzlich im enterischen Nervensystem, hier im Plexus myentericus lokalisiert. Dies ist eine neue Erkenntnis, die weitere Funktionen von IRAG im NO/cGMP/cGKI Signalweg vermuten lässt, besonders, da auch die cGKI $\beta$  in diesem Plexus teilweise gefunden wurde. Des Weiteren konnte eindeutig gezeigt werden, dass nur die  $\alpha$  Isoform der cGKI in den Purkinjezellen des Cerebellums exprimiert wird. Diese Ergebnisse, die mit verschiedenen Mauspräparationen reproduzierbar waren, korrelieren mit denen der Westernblotanalyse des vorangegangenen Kapitels.

**Tabelle C-2: Zusammenfassung der IRAG und cGKI Proteinexpression in der Immunhistochemie.** Das Vorkommen von IRAG, cGKI und deren Isoformen in den einzelnen Mausgeweben wurde durch immunhistologische Färbung qualitativ abgeschätzt. „+++“ bedeutet hohe, „++“ mittlere, „+“ geringe und „-“ keine Expression.

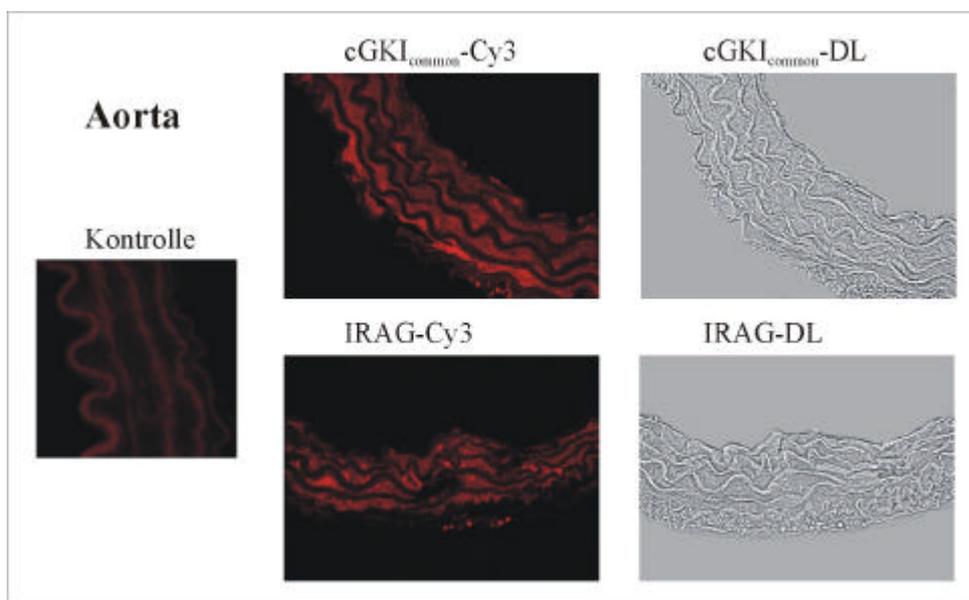
Gewebe	IRAG	cGKI <sub>common</sub>	cGKI $\beta$	cGKI $\alpha$
Kleinhirn	.*	+++	.*	+++
Trachea	++	+++	++	.*
Aorta	+++	+++	+++	++
Magen	++	+++	+++	+++
Dünndarm	++	+++	+++	++
Colon	++	+++	+++	++
Uterus	+++	+++	+++	++
Blase*	+++	+++	+++	+

\* nicht gezeigte Daten

### C.3.2. Konfokale Laser-Scan Mikroskopie

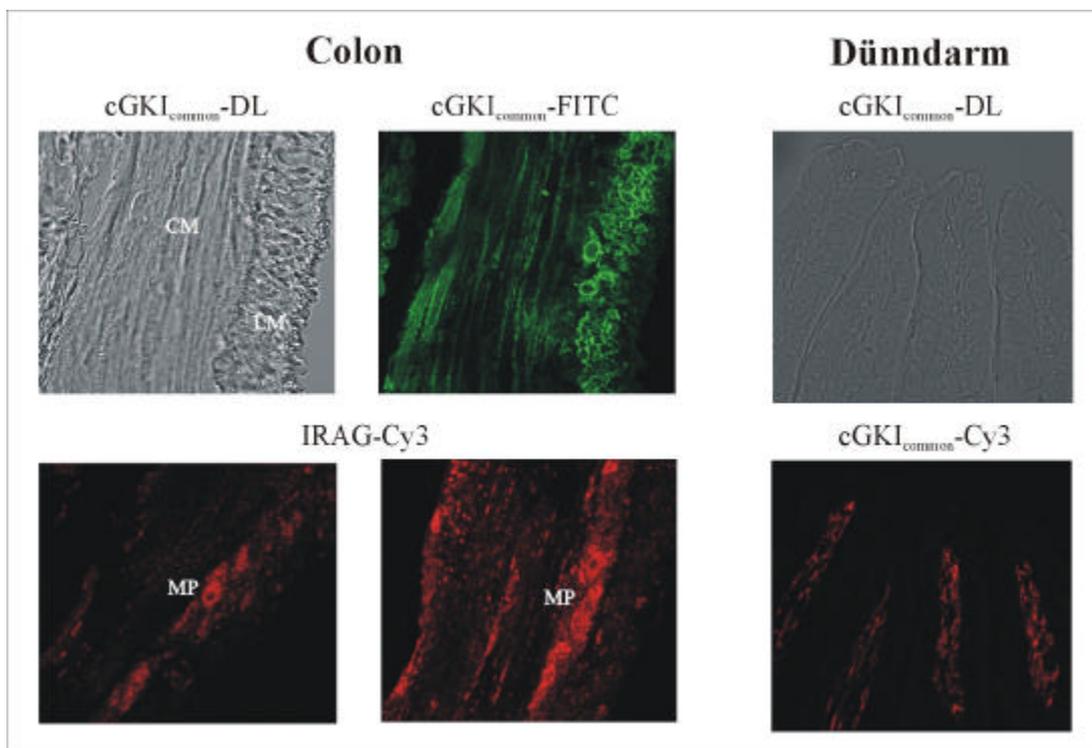
In einigen Geweben wurde mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern IRAG und die cGKI immunhistologisch gefärbt und mit dem konfokalen Laser-Scan Mikroskop (B.8.2) detektiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass man Strukturen genauer erkennen kann, da man eine höhere Auflösung erzielen und Teilbereiche herausvergrößern (zoomen) kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aorta und der Dickdarm mit dem IRAG bzw. dem cGKI<sub>common</sub> Antikörper untersucht.

In der Aorta sollte nochmals überprüft werden, ob IRAG mit der cGKI co-lokalisiert ist. Dafür wurden Paraffinschnitte der Mauseorta (6 µm), die mit spezifischen Antikörpern gegen IRAG bzw. cGKI<sub>common</sub> und mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper (F.3) immundekoriert wurden, mit dem Lasermikroskop bei einer 630-fachen Vergrößerung untersucht (Abb. C-14). Das Ergebnis zeigte eindeutige Fluoreszenzsignale der Myozyten in der Media sowohl für IRAG als auch für die cGKI. Auch bei unterschiedlichen Zoomfaktoren konnte kein Unterschied in der Lokalisierung festgestellt werden. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde entweder durch Inkubation ohne primären Antikörper, mit Präimmunserum bzw. Kaninchen IgG oder präadsorbiertem Antikörper kontrolliert.



**Abbildung C-14: Lokalisierung von IRAG und cGKI in der Aorta.** Die Lokalisierung wurde mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie anhand IRAG- bzw. cGKI<sub>common</sub>- und Cy3-markierter Schnitte nachgewiesen. Expression der beiden Proteine konnte in den glatten Muskelzellen der Media detektiert werden. Die Kontrolle (hier: ohne primären AK) zeigte keinerlei Signal in den Myozyten. Das jeweilige Durchlichtbild (DL) ist aufgeführt. Originalvergrößerung x630 (Ölimmersion)

Im Colon war es notwendig, die Expression von IRAG genauer, besonders bezüglich des Plexus myentericus zu analysieren. Dabei stellte sich heraus, dass IRAG tatsächlich in den Neuronen dieses Plexus und somit im enterischen Nervensystem exprimiert wird (Abb. C-15). Die IRAG-Signale in der Muscularis waren schwächer als die der cGKI. Die cGKI zeigte starke Signale in der Längsmuskulatur, schwächere in der Ringmuskulatur der Muscularis. Ebenfalls positiv war die Muscularis mucosae und die Blutgefäße der Submucosa mit dem cGKI<sub>common</sub> Antikörper. Jedoch konnte kaum cGKI-Expression in den Neuronen des Plexus myentericus gefunden werden. Zusätzlich wurde die Muscularis mucosae des Duodenums hinsichtlich der cGKI untersucht (Abb. C-15). Die Zotten waren mit glatten Muskelzellen der Muscularis mucosae, in denen cGKI exprimiert wird, durchsetzt. Die cGKI ist also auch an der Eigenmotilität der Mucosa im Dünndarm beteiligt. Die Kontrollen wurden wie beschrieben durchgeführt, wobei kein Signal in Myozyten oder Neuronen gefunden wurde.



**Abbildung C-15: Immunhistochemische Lokalisierung von IRAG und cGKI im Darm.** Gezeigt ist das Durchlichtbild und die immunhistologische Färbung mit dem cGKI<sub>common</sub> und FITC-gekoppelten AK eines Colon-Querschnittes (10 µm) mit 630-facher Vergrößerung und Zoomfaktor 4. Sehr schön sind hier die einzelnen angeschnittenen Myozyten der Muscularis zu erkennen. Die Expression von cGKI ist in der Längsmuskelschicht (LM) stärker als in der Ringmuskelschicht (CM). Darunter ist ebenfalls ein Querschnitt des Colons mit 630-facher Vergrößerung gezeigt, links ohne Zoom, rechts Zoomfaktor 4. Hier wurde mit IRAG- und Cy3-AK immundetektiert. IRAG wird mosaik in der Muscularis exprimiert, stark in den Neuronen des myenterischen Plexus (MP), die durch das Zoomen gut zu erkennen sind. Zusätzlich sind Zotten des Dünndarms (Duodenum) abgebildet, die mit cGKI<sub>common</sub>- und Cy3-AK inkubiert wurden. Deutlich sind die glatten Muskelzellen der Muscularis mucosae zu sehen, die die Zotten durchziehen.

Die mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie dargestellte Lokalisierung von IRAG und der cGKI entspricht der durch Lichtmikroskopie beschriebenen Verteilung der Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass IRAG und die cGKI in der Aorta in den Myozyten der Media lokalisiert sind. Im Colon wird IRAG in der Muscularis und in Neuronen des Plexus myentericus exprimiert. Die cGKI wird im Darm in der longitudinalen und zirkulären Muskulatur, in der Muscularis mucosae in glatten Muskelzellen der Zottenpumpe und in Blutgefäßen der Submucosa gefunden. Expression im Plexus myentericus konnte nur teilweise beobachtet werden. Die Strukturen der verschiedenen Schichten des Darms (v.a. der myenterische Plexus) waren mittels Laser-Scan Mikroskopie deutlicher zu sehen als mit der Lichtmikroskopie.

#### **C.4. Interaktion von IRAG mit der cGMP-Kinase**

IRAG moduliert in Assoziation mit der cGKI $\beta$  und dem IP<sub>3</sub>RI die IP<sub>3</sub>-induzierte Kalziumfreisetzung. Die Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI $\beta$  bewirkt eine Hemmung des Kalziumausstroms aus dem endoplasmatischen Retikulum. IRAG, cGKI $\beta$  und der IP<sub>3</sub>RI, der ebenfalls durch die cGKI $\beta$  phosphoryliert wird, bilden einen multimeren Komplex (Schlossmann et al., 2000), dessen molekularen Mechanismen noch ungeklärt sind. In den bisherigen Ergebnissen wurde sowohl die Verteilung als auch die Lokalisierung von IRAG und der cGKI in Geweben dargestellt, wobei festgestellt wurde, dass die Expression von IRAG ähnlich der von cGKI $\beta$  ist. Im nun folgenden Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, wie und welche der einzelnen Komponenten miteinander agieren. Diese Problematik wurde mit Hilfe des Zwei-Hybrid Systems in Hefen und durch *in vivo* Expression der verschiedenen Proteine in COS-Zellen bearbeitet.

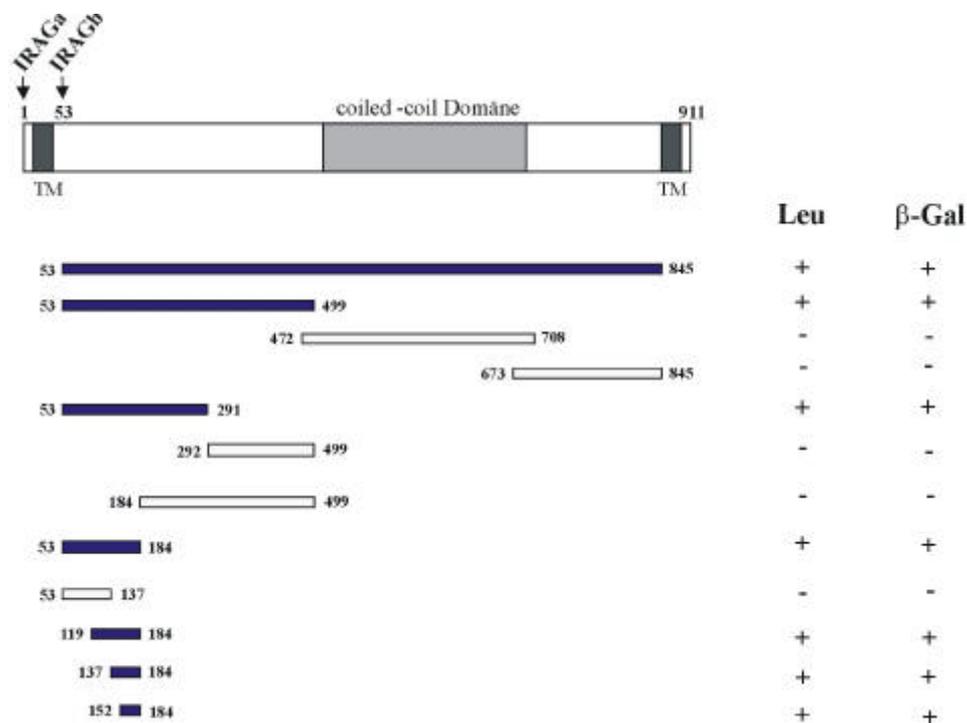
##### **C.4.1. Spezifische Interaktion von IRAG mit cGKI $\beta$ im Zwei-Hybrid System**

Um die Interaktion von IRAG mit der cGK zu untersuchen und deren Interaktionsstellen zu identifizieren, wurde das Zwei-Hybrid System in Hefen verwendet. Mit diesem System ist es möglich, durch Aktivierung von Reportergenen die Interaktion zweier Proteine aufzuklären (B.6). Die eingesetzten Reportersysteme stehen unter der Kontrolle von mehreren LexA-Operatoren. Das Köderprotein (Bait) wird als Fusionsprotein mit LexA exprimiert, was eine Bindung an die LexA-Operatoren der Reportergene ermöglicht, aber noch nicht zu deren Aktivierung führt. Das „Fischprotein“ (Prey) wird als Fusionsprotein mit einer transkriptionsaktivierenden Domäne exprimiert, allerdings nur, wenn Galaktose im Medium vorhanden ist, da es unter der Kontrolle eines GAL1-Promotors steht. Falls es zu einer Interaktion des Köderproteins mit dem „Fischprotein“ kommt, befindet sich die transkriptionsaktivierende Domäne in unmittelbarer Nähe der Reportergene, so dass die Transkription aktiviert wird. Um die Aktivität der Reportergene zu analysieren, werden drei

verschiedene Plasmide in Hefezellen transformiert (B.6.). In vorliegender Arbeit waren die Köderproteine verschiedene IRAG-Konstrukte, die Preys verschiedene cGK-Varianten.

#### C.4.1.1. Konstruktion und Basischarakterisierung der Köderproteine

Der erste Schritt des Zwei-Hybrid Systems (B.6.) bestand in der Konstruktion des Fusionsproteins aus dem Köderprotein (IRAG) und dem LexA-Protein. Die für die verschiedenen IRAG-Konstrukte (Abb. C-16) kodierende cDNS wurde mittels PCR amplifiziert (B.3.7), *EcoRI/BamHI* geschnitten und gerichtet an die LexA-Sequenz des *EcoRI/BamHI*-geöffneten Expressionsplasmids pEG202 kloniert (B.3.4) (Primer s. Anhang F.1). Nach Transformation in *E. coli* (B.3.9.1) wurde das jeweilige Plasmid vermehrt und isoliert (B.3.1). Zur Kontrolle der korrekten Sequenz und des richtigen Leserahmens wurde das jeweilige Insert, der Übergang in die LexA-Sequenz und der 3'-Übergang in den pEG202 Vektor sequenziert (B. 3.8; F.1).



**Abbildung C-16: IRAG-Konstrukte, die als Köder in der Zwei-Hybrid Analyse verwendet wurden.** Die obere Zeichnung illustriert die schematische Struktur von IRAG; TM putative Transmembrandomänen. Zusätzlich ist die selektive Interaktion von den verschiedenen IRAG-Fragmenten mit der cGKI $\beta$  durch Leucin-Auxotrophie (Leu) oder  $\beta$ -Galaktosidase-Bildung ( $\beta$ -Gal) gezeigt. Die Zahlen vor und hinter jeder Linie geben die Position der AS von jedem Klon an. Blaue Linie und + bedeutet Interaktion; weiße Linie und - heißt keine Interaktion der jeweiligen IRAG-Konstrukte mit der cGKI $\beta$  (siehe C.4.1.2).

Anschließend wurde in Vorversuchen das Verhalten der jeweiligen LexA-IRAG Fusionsproteine in EGY48-Hefezellen durch eine Serie von Kontrolleexperimenten charakterisiert. Es musste gezeigt werden, dass die Fusionsproteine stabil exprimiert werden, dass sie fähig sind, in den Kern einzudringen, und dass sie an den LexA-Operator binden können. Es durfte des weiteren keine unspezifische oder vorzeitige Transkriptions-

aktivierung der Reporterplasmide erfolgen (Ausubel et al., 1995). Die stabile Expression des jeweiligen Fusionsproteins in Hefezellen wurde mittels Westernblot (B.4.6.3) überprüft. Hierzu wurde das Plasmid pEG202/IRAG in EGY48 transformiert (B.4.9.2). Eine 5 ml Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.8 inkubiert, abzentrifugiert, mit 2x Laemmlipuffer (B.4.6.1) lysiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Expression des Fusionsproteins LexA-IRAG steht unter der Kontrolle des ADH-(Alkohol-Dehydrogenase) Promotors, so dass keine weitere Aktivierung der Expression nötig war. Die Westernblot-analyse der exprimierten Proteine erfolgte entweder mit dem spezifischen IRAG-Antikörper oder mit einem polyklonalen LexA-Antikörper (F.3). Das Molekulargewicht des jeweiligen Fusionsproteins LexA-IRAG errechnet sich aus der Größe des IRAG-Konstrukts (5-120 kDa) und aus der Größe des LexA-Proteins (25 kDa). Alle IRAG-Konstrukte wurden in Hefen exprimiert und konnten bei dem für sie errechneten Molekulargewicht detektiert werden (nicht gezeigt). Anschließend wurde eine Reihe von Transformationen in EGY48 (B.3.9.2) mit verschiedenen Plasmidkombinationen (Tabelle C-3) durchgeführt, die Hefen auf den entsprechenden Selektivplatten (B.2.1) ausgestrichen und analysiert.

**Tabelle C-3: Basischarakterisierung der Köderproteine.**

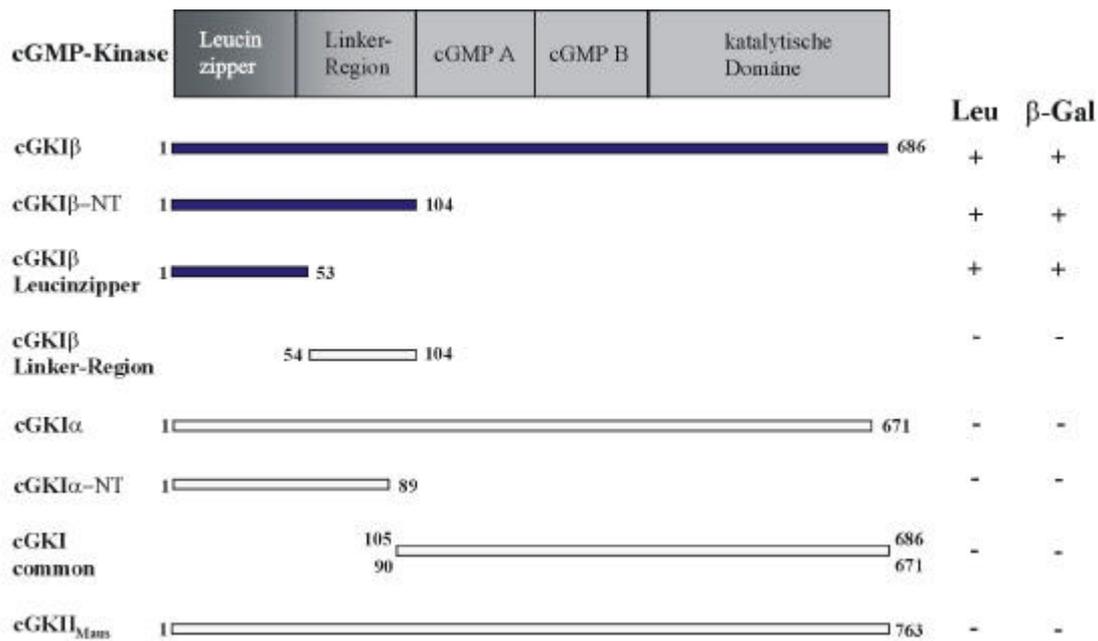
Transformation	Plasmide	Selektivplatten	Ergebnis	Interpretation
I	pEG202/IRAG pSH18-34	Glu-His-Ura/ Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien	keine Aktivierung des <i>lacZ</i> Gens
II	pSH17-4 pSH18-34	Glu-His-Ura/ Filterassay mit X-Gal	blaue Kolonien Positivkontrolle	Aktivierung des <i>lacZ</i> Gens
III	pRFHM1 pSH18-34	Glu-His-Ura/ Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien Negativkontrolle	keine Aktivierung des <i>lacZ</i> Gens
IV	pEG202/IRAG pSH18-34	Gal/Raf-His-Ura	Wachstum	keine Aktivierung des <i>Leu2</i> Gens, die
V	pEG202/IRAG pSH18-34	Gal/Raf-His-Ura-Leu	kein Wachstum	Hefen benötigen Leucin im Medium
VI	pEG202/IRAG pJK101	Gal/Raf-His-Ura/ Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien	Hemmung des konstitutiven <i>lacZ</i>
VII	pRFHM1 pJK101	Gal/Raf-His-Ura/ Filterassay mit X-Gal	Positivkontrolle weiße Kolonien	Reportergens durch LexA-Bindung
VIII	pJK101	Gal/Raf-Ura/ Filterassay mit X-Gal	blaue Kolonien Negativkontrolle	<i>lacZ</i> Reportergen konstitutiv aktiv

Eigenschaften der Plasmide siehe Tabelle B-2.

Bei den Transformationen I-III handelt es sich um den Aktivierungs-Assay, der zeigen sollte, dass das jeweilige LexA-IRAG Fusionsprotein durch die Bindung an den LexA-Operator des *lacZ* Reportergens dessen Aktivierung nicht unspezifisch auslöste, d.h., dass die Hefezellen weiß blieben (I). Die Transformationen II und III dienten dabei als Positiv- (Aktivierung des *lacZ* Gens, blaue Kolonien) bzw. als Negativkontrolle (keine Aktivierung des Reportergens, weiße Kolonien). Bei den Transformationen IV und V („Leucin-Requirement“) wurde deutlich, dass die Hefen auf den Zusatz von Leucin im Medium angewiesen waren, da es nicht, wie im Fall einer Interaktion, zu einer Aktivierung des *Leu2* Gens kam. Im Repressions-Assay (VI-VIII) wurde gezeigt, dass das konstitutiv aktive *lacZ* Gen durch Bindung der jeweiligen LexA-IRAG Fusionsproteine an den LexA-Operator gehemmt wurde (VI; weiße Kolonien). Dies verdeutlichte, dass die LexA-IRAG Fusionsproteine an den LexA-Operator gebunden haben und im Kern lokalisiert waren. Die Transformationen VII und VIII wurden als Positiv- (keine Aktivierung des Reportergens, weiße Kolonien) bzw. Negativkontrolle (konstitutiv aktives *lacZ*, blaue Hefezellen) verwendet.

#### **C.4.1.2. Analyse der Interaktion von IRAG mit der cGK**

Nachdem alle Vorbedingungen der Köderproteine erfüllt waren, wurden die cGK-Varianten auf Interaktionen mit IRAG untersucht. Die cGK-Konstrukte (Abb. C-17) wurden mittels PCR (B.3.7) amplifiziert (Primer s. F.1), mit *EcoRI/XhoI* bzw. im Fall der cGKII nur mit *EcoRI* geschnitten und in den pJG4-5 Vektor an die transkriptionsaktivierende Domäne kloniert (B.3.4). Nach Transformation in *E. coli* (B.3.9.1) wurde das jeweilige Plasmid vermehrt und isoliert (B.3.1). Zur Kontrolle der korrekten Sequenz, der richtigen Orientierung (cGKII) und des richtigen Leserahmens wurde das jeweilige Insert, der Übergang in die DNS-aktivierende Domäne und der 3'-Übergang in den pJG4-5 Vektor sequenziert (B.3.8; F.1). Anschließend wurde je ein pEG202/IRAG, ein pJG4-5/cGK Plasmid und das Reporterplasmid pSH18-34 in EGY48 transformiert (B.3.9.2). Als erstes sollte aufgeklärt werden, welche cGK mit IRAG interagiert. Dafür wurden Hefen, die IRAG<sub>53-845</sub> (ein Konstrukt ohne putative Transmembrandomänen) und die cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  oder cGKII enthielten, auf den entsprechenden Selektivmedien analysiert (Abb. C-18). Es stellte sich heraus, dass IRAG stark mit der cGKI $\beta$ , nicht aber mit der cGKI $\alpha$  oder der cGKII interagiert. Eine detailliertere Analyse zeigte, dass die Interaktion von IRAG mit dem N-Terminus der cGKI $\beta$  zustande kam. Dies ist bemerkenswert, da sich die Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  der cGKI nur in ihren ersten 100 Aminosäuren unterscheiden (Wernet et al., 1989). Nur die Leucinzipper-Region (cGKI $\beta$ <sub>1-53</sub>), jedoch nicht die Linker-Region (cGKI $\beta$ <sub>53-104</sub>) des  $\beta$  N-Terminus, assoziierte mit IRAG (Abb. C-17 und 18).



**Abbildung C-17: cGK-Konstrukte und deren Interaktion mit IRAG in Hefezellen.** Das obere Bild illustriert die schematische Struktur der cGK. Des Weiteren sind die verschiedenen cGK-Konstrukte gezeigt, die bezüglich der Interaktion mit IRAG untersucht wurden. Transformanten, in denen eine Interaktion stattgefunden hat, zeigten Blaufärbung durch  $\beta$ -Galaktosidase-Bildung ( $\beta$ -Gal) bzw. Wachstum auf Leucindefizienten Medien (Leu). Lediglich mit der cGKI $\beta$ , genauer noch mit dem Leucinzipper des I $\beta$  N-Terminus interagiert IRAG. Keinerlei Assoziation zwischen IRAG und der cGKI $\alpha$  oder der cGKII konnte detektiert werden. Die Zahlen vor und hinter jeder Linie geben die Position der AS von jedem Klon an. Blaue Linie und + bedeutet Interaktion; weiße Linie und - heißt keine Interaktion des jeweiligen cGK-Konstruktes mit IRAG. Bei der cGKI handelt es sich um bovine Enzyme, die cGKII wurde aus der Maus kloniert. NT bedeutet Aminoterminus.

Anschließend sollte aufgeklärt werden, welcher Teil von IRAG mit der cGKI $\beta$  interagiert. Dafür wurden verschiedene IRAG-Fragmente (Abb. C-16) als Köder und die gesamte cGKI $\beta$  bzw. cGK-Varianten als „Fisch“ in EGY48 untersucht (Abb. C-18).

Eine Zusammenfassung der Zwei-Hybrid Analyse bezüglich der Interaktion zwischen IRAG und der cGKs ist in Abbildung C-18 zu finden.





**Abbildung C-19: Position und Aminosäuresequenzen der Interaktionsstellen von IRAG und cGKI $\beta$ .** Die geladenen AS sind „fett“, die Leucine und Isoleucine der cGKI $\beta$  Leucinzipper-Region (AS 1-53) sind unterstrichen und kursiv dargestellt.

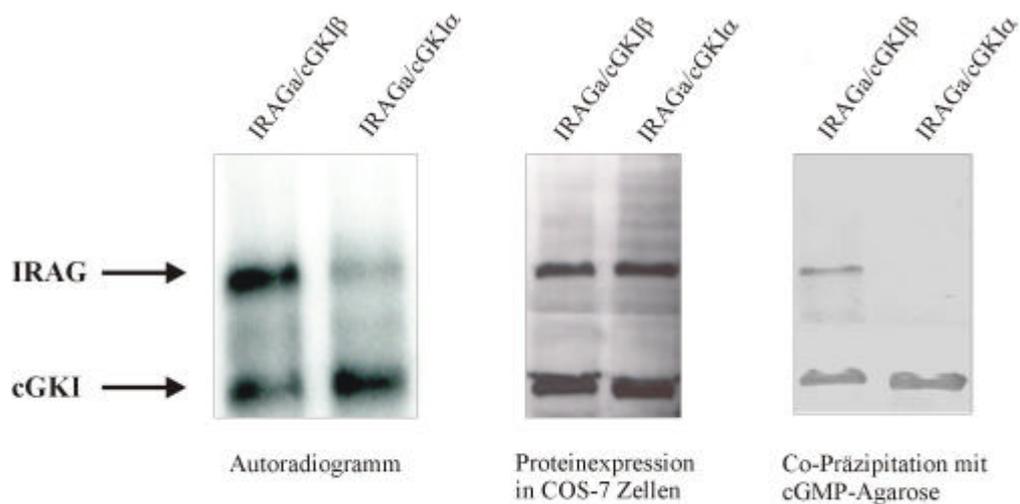
Das gleiche Ergebnis, dass IRAG nur mit der cGKI $\beta$  interagiert, konnte auch gezeigt werden, wenn IRAG als Prey und die cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  bzw. cGKI $\gamma$  als Köderproteine in Hefen agierten (ohne Abbildung). Dazu wurde IRAG aus dem Plasmid pEG202 herausgeschnitten und in pJG4-5 ligiert. Umgekehrt wurden die gesamten cGKs aus den pJG4-5 Plasmiden in pEG202 umgesetzt. Anschließend wurde eine Zwei-Hybrid Analyse (mit Basischarakterisierung) wie geschildert durchgeführt. Abschließend wurde noch ein Test bezüglich der Spezifität der Preys durchgeführt. Dafür wurde das jeweilige pJG4-5/cGK Plasmid mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und pRFHM-1 in EGY48 transformiert und auf Selektivmedien analysiert. Es konnte keine Blaufärbung auf X-Gal-Platten und auch kein Wachstum auf Leucin-Mangelmedien detektiert werden. Das heißt, dass die cGKI $\beta$  spezifisch mit IRAG interagiert. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass das LexA-Protein alleine eine Interaktion mit cGKI $\beta$  eingeht und somit die Reportergene unspezifisch aktiviert.

Nachdem nun davon ausgegangen werden konnte, daß es sich in den Hefezellen um eine spezifische Interaktion zwischen IRAG und der cGKI $\beta$  handelt, wurde im folgenden Abschnitt versucht, die Interaktion der beiden Proteine in Säugetierzellen (COS-7 Zellen) zu bestätigen und näher zu charakterisieren.

#### C.4.2. Charakterisierung der Interaktion zwischen IRAG und cGKI $\beta$

Die Charakterisierung der Interaktion zwischen IRAG und der cGKI $\beta$  erfolgte nach *in vivo* Expression verschiedener Proteine in COS-7 Zellen. IRAG wurde dafür mit der cGKI $\alpha$  oder der cGKI $\beta$  co-transfiziert (B.5.3). Die Expression der Proteine wurde danach mittels Westernblot (B.4.6.3) überprüft, wobei gezeigt werden konnte, dass diese in annähernd

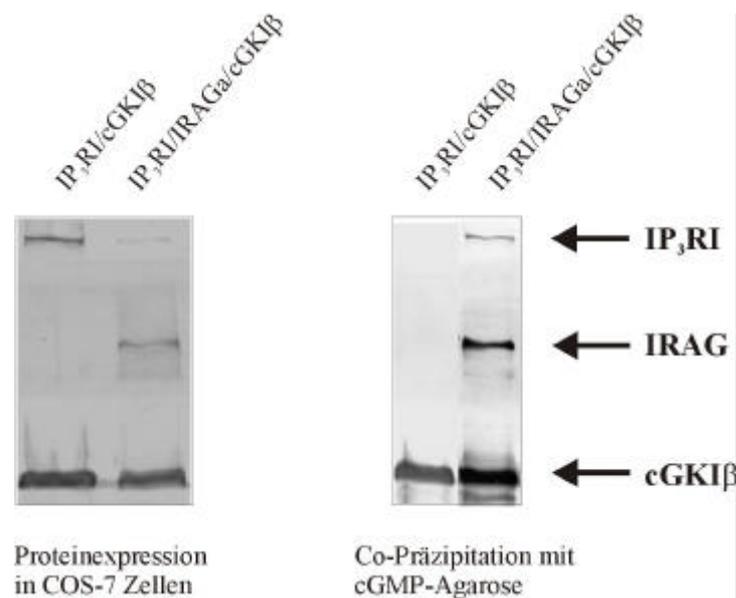
gleichen Mengen exprimiert wurden (Abb. C-20). Durch eine Co-Immunpräzipitation (B.4.7.2) mit spezifischen Antikörpern gegen cGKIcommon oder IRAG (F.3) wurden IRAG und die cGKI von anderen zellulären Proteinen aus COS-Zellysaten abgetrennt und anschließend phosphoryliert (B.4.7.3), d.h. mit dem cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP und mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass IRAG nur in Gegenwart der cGKI $\beta$  stark phosphoryliert wurde. Mit der cGKI $\alpha$  konnte keine bzw. nur eine sehr schwache Phosphorylierung beobachtet werden. Außerdem wurde mit cGMP-Agarose IRAG nur in Kombination mit der cGKI $\beta$ , nicht mit der cGKI $\alpha$  gefällt (Abb. C-20) (Ammendola et al., 2001). Umgekehrt wurde nur die cGKI $\beta$ , nicht aber die cGKI $\alpha$  mit dem IRAG-Antikörper präzipitiert (nicht gezeigt). Das heißt, dass IRAG nur mit dem  $\beta$  Isoenzym der cGKI interagiert. Daraus kann man auch schließen, dass die Assoziation von IRAG mit dem Aminoterminus der cGKI $\beta$ , der den Leucinzipper enthält, für die Phosphorylierung von IRAG notwendig ist. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der Zwei-Hybrid Analyse. Durch die wechselseitige Co-Immunpräzipitation wurde noch einmal die Spezifität des IRAG Antikörpers nachgewiesen, da nur die cGKI $\beta$  präzipitiert wurde. Unter Verwendung des Präimmunsersums (desselben Kaninchens) konnte keine spezifische Fällung beobachtet werden.



**Abbildung C-20: Phosphorylierung und Co-Präzipitation von IRAG durch cGKI $\beta$ .** Das Autoradiogramm (linkes Bild) zeigt, dass IRAG nur von der cGKI $\beta$ , und nicht von der cGKI $\alpha$  phosphoryliert wird. Die durch cGKIcommon-AK co-immunpräzipitierten Proteine wurden in Anwesenheit von 8-pCPT-cGMP phosphoryliert. Das mittlere Bild zeigt den Westernblot der co-exprimierten Proteine. Rechts ist die Affinitätsreinigung von IRAG durch die cGKI $\beta$  mittels cGMP-Agarose dargestellt; kein IRAG-Signal konnte mit der cGKI $\alpha$  detektiert werden. Die Immundetektion erfolgte mit dem cGKIcommon bzw. dem IRAG-AK und einem AP-gekoppelten sekundären AK (F.3). Die jeweilige IRAG/cGKI-Kombination ist angegeben.

Die spezifische *in vivo* Interaktion zwischen IRAG und der cGKI $\beta$ , wie sie mit dem Zwei-Hybrid System gezeigt wurde, konnte also mittels *in vitro* Phosphorylierung und Co-Präzipitation bestätigt werden.

Da der IP<sub>3</sub>RI, die dritte Komponente des cGKIβ/IRAG-Makrokomplexes, ebenfalls durch die cGKI phosphoryliert wird (Komalavilas & Lincoln, 1996; Haug et al., 1999), wurde zusätzlich die Assoziation von cGKIβ mit dem IP<sub>3</sub>RI untersucht. Dafür wurden COS-7 Zellen mit dem IP<sub>3</sub>RI und der cGKIβ bzw. mit dem IP<sub>3</sub>RI, der cGKIβ und IRAG co-transfiziert (B.5.3). Die jeweilige Proteinexpression wurde durch Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen cGKI, IRAG und IP<sub>3</sub>RI (F.3) kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen solubilisiert, mit cGMP-Agarose inkubiert (B.4.7) und die Präzipitation mittels Westernblot (B.4.6.3) analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass der IP<sub>3</sub>RI mit der cGKIβ nicht gefällt wurde (Abb. C-21). Dieses Resultat stimmte mit einer Zwei-Hybrid Analyse überein, wobei die cGKIβ als Köder und verschiedene IP<sub>3</sub>RI-Fragmente als „Preys“ eingesetzt wurden, da auch hier keine Interaktion gefunden wurde (nicht gezeigt). Dies könnte darauf hinweisen, dass die cGKIβ und der IP<sub>3</sub>RI nicht stabil miteinander assoziieren. Im Gegensatz dazu konnten alle drei Proteine, wie im Fall der mikrosomalen Membranen der Rindertrachea, affinitätschromatografisch gereinigt werden, wenn IRAG zusammen mit der cGKIβ und dem IP<sub>3</sub>RI co-exprimiert wurde (Abb. C-21) (Ammendola et al., 2001). Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob die neuronale oder periphere IP<sub>3</sub>RI-Isoform exprimiert war (B.1).



**Abbildung C-21: Assoziation der cGKIβ mit dem IP<sub>3</sub>RI.** Gezeigt sind Westernblots der co-exprimierten Proteine und der cGMP-Agarose-Affinitätschromatographie. Der IP<sub>3</sub>RI wird nur in Anwesenheit von IRAG und der cGKIβ co-präzipitiert. Er wird nicht durch die cGKIβ alleine gefällt (rechtes Bild). Die Immundetektion erfolgte mit dem IRAG-, cGKIcommon- bzw. dem IP<sub>3</sub>RI-AK und einem AP-gekoppelten sekundären AK (F.3).

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob IRAG an der Assemblierung des trimeren Komplexes beteiligt sein könnte. Weitere Experimente werden notwendig sein, um die Rolle des IP<sub>3</sub>RI innerhalb des Komplexes zu verstehen.

## D. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals systematisch die Proteinexpression von IRAG, ein vor kurzem identifiziertes Substratprotein der cGKI, und den Splicevarianten I $\alpha$  und I $\beta$  der cGKI in verschiedenen peripheren und glattmuskulären Mausegeweben analysiert. Die cGKI ist ubiquitär verteilt, IRAG wird hingegen hauptsächlich in glattmuskulären Organen stark exprimiert, weshalb die Lokalisierung in diesen Geweben immunhistochemisch eingehend untersucht wurde. Zusätzlich sind die molekularen Mechanismen in dem trimeren Komplex IRAG-cGKI-IP<sub>3</sub>RI untersucht worden, wobei die Interaktion von IRAG mit der cGKI $\beta$  mittels des Zwei-Hybrid Systems aufgeklärt wurde. Diese Interaktion konnte durch weitere proteinbiochemische Untersuchungen bestätigt werden.

### D.1. Physiologische Bedeutung der Lokalisierung von IRAG und der cGKI im Gewebe

Die cGK reguliert eine Vielzahl physiologischer Mechanismen, die u.a. an der Relaxation der glatten Muskulatur, der Hemmung der Thrombozytenaggregation, der intestinalen Chlorid/Wasser-Sekretion und an der Entwicklung der synaptischen Plastizität beteiligt sind (Übersicht: Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000). Die Deletion der Gene der cGKI und der cGKII zeigte, dass diese Funktionen von unterschiedlichen cGK Enzymen reguliert werden (Pfeifer et al., 1996 und 1998). Durch Phosphorylierung von Substratproteinen greift die cGK in diese Mechanismen ein. Bisher wurden nur wenige Substrate identifiziert, die von der cGKI oder cGKII phosphoryliert werden. Dazu gehören die cGMP hydrolysierende Phosphodiesterase 5 (Wyatt et al., 1998; Rybalkin et al., 2002), die  $\alpha$ -Untereinheit des BK<sub>Ca</sub>-Kanals (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999; Swayze et al., 2001), CRP2 (Huber et al., 2000), Telokin (Mac Donald et al., 2000), VASP (Butt et al., 1994), CFTR (Pfeifer et al., 1996; Vaandrager et al., 1998), das cerebellare G-Substrat (Endo et al., 1999; Hall et al., 1999), Phospholipase C $\beta$ <sub>3</sub> (Xia et al., 2001) und IRAG (Schlossmann et al., 2000). Zusätzlich sind Proteine wie die Myosin-bindende Untereinheit (MBS) der Phosphatase I (Nakamura et al., 1999; Surks et al., 1999) und RhoA (Sauzeau et al., 2000) mögliche Substrate der cGKI, die an der Regulation des glatten Muskels über den Kalzium-unabhängigen Mechanismus beteiligt sind.

Die cGKI wird, wie in dieser Arbeit anhand von Westernblotanalysen gezeigt werden konnte, ubiquitär in peripheren und glattmuskulären Geweben und teilweise im Gehirn exprimiert. Diese Tatsache spricht dafür, dass die cGKI in der NO-Signaltransduktion eine wichtige Rolle einnimmt. Die cGKI ist u.a. an der Regulation des glatten Muskels und an der Hemmung der Thrombozytenaggregation beteiligt (Sausbier et al., 2000; Massberg et al., 1999); wie diese Mechanismen im Detail ablaufen, ist unbekannt. Es gibt zwei Isoformen der cGKI, I $\alpha$  und I $\beta$ , deren biologische Rolle weitgehend unerforscht ist. In der

vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster der cGKI $\alpha$  und I $\beta$  in Mausgeweben untersucht. Die cGKI $\alpha$  wurde stark in Herz, Lunge und Kleinhirn exprimiert, die cGKI $\beta$  war die dominierende Isoform in glattmuskulären Geweben (Aorta, Uterus, Magen-Darmtrakt) und wurde zusätzlich in Thrombozyten gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen an bovinen Geweben überein (Keilbach et al., 1992b). Das Vorkommen des Substratproteins IRAG wurde ebenfalls untersucht. IRAG war stark in glattmuskulären Organen und in Thrombozyten exprimiert, ähnlich der cGKI $\beta$ .

Die Lokalisierung von IRAG und der beiden cGKI-Isoenzyme, deren Expression sich teilweise überschneidet, wurde mittels immunhistologischer Färbungen von Aorta, Magen, Dünndarm, Colon, Uterus, Trachea und Cerebellum analysiert. Sowohl IRAG als auch die cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  konnten in vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen detektiert werden; cGKI $\alpha$  wurde zusätzlich in den Purkinjezellen des Kleinhirns exprimiert.

In der **Aorta** waren IRAG, cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in den glatten Muskelzellen der Media lokalisiert. cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  konnten zusätzlich in kleinen Gefäßen, z.B. im Darm oder Uterus, gefunden werden. Der Blutdruck wird über den Gefäßwiderstand kleiner Arterien und Arteriolen reguliert und nicht von der Aorta. Die physiologische Relevanz der cGKI hinsichtlich der NO/cGMP-induzierten Vasorelaxation der Widerstandsgefäße wurde bereits anhand von *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäusen demonstriert, da diese Mäuse einen erhöhten Blutdruck haben (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Die cGKI-Isoform, die dafür verantwortlich ist, ist nicht bekannt. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Splicevarianten in der Aorta exprimiert werden, wenn auch die cGKI $\alpha$  vermindert im Vergleich zur cGKI $\beta$ . Dies könnte bedeuten, dass die Vasorelaxation von unterschiedlichen Mechanismen Substrat-abhängig koordiniert wird.

Die Analyse der Lokalisierung von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  im **Magen-Darmtrakt** zeigte eine ubiquitäre Expression dieser Proteine in kontraktilen Zellen. Allerdings scheint die cGKI $\beta$  die dominierende Isoform im Gastrointestinaltrakt zu sein, da diese stärker exprimiert wurde, was durch Westernblot und Immunhistochemie gezeigt werden konnte. Dieses Resultat ist übereinstimmend mit vorangegangenen Studien, die Untersuchungen am Ratten-Dünndarm zeigen (Huber et al., 1998). Die cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  wurde in der zirkulären und der longitudinalen Muskelschicht der Muscularis und in der Mucosa (Schleimhaut), hier in der Muscularis mucosae und in Blutgefäßen der Submucosa, nachgewiesen. Die Muscularis ist der motorisch wirksame Teil des Magen-Darmkanals, und die Submucosa ist die Versorgungseinrichtung der Mucosa, die wiederum den chemisch aktiven Teil darstellt. Die glatten Muskelzellen der Muscularis mucosae sind an der Eigenmotilität der Schleimhaut, genauer an der Bewegung der Zotten („Zottenpumpe“), beteiligt. Das heißt, diese Zellen sind für die Durchmischung des Chymus und für den optimalen Kontakt des Chymus mit der Mucosa wichtig.

Vor kurzem konnte CRP2 (Cystein-rich protein 2) als Substrat der cGKI $\beta$  in den Myozyten des Ratten-Intestinums identifiziert werden (Huber et al., 2000), seine genaue Funktion ist noch unbekannt. Jedoch konnte Huber et al. zeigen, dass CRP2 mit der cGKI nicht nur in glatten Muskelzellen der zirkulären Muskelschicht und in der Muscularis mucosae, sondern auch in Neuronen des myenterischen und des submukösen Plexus co-lokalisiert ist (Huber et al., 2000). Ein weiteres Substrat der cGKI $\beta$  im Gastrointestinaltrakt ist IRAG, das, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, tatsächlich in glatten Muskelzellen exprimiert wird. IRAG konnte im Magen, im Dünndarm und im Colon der Maus in der Muscularis, sowohl in der Längs- als auch in der Ringmuskulatur, und im Darm in der Muscularis mucosae detektiert werden. Die genaue Funktion von IRAG ist noch nicht aufgeklärt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass IRAG im Intestinum ein weiteres Bindeglied in der NO/cGMP/cGKI-Signaltransduktion darstellt und möglicherweise an der Kalzium-abhängigen Relaxation des glatten Muskels beteiligt ist, da IRAG in COS-7 Zellen die intrazelluläre Kalziumkonzentration moduliert (Schlossmann et al., 2000).

Überraschenderweise wurde IRAG auch in Neuronen des Plexus myentericus exprimiert, der sich zwischen den beiden Muskelschichten der Muscularis befindet. Dies konnte mittels Lichtmikroskopie und noch deutlicher mit konfokaler Laser-Scan Mikroskopie beobachtet werden. Der Verdauungstrakt verfügt über ein eigenes enterisches Nervensystem (ENS), das aus dem Plexus myentericus und dem Plexus submucosus besteht. Der Plexus myentericus steuert die Peristaltik des Darms, in dem er den Muskeltonus beeinflusst. Der Plexus submucosus greift regulierend in sekretorische Funktionen ein. IRAG könnte also zusätzlich neuromodulatorische Funktionen haben. Dafür spricht auch, dass in der vorliegenden Arbeit die cGKI $\beta$  ebenfalls im Plexus myentericus gefunden wurde; die cGKI $\alpha$  konnte nicht detektiert werden. Allerdings war nicht in jedem Plexus cGKI $\beta$ -Expression zu beobachten. Dieses Ergebnis korreliert mit den Befunden im Ratten-Dünndarm; in diesen Studien wurde gezeigt, dass die cGKI nur in etwa 15% der Neurone des Plexus vorkommt, jedoch konnte in diesen Co-Expression mit der nNOS detektiert werden (Huber et al., 1998). IRAG und cGKI $\beta$  werden also nicht nur in glatten Muskelzellen des Intestinums, sondern auch in enterischen Neuronen exprimiert. Da liegt die Vermutung nahe, dass neben der direkten Wirkung von NO auf glatte Muskelzellen (Relaxation) eine neuromodulatorische Wirkung von NO über die cGKI $\beta$  im Gastrointestinaltrakt möglich ist. Im weiteren Verlauf des Signalweges gibt es mindestens zwei Substrate der cGKI $\beta$ , IRAG und CRP2, die sehr wahrscheinlich verschiedene Mechanismen steuern.

Die physiologische Bedeutung eines funktionierenden NO/cGMP/cGKI-Signalweges im Verdauungstrakt wird deutlich, wenn eine Teilkomponente fehlt. *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine Pylorus-Stenose, die mit einer Vergrößerung des Magens einhergeht, und eine verzögerte Magen-Darm-Passage auf (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000). Die defekte NO/cGMP-induzierte Relaxation der glatten Muskelzellen des Magen-Darmtrakts und

eventuelle neuromodulatorische Störungen führen zum Verlust einer koordinierten Peristaltik. Eine Pylorus-Stenose ist auch ein charakteristischer Phänotyp bei Mäusen, in denen eine Spleißvariante der nNOS ausgeschaltet worden ist (Huang et al., 1993).

Immunhistologische Färbungen des **Uterus** der Maus ergaben eine stärkere Expression der cGKI $\beta$  im Vergleich zur cGKI $\alpha$  in der glatten Muskulatur des Myometriums. IRAG war ebenfalls in Myozyten des Myometriums lokalisiert. Die Muskulatur des Uterus dient am Ende einer Schwangerschaft der Austreibung. Die physiologische Bedeutung der cGKI in diesem Organ konnte noch nicht mittels *cGKI*<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden, da diese Mäuse nur etwa sechs Wochen alt werden. Es wäre aber denkbar, dass der Geburtsvorgang gestört ist. In der **Trachea** der Maus konnte IRAG und cGKI $\beta$  in dem glatten Muskel (M. trachealis) des Paries membranaceus, der die Verbindung zwischen den Knorpelspangen bildet, detektiert werden. Dass IRAG in diesem Muskel exprimiert wird, deckt sich mit der Tatsache, dass IRAG aus dem glatten Muskel der Rindertrachea isoliert wurde (Schlossmann et al., 2000). Die cGKI $\alpha$  war, wie bereits mehrmals beschrieben, schwächer als die cGKI $\beta$  exprimiert. In der Harnblase verhielt es sich ebenso, IRAG und cGKI $\beta$  waren stark in der glatten Muskulatur, cGKI $\alpha$  kaum vertreten (nicht gezeigte Daten). Um die physiologische Bedeutung von IRAG und den beiden cGKI-Isoformen in diesen Organen aufzuklären, bedarf es umfangreicher funktioneller Studien. Allerdings scheint es ziemlich sicher zu sein, dass diese Proteine an der NO/cGMP-vermittelten Relaxation des glatten Muskels beteiligt sind.

Das **Cerebellum** übernimmt eine wichtige Rolle bei der Koordination und dem Lernen der Motorik. Purkinjellen der Kleinhirnrinde sind in den Prozess der LTD (long-term depression) involviert, der für das „motorische Lernen“ notwendig ist (Endo et al., 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass NO eine entscheidende Rolle bei der Induktion der cerebellaren LTD spielt (Lev-Ram et al., 1997; Endo et al., 1999). Die cGKI und das cerebellare G-Substrat werden in den Purkinjellen exprimiert und sind an der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade beteiligt (Endo et al., 1999; Hall et al., 1999). In vorliegender Arbeit konnte anhand immunhistochemischer Färbung gezeigt werden, dass nur die cGKI $\alpha$ , nicht die cGKI $\beta$ , in Purkinjellen exprimiert wird. Das heißt, die cGKI $\alpha$  könnte eine neuromodulatorische Wirkung haben, die ausgehend von NO über die cGKI $\alpha$  an das G-Substrat weitergeleitet wird und mit der LTD endet.

Die cGKI ist auch an der Hemmung der Thrombozytenaggregation beteiligt (Massberg et al., 1999), der genaue Mechanismus ist aber unbekannt. Anhand von Westernblotanalysen konnte gezeigt werden, dass IRAG und die cGKI $\beta$  stark in humanen **Thrombozyten** exprimiert werden, cGKI $\alpha$  konnte nicht detektiert werden. Dies bedeutet, dass die cGKI $\beta$  mit ihrem Substrat IRAG eine wichtige Funktion in der NO-Signaltransduktion in Thrombozyten übernehmen und an der Regulation der Thrombozytenaggregation beteiligt

sein könnte. Dafür spricht auch, dass der trimere Komplex IRAG-cGKI $\beta$ -IP<sub>3</sub>RI aus humanen Thrombozyten isoliert werden konnte (Antl et al., 2002). Physiologisch gesehen ist die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten nach einem Endothelschaden ursächlich an vielen Krankheiten beteiligt, z.B. Angina Pectoris, Arteriosklerose und Thrombose.

## **D.2. Bedeutung der intrazellulären Proteinlokalisierung bezüglich der Spezifität des NO/cGMP-Signalweges**

In letzter Zeit häufen sich Hinweise, dass die Regulation des NO/cGMP-Signalweges durch subzelluläre Kompartimentierung der einzelnen Komponenten koordiniert wird. Dafür spricht auch die teils membranständige, teils zytosolische Lokalisierung der beteiligten Proteine. NO-Synthasen (NOS) und der BK<sub>Ca</sub>-Kanal sind in der Plasmamembran, CRP2 im Zytoskelett, die lösliche Guanylatzyklase (sGC) und cGKI im Zytosol und IRAG an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Neuere Studien zeigen, dass die Lokalisierung einiger dieser Proteine nicht auf die beschriebenen Orte beschränkt ist.

Die endotheliale NOS konnte nicht nur in der Plasmamembran gefunden werden, sondern auch perinukleär in der Golgi-Membran. Fulton et al. postulierten, dass die eNOS in der Golgi- und der Plasmamembran dynamisch reguliert wird. Die Lokalisierung ist für die Aktivierung der eNOS und somit für die VEGF (vascular endothelial growth factor)-abhängige NO-Produktion notwendig. Es existieren zwei zelluläre Kompartimente mit aktivierter, d.h. phosphorylierter eNOS (Fulton et al., 2002).

Im Fall der sGC konnte gezeigt werden, dass diese nicht nur im Zytosol vorkommt, sondern teilweise mit der Plasmamembran assoziiert ist. Zabel et al. zeigten, dass die aktivierte sGC an die Membran wandert und mit Caveolae (Mikrodomänen der Plasmamembran), die NOS enthalten, assoziiert. Dieser Vorgang ist von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig. NO wird prädominant an der Plasmamembran synthetisiert, ist lipophil und hat eine sehr kurze Halbwertszeit in wässriger Umgebung. Deshalb kann es nur von Vorteil sein, wenn das NO-Rezeptorenzym sGC am „Ort des Geschehens“ lokalisiert ist (Zabel et al., 2002).

Eine weitere Komponente der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade ist die cGKI; hier werden kontroverse Mechanismen diskutiert. Eine perinukleäre Lokalisation der cGKI $\alpha$  wurde in vaskulären glatten Muskelzellen der murinen Aorta beobachtet. Diese Zellen exprimieren auch die cGKI $\beta$  und IRAG, jedoch war die cGKI $\beta$  hauptsächlich im Zytosol zu finden. Diese Studie zeigte auch, dass die cGKI $\alpha$  den Noradrenalin-stimulierten Kalziumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum hemmte (Feil et al., 2002). Im Gegensatz dazu inhibierte die cGKI $\beta$  den Bradykinin-induzierten Kalziumausstrom in Anwesenheit ihres Substrates IRAG in COS-7 Zellen (Schlossmann et al., 2000). Zusätzlich konnte in COS-7 Zellen gezeigt werden, dass die cGKI $\beta$  perinukleär lokalisiert ist, wenn sie mit IRAG co-exprimiert wurde. Das bedeutet, dass die cGKI $\beta$  durch die Anwesenheit von IRAG zum

endoplasmatischen Retikulum wandert. Diese Beobachtung konnte mit der cGKI $\alpha$  nicht gemacht werden, was für die spezifische Interaktion zwischen IRAG und der cGKI $\beta$  spricht (Geiselhöringer et al., 2002). Die Effekte der cGKI-Isoformen hinsichtlich der Kalziumregulation könnten abhängig von dem Zelltyp und/oder Agonisten sein. Es wäre auch vorstellbar, dass Substrat-abhängig unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Das könnte auch die Diskrepanz hinsichtlich der zellulären Lokalisierung von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  erklären. Das Isoenzym, das aktiv ist, verändert seine intrazelluläre Lokalisierung. Für die Spezifität eines Mechanismus könnten auch Ankerproteine der cGKI (GKAP) verantwortlich sein. Es wurde beschrieben, dass die cGKI $\alpha$  an den Golgi-Komplex wandert, wenn es mit GKAP42 co-exprimiert wird (Yuasa et al., 2000). Auch IRAG könnte zusätzlich ein GKAP sein, da die cGKI $\beta$  in Anwesenheit von IRAG an das endoplasmatische Retikulum wandert (Geiselhöringer et al., 2002).

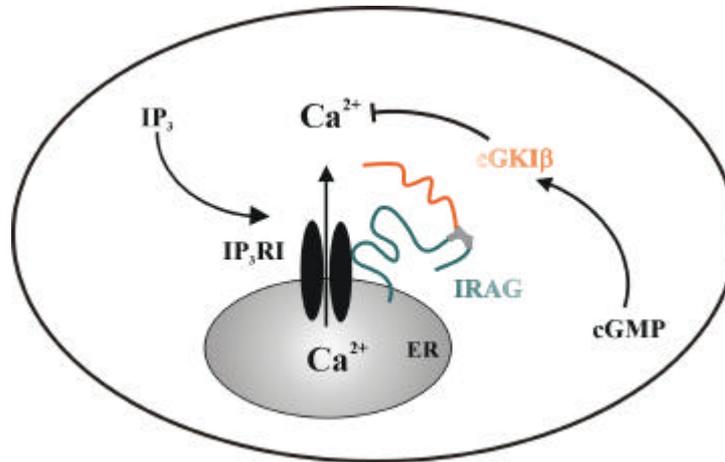
Es spricht also einiges dafür, dass es keine übergeordnete, globale Regulation in der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade gibt. Vielmehr handelt es sich um einen dynamischen Prozess, der eine schnelle und optimale, den intrazellulären Ereignissen angepasste Signalweiterleitung gewährleistet. Die Spezifität eines Signalweges könnte durch subzelluläre Kompartimentierung der einzelnen Komponenten reguliert werden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die cGKII nur aktiv ist, wenn sie in der Membran verankert ist (Vaandrager et al., 1998).

### **D.3. Interaktion von IRAG mit der cGKI**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen in dem trimeren Komplex IRAG-cGKI $\beta$ -IP<sub>3</sub>RI aufzuklären, insbesondere die Interaktion zwischen IRAG und der cGK. Mit Hilfe des Zwei-Hybrid Systems in Hefen konnte eine spezifische Assoziation von IRAG mit der cGKI $\beta$  nachgewiesen werden. IRAG interagiert nicht mit der cGKI $\alpha$  oder der cGKII. Zusätzlich wurde gezeigt, dass nur die Leucinzipper-Region des Aminoterminus der cGKI $\beta$  für die Interaktion mit IRAG benötigt wird. Die Interaktionsstelle von IRAG mit der cGKI $\beta$  konnte auf 33 Aminosäuren eingegrenzt werden (Abb. D-1). Da diese Peptid-Sequenz und die Sequenz des cGKI $\beta$  Leucinzippers sehr viele geladene Aminosäuren aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen assoziieren.

Die IRAG-Interaktionsstelle enthält keine cGKI-Phosphorylierungsstelle. Das heißt, dass die Interaktion zwischen der cGKI $\beta$  und IRAG unabhängig von dem Mechanismus ist, der die Bindung des Substrats und dessen Phosphorylierung erlaubt. Die Assoziation der beiden Proteine benötigt keine aktive Kinase und sollte sowohl in entspannten als auch in kontrahierten Muskelzellen stabil sein.

Die spezifische *in vivo* Interaktion zwischen IRAG und der cGKI $\beta$ , wie sie mittels des Zwei-Hybrid Systems gezeigt wurde, konnte durch *in vitro* Phosphorylierung und Co-Präzipitation bestätigt werden. Dabei stellt sich heraus, dass IRAG nur von der cGKI $\beta$  und nicht von der cGKI $\alpha$  phosphoryliert wird. Ebenso konnte IRAG nur gemeinsam mit der cGKI $\beta$  co-präzipitiert werden.



**Abbildung D-1: Spezifische Interaktion von IRAG mit der cGKI $\beta$  in der Zelle.** Es wird vermutet, dass IRAG als GKAP der cGKI $\beta$  fungiert. Durch die Interaktion der beiden Proteine kommt es zur Translokation der Kinase vom Zytoplasma an die Membran des ER (perinukleäre Lokalisierung), wo die cGKI $\beta$  ihre Wirkung entfaltet. Durch die Phosphorylierung von IRAG, das zusätzlich ein Substrat der cGKI $\beta$  darstellt, wird die Kalziumfreisetzung aus dem ER gehemmt. ER: endoplasmatisches Retikulum; graue Linien: Interaktionsdomänen

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, dass cGKs ihre *in vivo*-Substrate durch ihren Aminoterminus erkennen, indem sie mit dem Substratprotein interagieren. Dieser Mechanismus wurde nicht nur für die Interaktion von IRAG mit der cGKI $\beta$  gefunden, sondern auch für die cGKI $\alpha$  und die cGKII. Die Myristoylierung der cGKII und die daraus resultierende Verankerung der cGKII in der Membran ist die Voraussetzung für die Phosphorylierung des CFTR, ein Substrat der cGKII (Vaandrager et al., 1996 und 1998). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die cGKI $\alpha$  mit der Leucinzipper-Region an die MBS der Myosinphosphatase I (Surks et al., 1999), das Troponin T des Skelettmuskels (Yuasa et al., 1999) und das männliche Keimzellen-spezifische GKAP42 (Yuasa et al., 2000) bindet. In jedem dieser Fälle interagiert die Kinase mit einer Substratsequenz außerhalb der Phosphorylierungsstelle. Dies könnte von Vorteil sein, da eine permanente Assoziation der cGK an ihr Substrat eine schnelle Signalweiterleitung nach cGMP-Erhöhung ermöglicht.

Man weiß auch, dass der Aminoterminus der cGK für die Lokalisierung in der Zelle verantwortlich ist (Atkinson et al., 1991; Hofmann et al., 1992). Neuere Studien zeigen, dass spezifische Ankerproteine, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden sind, die Lokalisierung der cGK hinsichtlich ihres Wirkortes vermitteln. Die räumliche Anordnung der Ankerproteine sorgt für eine gewisse Spezifität, die die Antwort der cGK

vermittelt (Yuasa et al., 1999 und 2000). Das bedeutet, dass verschiedene Mechanismen über unterschiedliche Ankerproteine bzw. Substrate der cGK durch die Interaktion mit dem Aminoterminus reguliert werden. Derartige Ankerproteine sind für die cAMP-Kinasen und die Proteinkinasen C mehrmals beschrieben worden (Dodge & Scott, 2000; Mochly-Rosen et al., 1998). Für die Lokalisierung und Regulation der cAMP-Kinasen werden AKAPs (A kinase anchoring protein) benötigt. Im Fall der cGKI werden die Ankerproteine als GKAPs bezeichnet. Bisher wurden sowohl Troponin T als auch GKAP42 als Ankerproteine der cGKI $\alpha$  beschrieben (Yuasa et al., 1999 und 2000). Für die cGKI $\beta$  könnte IRAG als Ankerprotein fungieren, da IRAG in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und die cGKI $\beta$  bei einer Interaktion vom Zytoplasma zum ER translozieren muss. Da IRAG auch bei der Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration (Schlossmann et al., 2000) eine Rolle spielt, liegt die Vermutung nahe, dass IRAG bifunktionell ist und zusätzlich als GKAP fungiert.

IRAG, cGKI $\beta$  und der IP<sub>3</sub>RI konnten gemeinsam mittels cGMP-Agarose-Affinitätschromatographie aus COS-7 Zellen gereinigt werden. Im Gegensatz dazu konnte der IP<sub>3</sub>RI alleine mit der cGKI $\beta$  nicht co-präzipitiert werden. In der Zwei-Hybrid Analyse konnte keine Interaktion zwischen der cGKI $\beta$  und dem IP<sub>3</sub>RI detektiert werden. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass IRAG für die stabile Assoziation des trimeren Komplexes notwendig ist. Der IP<sub>3</sub>RI wurde des weiteren nur phosphoryliert, wenn die cGKI $\beta$  co-exprimiert wurde. Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass der IP<sub>3</sub>RI *in vivo* von der cGKI phosphoryliert wird (Komalavilas & Lincoln, 1996) und die Kalziumfreisetzung in Megakaryozyten beeinflusst (Tertyshnikova et al., 1998). In Thrombozyten konnte der trimere Komplex ebenfalls gefunden werden (Schlossmann et al., 2002), allerdings ist seine genaue Funktion nicht bekannt. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die Rolle des IP<sub>3</sub>RI in diesem Komplex zu verstehen.

## D.4. Ausblick

Weitere Studien sind notwendig, um die biologische Rolle der cGKI-Isoformen zu verstehen, v.a. da diese in glattmuskulären Geweben co-exprimiert sind. Die intrazelluläre Lokalisierung der beiden Enzyme mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie aufzuklären, wäre eine Möglichkeit, um zu sehen, ob sich cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in unterschiedlichen Kompartimenten befinden oder ob sie co-lokalisiert sind. Es ist vorstellbar, dass verschiedene Mechanismen Substrat-spezifisch gesteuert werden, da die cGKI unterschiedliche Funktionen durch die Phosphorylierung ihrer Substrate reguliert. Die Co-Expression der Isoenzyme könnte für eine schnelle und der jeweiligen intrazellulären Situation angepassten Signalweiterleitung dienen. Zusätzliche funktionelle Untersuchungen werden nötig sein, um die physiologische Bedeutung der cGKI z.B. in Uterus, Blase, Thrombozyten und Cerebellum genauer zu definieren. Da die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration viele zelluläre Funktionen reguliert, ist es möglich, dass IRAG verschiedene Signalwege beeinflusst. Mindestens zwei Funktionen, die Relaxation des glatten Muskels und neuromodulatorische Wirkung im ENS, sind durch die Ergebnisse dieser Arbeit denkbar. Weitere Informationen könnten mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie erhalten werden. Dadurch kann die genaue intrazelluläre Lokalisierung von IRAG und die Frage, ob IRAG tatsächlich mit der cGKI $\beta$  co-lokalisiert ist, aufgeklärt werden. Die physiologische Relevanz von IRAG in den einzelnen Organen bleibt noch offen. Um dieser Frage weiter nachzugehen, würde es sich anbieten, IRAG Knock-out Mäuse bezüglich ihres Phänotyps zu untersuchen.

Die Aufklärung der Mechanismen, die an der Relaxation des glatten Muskels beteiligt sind, ist von enormer Bedeutung. Man könnte die Ursachen von verschiedenen Krankheiten wie z.B. Bluthochdruck und einigen Magen-Darm-Erkrankungen erkennen und regulierend eingreifen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden, zusammen mit weiterführenden Experimenten, ein besseres Verständnis der möglichen physiologischen Funktionen der cGKI und IRAG und eine Basis zur Entwicklung von Pharmaka im Bereich von Hypertonie und Magen-Darm-Erkrankungen, die u.a. mit einer gestörten Peristaltik einhergehen.

## E. Zusammenfassung

Die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade spielt bei mehreren physiologischen Prozessen, u.a. bei der Regulation des glatten Muskeltonus und der Thrombozytenaktivität eine wichtige Rolle. Die cGKI beeinflusst die Kontraktilität des glatten Muskels durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration und durch die Modulation der Kalziumsensitivität der kontraktile Elemente. Es werden verschiedene Mechanismen der cGKI diskutiert, die zur Relaxation des glatten Muskels führen. Die genauen Abläufe sind nur teilweise bekannt. Eine Erniedrigung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann z.B. durch die Phosphorylierung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals oder von IRAG hervorgerufen werden. IRAG, ein neues Substratprotein der cGKI, liegt in einem trimeren Komplex mit der cGKI $\beta$  und dem IP<sub>3</sub>RI im glatten Muskel vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinexpression der cGKI-Isoformen, I $\alpha$  und I $\beta$ , und von IRAG in verschiedenen Mausegeweben untersucht. Für die proteinbiochemischen Untersuchungen von IRAG war es notwendig, einen spezifischen Antikörper aus Kaninchen zu generieren. Die Spezifität und Sensitivität im ng-Bereich des Antikörpers wurde anhand rekombinanten Proteins und verschiedener Gewebe bestätigt. Durch Westernblotanalysen stellte sich heraus, dass das Expressionsmuster von IRAG ähnlich dem der cGKI $\beta$  ist. Diese beiden Proteine wurden hauptsächlich in glattemuskulären Geweben wie z.B. Aorta, Magen-Darmtrakt, Uterus, Trachea und Blase und in Thrombozyten gefunden. Die cGKI $\alpha$  war hingegen in Herz, Lunge und Kleinhirn stark exprimiert.

Zusätzlich wurde die Lokalisierung der einzelnen Proteine im Gewebe mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Das Wissen hinsichtlich der Lokalisierung der cGKI-Isoformen und von IRAG lässt Rückschlüsse auf ihre biologische Funktion zu. Es konnte gezeigt werden, dass die cGKI $\alpha$ , die cGKI $\beta$  und IRAG in viszeralen und vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert werden. In der Aorta konnte in den Myozyten der Media Expression detektiert werden. Im Magen-Darm-Trakt waren die cGKI-Isoformen und IRAG in der Längs- und Ringmuskulatur der Muscularis lokalisiert. Die cGKI war auch deutlich in der Muscularis mucosae und in den Blutgefäßen der Submucosa im Darm exprimiert. Im Uterus zeigten alle drei Proteine Expression in der glatten Muskulatur des Myometriums. In der Trachea waren IRAG und die cGKI $\beta$  im M. trachealis lokalisiert. Jedoch sieht es so aus, als sei die cGKI $\beta$  die dominierende Isoform der cGKI im glatten Muskel. Neben der Lokalisierung in Myozyten konnte IRAG, aber auch teilweise die cGKI $\beta$  in Neuronen des Plexus myentericus, der einen Teil des enterischen Nervensystems darstellt, gefunden werden. Die cGKI $\alpha$  konnte auch in den Purkinjezellen des Kleinhirns detektiert werden. Das heißt, dass die cGKI und IRAG nicht nur an der Relaxation des

glatten Muskels beteiligt sind, sondern zusätzlich neuromodulatorische Funktionen ausüben könnten.

Die molekularen Mechanismen des trimeren Komplexes IRAG-cGKI $\beta$ -IP<sub>3</sub>RI, insbesondere die Interaktion zwischen der cGK und IRAG konnten durch eine Zwei-Hybrid Analyse in Hefen aufgeklärt werden. Es zeigte sich, dass IRAG spezifisch mit der cGKI $\beta$ , aber nicht mit der cGKI $\alpha$  oder cGKII interagiert. Die Interaktionsstelle von IRAG konnte auf 33 Aminosäuren im N-terminalen Bereich eingegrenzt werden. Für diese Interaktion, die wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen zustande kommt, ist nur die Leucinzipper-Region der cGKI $\beta$  notwendig. Die spezifische *in vivo* Interaktion von IRAG mit der cGKI $\beta$  in Hefen konnte durch *in vitro* Phosphorylierung und Co-Präzipitation in Säugetierzellen (COS-7 Zellen) bestätigt werden. IRAG wurde nur durch die  $\beta$ -Isoform der cGKI co-präzipitiert und phosphoryliert. Welche Rolle der IP<sub>3</sub>RI in dem Komplex spielt, werden weiterführende Untersuchungen klären.

## F. Anhang

### F.1. Primer

Alle Primer der folgenden Tabellen wurden bei der Firma MWG Biotech bezogen. Die Arbeitslösungen der PCR-Primer waren auf 25 pmol/μl, die der Sequenzierprimer auf 0,8 pmol/μl eingestellt. „v“ steht für Vorwärts- und „r“ für Rückwärtsprimer. Synthetische Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und „fett“ angegeben.

**Tabelle F-1: Primer, die für die Generierung der verschiedenen pEG202-LexA/IRAG Konstrukte verwendet wurden.**

Primer	Sequenz in 5`-3` Richtung	Konstrukt
AG10 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGCCCCACATTCCCGAGGAC	IRAG <sub>AS 53-845</sub>
AG11 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CGCGCTAGGGATACATGACTTGTAAGAAATG	
AG10 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGCCCCACATTCCCGAGGAC	IRAG <sub>AS 53-499</sub>
AG12 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CGCGCATCCCGCCCTTTGACTCTTCTTC	
AG13 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGGAACCTTAGTGAAGCGGCTGAGCAG	IRAG <sub>AS 472-708</sub>
AG14 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CGCGCATCAGGTTCAAGGATATTAAGCTTGG	
AG15 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGGATGGAGTCCCTCGCACAGCGCG	IRAG <sub>AS 673-845</sub>
AG11 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CGCGCTAGGGATACATGACTTGTAAGAAATG	
AG10 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGCCCCACATTCCCGAGGAC	IRAG <sub>AS 53-291</sub>
AG25 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CTAGTTTTCTTTTGTCTATCGT	
AG26 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CTTCGATCCCCTCCAGCGCCCG	IRAG <sub>AS 292-499</sub>
AG12 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CGCGCATCCCGCCCTTTGACTCTTCTTC	
AG27 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CCCCGAGAGTCCTCACCAGCT	IRAG <sub>AS 184-499</sub>
AG12 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CGCGCATCCCGCCCTTTGACTCTTCTTC	
AG10 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGCCCCACATTCCCGAGGAC	IRAG <sub>AS 53-184</sub>
AG30 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CTAACTGCTCCTGGACTTCCTTCC	
AG10 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGCCCCACATTCCCGAGGAC	IRAG <sub>AS 53-137</sub>
AG31 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CTAGTGCCCTGCAGGGTCCACAGA	
AG32 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CACCGACACTTGAAGGTTTCC	IRAG <sub>AS 119-184</sub>
AG30 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CTAACTGCTCCTGGACTTCCTTCC	
AG45 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CACGTCATTGACCTGGTCAAT	IRAG <sub>AS 137-184</sub>
AG30 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CTAACTGCTCCTGGACTTCCTTCC	
AG44 v	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CTCAGAGGAGGACAAGAAGAAA	IRAG <sub>AS 152-184</sub>
AG30 r	CGC <b><u>GGATCC</u></b> CTAACTGCTCCTGGACTTCCTTCC	

**Tabelle F-2: Primer, die für die Generierung der „Preys“ (pJG4-5/cGK; pJG-4-5/IP<sub>3</sub>RI) verwendet wurden.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz in 5`-3` Richtung</b>	<b>Konstrukt</b>
AG16 v AG20 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGGGCACCCTGCGGGATTTA CCG <b><u>CTCGAG</u></b> CGGTTAGAAGTCTATGTCCCATCC	cGKI $\beta$ <sub>AS 1-686</sub>
AG16 v AG19 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGGGCACCCTGCGGGATTTA CCG <b><u>CTCGAG</u></b> CGGTCACTGTGGACTCTTGGGGTAG	cGKI $\beta$ <sub>AS 1-104</sub>
AG16 v AG28 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGGGCACCCTGCGGGATTTA CCG <b><u>CTCGAG</u></b> TCAGATCACCGAGCGGTACTTGTC	cGKI $\beta$ <sub>AS 1-53</sub>
AG29 v AG19 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGCCGGCCACCCAGCAG CCG <b><u>CTCGAG</u></b> CGGTCACTGTGGACTCTTGGGGTAG	cGKI $\beta$ <sub>AS 54-104</sub>
AG22 v AG20 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGAGCGAGCTGGAGGAAGAC CCG <b><u>CTCGAG</u></b> CGGTTAGAAGTCTATGTCCCATCC	cGKI $\alpha$ <sub>AS 1-671</sub>
AG22 v AG23 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGATGAGCGAGCTGGAGGAAGAC CCG <b><u>CTCGAG</u></b> CGGTACCTTTCGGATTTGGTGAAC	cGKI $\alpha$ <sub>AS 1-89</sub>
AG21 v AG20 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGTCCAAGGATCTCATAAAGGAG CCG <b><u>CTCGAG</u></b> CGGTTAGAAGTCTATGTCCCATCC	cGKI <sub>common</sub> AS 105-686
JS51 v AG24 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> ATGGGAAATGGTTCAAGTGAAGCCC CCG <b><u>GAATTC</u></b> CGGTCAAGTCTTTATCCCAGCCTG	cGKI <sub>(mouse)</sub> AS 1-763
AG34 v AG35 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> ATGTCTGACAAAATGTCTAGT CCG <b><u>CTCGAG</u></b> TCACGATGCTCCACTGCTGCTATA	InsP <sub>3</sub> RI <sub>AS 1-825</sub>
AG36 v AG37 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> GACCGAGATCCCCAGGAGCAG CCG <b><u>CTCGAG</u></b> TCAATTGTAGAACACGAGGACGTC	InsP <sub>3</sub> RI <sub>AS 790-1345</sub>
AG38 v AG39 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> ATTGTCAAGGCCGAAGGGAAA CCG <b><u>CTCGAG</u></b> TCAATTGGACTCGTGGGTGGCGAT	InsP <sub>3</sub> RI <sub>AS 1314-2059</sub>
AG40 v AG41 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> GAGTACTGTCAAGGGCCTTGC CCG <b><u>CTCGAG</u></b> TCACCAGAAAGACATGTTTCGGGC	InsP <sub>3</sub> RI <sub>AS 2040-2275</sub>
AG42 v AG43 r	CCG <b><u>GAATTC</u></b> ACCTTTGCTGACCTGAGGAGT CCG <b><u>CTCGAG</u></b> TAGGCTGGCTGCTGTGGGTTGAC	InsP <sub>3</sub> RI <sub>AS 2590-2749</sub>

**Tabelle F-3: Primer, die zur Sequenzierung verschiedener Konstrukte und zur Amplifikation von IRAG für die Proteinexpression verwendet wurden.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz in 5`-3` Richtung</b>	<b>Bemerkung</b>
TH5 v	CTGAGTGGAGATGCCTCC	Sequenzierprimer für pJG4-5
TH7 r	GACAACCTTGATTGGAGACTT	Sequenzierprimer für pJG4-5
AG46 v	CCAATTGTCGTAGATCTTCGT	Sequenzierprimer für pEG202
AG18 v	AAGAGAAGCGTTTTACAGGCA	Sequenzierprimer für IRAG
IRAG1 r	GGGACTGTGGGCTCTGTTGAC	Sequenzierprimer für IRAG
IRAG2 r	CGTAATCTCTTTGGACTTCTC	Sequenzierprimer für IRAG
IRAG3 r	TGCCTGTAAAACGCTTCTCTT	Sequenzierprimer für IRAG
IRAG4 r	TTCTCTGTGTTTTCTCTGTC	Sequenzierprimer für IRAG
IRAG5 r	CTTTAGGTTCTCCACATACTG	Sequenzierprimer für IRAG
IRAG6 r	GGGCTCTCGCTCTTCTGTTCT	Sequenzierprimer für IRAG
JS24 v	TACAACAAGGGATACCAAGAA	Sequenzierprimer für IRAG
VQ185 v	GCATACCGAGTATATGGAATT	Sequenzierprimer für cGKI
RF137 r	GGCTGCCAGTCAGAAGCTCAT	Sequenzierprimer für cGKI
RF138 v	ATGAGCTTCTGACTGGCAGCC	Sequenzierprimer für cGKI
GS3 v	GAGAAAAGCTCATCACAGATGCC	Sequenzierprimer für cGKII
S1435 v	GAAAGTCACACAGAGCACAGA	Sequenzierprimer für cGKII
GS5 v	GCCATGAAGTGTATAAGGAAGAA	Sequenzierprimer für cGKII
AG1 v AG5 r	<u>CGGGATCCCGATGCCCCACATTCCCGAGGAC</u> <u>GGGGTACCCCTACCCGCCCTTTGACTCTTCTTC</u>	IRAG <sub>SD</sub>

## F.2. Restriktionsenzyme

**Tabelle F-4: Verwendete Restriktionsenzyme.**

<b>Restriktionsenzym</b>	<b>Erkennungssequenz</b>	<b>Puffer</b>	<b>Firma</b>
<i>EcoRI</i>	5'-G/AATTC-3'	H	Roche
<i>BamHI</i>	5'-G/GATCC-3'	B	Roche
<i>XhoI</i>	5'-C/TCGAG-3'	NEB2	NEB
<i>KpnI</i>	5'-GGTAC/C-3'	NEB1	NEB

Die optimale Inkubationstemperatur betrug für alle Enzyme 37°C.

### F.3. Verwendete Antikörper

**Tabelle F-5: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Anwendung/ Verdünnung	Referenz
IRAG Peptidantikörper 130-3; ungereinigtes Serum	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:500	Schlossmann et al., 2000
IRAGb <sub>SD</sub> -Antikörper; Nr 90 ungereinigtes Serum	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:1000	diese Arbeit
IRAGb <sub>SD</sub> -Antikörper; Nr 90 gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:500 Immunhistochemie/1:50	diese Arbeit
cGKI <sub>common</sub> ; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:200 Immunhistochemie/1:50	P. Ruth, F. Hofmann, München
cGKI $\alpha$ ; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:80 Immunhistochemie/1:50 (des ankonzentrierten AK)	Schlossmann et al., unveröffentlicht
cGKI $\beta$ 105-4; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:1000 Immunhistochemie/1:100	Schlossmann et al., unveröffentlicht
cGKI $\beta$ 104-4; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:2000 Immunhistochemie/1:200	Schlossmann et al., unveröffentlicht
IP <sub>3</sub> -RI; ungereinigtes Serum	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:1000	ABR Affinity Bioreagents
Tetra-His; gereinigt	Maus monoklonal	Westernblot/1:1000	Qiagen
LexA; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:5000	Invitrogen
p44/42 MAPKinase	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:1000	NEB (Cell Signaling) #9102
cGKII 78-2; gereinigt	Kaninchen polyklonal	Westernblot/1:500	Pfeifer et al., 1996
Anti-Kaninchen/ Alkalische Phosphatase	Esel polyklonal	Westernblot/1:5000	Dianova
Anti-Kaninchen/ Meerrettichperoxidase	Ziege polyklonal	Westernblot/1:100000	Dianova
Anti-Maus/ Alkalische Phosphatase	Esel polyklonal	Westernblot/1:5000	Dianova
Anti-Maus/ Meerrettichperoxidase	Esel polyklonal	Westernblot/1:100000	Dianova
Anti-Kaninchen biotinyliert	Ziege polyklonal	Immunhistochemie/1:200	Vectastain
Anti-Kaninchen/Cy3	Ziege polyklonal	Immunhistochemie/1:500	Dianova; #111-165-144
Anti-Kaninchen/FITC	Ziege polyklonal	Immunhistochemie/1:500	Dianova; #111-095-144

## F.4. Firmenverzeichnis

ABR BioReagents, Vertrieb über Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland  
Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland  
Biochrom KG, ,Berlin, Deutschland  
Biolog Life Sience Institute, Bremen, Deutschland  
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland  
Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
Clontech, Heidelberg, Deutschland  
Corning Costar, Bodenheim, Deutschland  
Dianova, Hamburg, Deutschland  
Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland  
Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland  
ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland  
Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland  
Merck Eurolab GmbH, Ismaning, Deutschland  
Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland  
MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland  
NEB, New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland  
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland  
Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland  
Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland  
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland  
Serva, Heidelberg, Deutschland  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland  
Stratagene, Amsterdam, Niederlande  
Vector Laboratories, Vectastain, Vertrieb über Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland

## F.5. Geräteverzeichnis

ABI Prism<sup>TM</sup> Sequence-Analyser, Perkin-Elmer Applied Biosystems

Brutschrank, Memmert

Certomat<sup>®</sup> R (Schüttler), B. Braun

Digitalkamera Nikon D1x, Nikon

Electrophoresis Unit 2117 Multiphor II, LKB Bromma

Gel Dryer Model 583, Bio-Rad

Gene Pulser<sup>TM</sup> (zur Elektroporation), Bio-Rad

IR 1500 Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, Flow-Laboratories

Konfokales Laser-Scan Mikroskop DM IRB, Leica

Laminar Air HB 2448, Heraeus Instruments

Microm HM 335 E (Microtom), GFL

Mikroskop Axioskop, Zeiss

Mini Protean II, Bio-Rad

Nikon Kamera Typ F 301, Nikon

Phosphoimager, raytest

Photometer specord 40, Analytik Jena

Thermomixer compact, Eppendorf

Ultra Turrax, IKA Werk

Ultraschallgerät F.T.Z. C006/66

UNO-Thermoblock für PCR, Biometra

Vacuum Concentrator, Bachofer

Wasserbad Haake Fisions D8, Haake DH

Zentrifugen: 5417 R, 5415 C und 5804 R, Eppendorf; J2-HS, Beckmann;  
Sigma 2K15, B. Braun

## G. Literaturverzeichnis

### G.1. Zitierte Veröffentlichungen

Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. & Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive  $K^+$  channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 32950-6.

Ammendola, A., Geiselhoringer, A., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I $\beta$ . *J Biol Chem*, **276**, 24153-9.

Antl, M., Geiselhöringer, A., Werner, C., Köcher, T., Wilm, M., Schlossmann, J. & Hofmann, F. (2002). NO/cGMP-dependent phosphorylation of IRAG in human platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **365**, R142.

Atkinson, R.A., Saudek, V., Huggins, J.P. & Pelton, J.T. (1991).  $^1H$  NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry*, **30**, 9387-95.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., & Struhl, K. (1995). Current protocols in molecular biology, Chapters 13 and 20. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Bachmann, B.J. & Low, K.B. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, 8<sup>th</sup> ed. *Microbiol Rev*, **54**, 130-197.

Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.

Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. & Zong, X. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358**, 140-4.

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res*, **7**, 1513-23.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

Brent, R. & Ptashne, M. (1985). A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature*, **314**, 198.

Brent, R. & Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-36.

Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J. & Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem*, **269**, 14509-17.

- Casnellie, J.E. & Greengard, P. (1974). Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent phosphorylation of endogenous substrate proteins in membranes of mammalian smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1891-5.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-52.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9578-82.
- Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A. & Lincoln, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **40**, 923-31.
- Dodge, K. & Scott, J.D. (2000). AKAP79 and the evolution of the AKAP model. *FEBS Lett*, **476**, 58-61.
- El-Husseini, A.E., Bladen, C. & Vincent, S.R. (1995). Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem*, **64**, 2814-7.
- Endo, S., Suzuki, M., Sumi, M., Nairn, A.C., Morita, R., Yamakawa, K., Greengard, P. & Ito, M. (1999). Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2467-72.
- Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S. & Hofmann, F. (2002). Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res*, **90**, 1080-6.
- Förstermann, U., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M. & Murad, F. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, **42**, 1849-57.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. & Keef, K.D. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK<sub>Ca</sub> channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274**, 10927-35.
- Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, J.P., Lin, M., Li, K.X., Michell, B., Kemp, B.E., Rodman, D. & Sessa, W.C. (2002). Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem*, **277**, 4277-84.
- Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A. & Lohmann, S.M. (1996). Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest*, **98**, 662-70.
- Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Ammendola, A., Schlossmann, J. & Hofmann, F. (2001). Tissue distribution of the InsP<sub>3</sub>-receptor associated cGMP kinase substrate IRAG. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **363**, R46.

- Geiselhöringer, A., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2002). Analysis of the localization of cGMP kinase and its substrate IRAG. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **365**, R141.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. & Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. & Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-60.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. & Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791-803.
- Hall, K.U., Collins, S.P., Gamm, D.M., Massa, E., DePaoli-Roach, A.A. & Uhler, M.D. (1999). Phosphorylation-dependent inhibition of protein phosphatase-1 by G- substrate. A Purkinje cell substrate of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **274**, 3485-95.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. & Ruth, P. (1992). Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1135**, 51-60.
- Hofmann, F., Ammendola, A. & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113**, 1671-6.
- Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. & Walter, U. (1994). Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*, **225**, 21-7.
- Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S. & Fishman, M. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, **75**, 1273-1286.
- Huber, A., Trudrung, P., Storr, M., Franck, H., Schusdziarra, V., Ruth, P. & Allescher, H.D. (1998). Protein kinase G expression in the small intestine and functional importance for smooth muscle relaxation. *Am J Physiol*, **275**, G629-37.
- Huber, A., Neuhuber, W.L., Klugbauer, N., Ruth, P. & Allescher, H.D. (2000). Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 5504-11.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, **34**, 879-86.
- Kaznatcheyeva, E., Lupu, V.D. & Bezprozvanny, I. (1998). Single-channel properties of inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor heterologously expressed in HEK-293 cells. *J Gen Physiol*, **111**, 847-56.
- Keilbach, A. (1992a). Immunologischer Nachweis der Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase. Dissertation Heidelberg.

- Keilbach, A., Ruth, P. & Hofmann, F. (1992b). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-73.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. & Hofmann, F. (1999). Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci*, **19**, 48-55.
- Koller, A. (2002). Identifizierung und Funktion von Effektorproteinen der NO/cGMP Signalkaskade. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
- Komalavilas, P. & Lincoln, T.M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem*, **271**, 21933-8.
- Komalavilas, P., Shah, P.K., Jo, H. & Lincoln, T.M. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **274**, 34301-9.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-207.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, M.R., Li, L. & Kitazawa, T. (1997). Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 5063-8.
- Lev-Ram, V., Nebyelul, Z., Ellisman, M.H., Huang, P.L. & Tsien, R.Y. (1997). Absence of cerebellar long-term depression in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Learn Mem*, **4**, 169-77.
- Lincoln, T.M., Thompson, M. & Cornwell, T.L. (1988). Purification and characterization of two forms of cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *J Biol Chem*, **263**, 17632-7.
- Loscalzo, J. & Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, **38**, 87-104.
- MacDonald, J.A., Walker, L.A., Nakamoto, R.K., Gorenne, I., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. & Haystead, T.A. (2000). Phosphorylation of telokin by cyclic nucleotide kinases and the identification of in vivo phosphorylation sites in smooth muscle. *FEBS Lett*, **479**, 83-8.
- Markert, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H.R., Jarchau, T. & Lohmann, S.M. (1995). Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest*, **96**, 822-30.

- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. & Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*, **189**, 1255-64.
- Mignery, G.A., Newton, C.L., Archer, B.T., 3rd & Südhof, T.C. (1990). Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, **265**, 12679-85.
- Mochly-Rosen, D. & Gordon, A.S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb J*, **12**, 35-42.
- Murthy, K.S. & Makhlof, G.M. (1998). Differential regulation of phospholipase A2 (PLA2)-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. Inhibitory phosphorylation of PLA2 by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **273**, 34519-26.
- Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S. & Nakano, T. (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal*, **11**, 671-6.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. & Fassler, R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, **274**, 2082-6.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. & Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, **17**, 3045-51.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. & Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 105-49.
- Pfister, G. (2001). Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, **91**, 497-503.
- Roswell, D.F. & White, E.H. (1978). The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol*. **57**, 409-423.
- Ruth, P. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther*, **82**, 355-72.
- Ruth, P., Pfeifer, A., Kamm, S., Klatt, P., Dostmann, W.R. & Hofmann, F. (1997). Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha. *J Biol Chem*, **272**, 10522-8.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. & Hofmann, F. (1993). Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 2623-7.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Feil, R., Hofmann, F. & Beavo, J.A. (2002). Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **277**, 3310-7.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandberg, M., Natarajan, V., Ronander, I., Kalderon, D., Walter, U., Lohmann, S.M. & Jahnsen, T. (1989). Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat. *FEBS Lett*, **255**, 321-9.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. & Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87**, 825-30.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. & Loirand, G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 21722-9.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. & Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP<sub>3</sub> receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, **404**, 197-201.
- Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **522 Pt 2**, 177-85.
- Sonnenburg, W.K. & Beavo, J.A. (1994). Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. & Mendelsohn, M.E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science*, **286**, 1583-7.
- Swayze, R.D. & Braun, A.P. (2001). A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K<sup>+</sup> channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J Biol Chem*, **276**, 19729-37.
- Tertyshnikova, S. & Fein, A. (1998). Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1613-7.
- Uhler, M.D. (1993). Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem*, **268**, 13586-91.

- Vaandrager, A.B., Ehlert, E.M., Jarchau, T., Lohmann, S.M. & de Jonge, H.R. (1996). N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem*, **271**, 7025-9.
- Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M. & de Jonge, H.R. (1998). Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1466-71.
- Vaandrager, A.B., Tilly, B.C., Smolenski, A., Schneider-Rasp, S., Bot, A.G., Edixhoven, M., Scholte, B.J., Jarchau, T., Walter, U., Lohmann, S.M., Poller, W.C. & de Jonge, H.R. (1997). cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Iβ. *J Biol Chem*, **272**, 4195-200.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. & Kurtz, A. (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*, **102**, 1576-82.
- Wernet, W., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, **251**, 191-6.
- Wu, J., Wang, Y., Rowan, M.J. & Anwyl, R. (1998). Evidence for involvement of the cGMP-protein kinase G signaling system in the induction of long-term depression, but not long-term potentiation, in the dentate gyrus in vitro. *J Neurosci*, **18**, 3589-96.
- Wyatt, T.A., Naftilan, A.J., Francis, S.H. & Corbin, J.D. (1998). ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **274**, H448-55.
- Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M. & Liu, M. (2001). Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-β3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **276**, 19770-7.
- Yu, S.M., Hung, L.M. & Lin, C.C. (1997). cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation*, **95**, 1269-77.
- Yuasa, K., Michibata, H., Omori, K. & Yanaka, N. (1999). A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T. *J Biol Chem*, **274**, 37429-34.
- Yuasa, K., Omori, K. & Yanaka, N. (2000). Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase Iα. *J Biol Chem*, **275**, 4897-905.
- Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., Smolenski, A., Muller, H., Kronich, P., Kugler, P., Walter, U., Schnitzer, J.E. & Schmidt, H.H. (2002). Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol*, **4**, 307-11.

## G.2. Eigene Veröffentlichungen

### Abstracts

Antl, M., Geiselhöringer, A., Werner, C., Köcher, T., Wilm, M., Schlossmann, J. & Hofmann, F. (2002). NO/cGMP-dependent phosphorylation of IRAG in human platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **365**, R142.

Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Ammendola, A., Ruth, P., Schlossmann, J. & Hofmann, F. (2000). Regulation of intracellular calcium through phosphorylation of IRAG by cGKI $\beta$ . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **362**, R58.

Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Ammendola, A., Schlossmann, J. & Hofmann, F. (2000). Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels durch Phosphorylierung von IRAG durch cGKI $\beta$ . „Biolog 2000“, 2. Münchner Kongress für Biowissenschaften.

Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Ammendola, A., Schlossmann, J. & Hofmann, F. (2001). Tissue distribution of the InsP<sub>3</sub>-receptor associated cGMP kinase substrate IRAG. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **363**, R46.

Geiselhöringer, A., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2002). Analysis of the localization of cGMP kinase and its substrate IRAG. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **365**, R141.

Hofmann, F., Geiselhöringer, A. & Schlossmann, J. (2001). Regulation of cytosolic calcium by NO/cGMP. *Biol Chemistry*, **382**, b181.

Schlossmann, J., Ammendola, A., Geiselhöringer, A. & Hofmann, F. (2001). Phosphorylation of IRAG by cGKI $\beta$  mediates regulation of InsP<sub>3</sub>-induced calcium release. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, **363**, R168.

Schlossmann, J., Geiselhöringer, A., Antl, M., Werner, C., Köcher, T., Wilm, M. & Hofmann, F. (2002). Identification of the cGMP kinase substrate IRAG in platelets. *The Pharmacologist*, **44**, Number 2, A120-73.20.

### Originalarbeiten

Ammendola\*, A., Geiselhöringer\*, A., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I $\beta$ . *J Biol Chem*, **276**, 24153-9.

\*These authors contributed equally to this work.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichst danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme an seinem Institut, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Anregungen zur Lösung kleinerer und größerer Probleme.

Dr. Jens Schlossmann für die Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung und für sein persönliches Engagement.

Dr. Robert Feil für die freundliche Aufnahme in seinem Labor im Erdgeschoss während der ersten zwei Jahre meiner Doktorarbeit.

Susi, Wiebke und Kleppi für die tatkräftige Unterstützung bei der Präparation von Mäusen sowie Matthias, Sabine (der gute Geist) und allen anderen „Erdgeschosslern“ für das gute Arbeitsklima und die musikalische Untermalung bei der Arbeit.

Allen Kollegen des „ersten Stocks“ für den regen Austausch von Erfahrungen (v.a. Geli und Katja) im Laboralltag, für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft.

Ein Dankeschön an alle anderen Mitarbeiter des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima, und natürlich an alle, die ich vergessen habe.

Meiner Familie für ihr Verständnis und ihre Unterstützung. Besonders danke ich Herrn Hermann Gaigl, der mir in den letzten Jahren nicht nur bei kleineren und größeren „Computer-Katastrophen“ zur Seite stand.