

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München

**Funktionelle Domänen
des cGMP-Kinase Substratproteins IRAG**

Melanie Antl

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. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 02.08.04 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 11.10.04 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	1
A.1.	Signaltransduktion durch NO/cGMP.....	1
A.2.	Struktur und Lokalisation der cGMP-Kinasen	2
A.3.	Wirkungsmechanismen der cGMP-Kinasen	3
A.4.	Struktur, Lokalisation und Funktion von IRAG	8
A.5.	Ziele dieser Arbeit	9
B	Material und Methoden.....	10
B.1.	Organismen und Plasmide.....	10
B.2.	Anzucht und Stammhaltung	11
B.2.1.	Nährmedium	11
B.2.2.	Hemmstoffe	11
B.2.3.	Kultivierung und Stammhaltung.....	12
B.3.	Molekularbiologische Methoden.....	12
B.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNS	12
B.3.2.	Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten	12
B.3.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	13
B.3.4.	Enzymatische Modifikation von DNS.....	13
B.3.4.1.	Spaltung von DNS mit Restriktionsenzymen	13
B.3.4.2.	Dephosphorylierung linearer DNS durch alkalische Phosphatase.....	14
B.3.4.3.	Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase.....	14
B.3.5.	Auftrennung von DNS-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	14
B.3.6.	Polymerase-Kettenreaktion.....	15
B.3.6.1.	Reagenzien und Standard-PCR.....	16
B.3.6.2.	Klonierung von PCR-Amplifikaten	17
B.3.7.	Sequenzierung von DNS.....	17

B.3.8.	Transformation von Bakterien	18
B.3.8.1.	Transfer von DNS in <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	18
B.3.8.1.1.	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	18
B.3.8.1.2.	Elektroporation	19
B.3.8.2.	Transfer von DNS in <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	19
B.4.	Kultur und Transfektion von eukaryontischen COS-7 Zellen.....	20
B.4.1.	Verwendete Zelllinie.....	20
B.4.2.	Zellkultur	20
B.4.3.	Transfektion.....	21
B.4.4.	Ernten der Zellen	23
B.4.5.	Analyse der Proteinexpression und Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie.....	23
B.5.	Isolierung humaner Thrombozyten.....	24
B.6.	Allgemeine Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen	25
B.6.1.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	25
B.6.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
B.6.3.	Coomassie-Färbung	26
B.6.4.	Westernblot.....	27
B.7.	Spezielle Methoden zur Charakterisierung von Proteinen	29
B.7.1.	Membranpräparation aus COS-7 Zellen und humanen Thrombozyten.....	29
B.7.2.	Affinitätsreinigung über cGMP-Agarose	30
B.7.3.	Immunpräzipitation.....	31
B.7.4.	<i>In vitro</i> Phosphorylierung	31
B.7.5.	<i>In vivo</i> Phosphorylierung.....	32
B.7.6.	Autoradiographie	33
B.7.7.	Massenspektrometrie	34
B.8.	Herstellung phosphospezifischer IRAG-Antikörper	35

C	Ergebnisse.....	37
C.1.	Identifizierung der Transmembrandomäne/n von IRAG.....	37
C.1.1.	Herstellung von IRAGa/IRAGb-TM _C Konstrukten	37
C.1.2.	Intrazelluläre Lokalisation von IRAGa/IRAGb-TM _C	38
C.1.2.1.	Untersuchung der IRAG-TM _C -EGFP Fusionsproteine	38
C.1.2.2.	Untersuchung der IRAG-TM _C pcDNA3.1 Konstrukte.....	40
C.1.3.	Einfluss der Domänen TM _C und TM _N auf die Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP ₃ RI	42
C.2.	Identifizierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierungsstellen von IRAG	44
C.2.1.	Intrazelluläre Lokalisation von IRAG in humanen Thrombozyten.....	44
C.2.2.	Interaktion von IRAG mit cGKI β und IP ₃ RI in humanen Thrombozyten.....	45
C.2.3.	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten.....	47
C.2.4.	Identifizierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierungsstellen von IRAG in humanen Thrombozyten	49
C.2.5.	Untersuchung der Phosphorylierungsstellen in COS-7 Zellen	52
C.2.6.	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 in humanen Thrombozyten	54
C.2.6.1.	Herstellung und Spezifität der pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper	54
C.2.6.2.	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von Ser677 in humanen Thrombozyten	57
C.2.6.3.	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von Ser664 in humanen Thrombozyten	59
D	Diskussion.....	68
D.1.	Funktionelle Bedeutung der Domänen TM_C und TM_N	68
D.2.	IRAG als Substrat der cGKI in humanen Thrombozyten.....	69

D.3.	Physiologische Bedeutung von IRAG in Thrombozyten	71
D.4.	Ausblick	74
E	Zusammenfassung.....	75
F	Anhang.....	77
F.1.	Verwendete Primer in der PCR und Sequenzierung.....	77
F.2.	Verwendete Antikörper in der Westernblot-Analyse.....	78
F.3.	Verwendete Phosphorylierungsreagenzien.....	79
G	Literaturverzeichnis	80
G.1.	Zitierte Veröffentlichungen	80
G.2.	Eigene Veröffentlichungen	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1:	NO/cGMP-Signaltransduktion.....	2
Abb. A-2:	Regulation der Thrombozytenaktivität.....	6
Abb. A-3:	Schematische Struktur von IRAG.....	8
Abb. C-1:	IRAG Konstrukte zur Identifizierung der Transmembrandomäne/n.....	38
Abb. C-2:	Lokalisation der IRAGa oder IRAGb Wt/-TM _C -EGFP Fusionsproteine in COS-7 Zellen.....	39
Abb. C-3:	Expression und Lokalisation von IRAGa oder IRAGb Wt/-TM _C und cGKI β in COS-7 Zellen.....	40
Abb. C-4:	Interaktion von IRAGa oder IRAGb Wt/-TM _C mit cGKI β und IP ₃ RI in COS-7 Zellen.....	43
Abb. C-5:	Lokalisation von IRAG und cGKI β in humanen Thrombozyten.....	45
Abb. C-6:	Interaktion von IRAG mit cGKI β und IP ₃ RI in humanen Thrombozyten.....	46
Abb. C-7:	Stimulierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten mit cGMP und GEA/NO.....	47
Abb. C-8:	Stimulierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten mit cGMP und cBIMPS.....	49
Abb. C-9:	Identifizierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierungsstellen von IRAG in humanen Thrombozyten.....	50
Abb. C-10:	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von IRAG in COS-7 Zellen.....	53
Abb. C-11:	Spezifität der pSer664-IRAG Antikörper.....	55
Abb. C-12:	Spezifität der pSer677-IRAG Antikörper.....	56
Abb. C-13:	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von Ser677 in humanen Thrombozyten.....	58
Abb. C-14:	<i>In vivo</i> Phosphorylierung von Ser664 in humanen Thrombozyten.....	60
Abb. C-15:	Stimulierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von Ser664 mit cGMP und cBIMPS.....	62
Abb. C-16:	Stimulierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von Ser664 mit DEA/NO.....	64
Abb. C-17:	Stimulierung der <i>in vivo</i> Phosphorylierung von Ser664 mit Forskolin.....	66
Abb. D-1:	Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch IRAG und cGKI β	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle B-1:	Verwendete Organismen.....	10
Tabelle B-2:	Verwendete Plasmide.....	10
Tabelle B-3:	Verwendete Restriktionsenzyme.....	13
Tabelle C-1:	Vergleich der cGMP-abhängigen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Phosphorylierungsstellen von IRAG.....	51
Tabelle F-1:	PCR-Primer für die Generierung von IRAGa/IRAGb-TM _C Konstrukten...	77
Tabelle F-2:	Verwendete Sequenzierprimer.....	77
Tabelle F-3:	Verwendete Antikörper in der Westernblot-Analyse.....	78
Tabelle F-4:	Verwendete Phosphorylierungsreagenzien.....	79

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid	kb	Kilobasen
AC	Adenylylzyklase	kDa	Kilodalton
ADP	Adenosindiphosphat	Km^R	Kanamycinresistenz
ANP	Atriales natriuretisches Peptid	l	Liter
AP	Alkalische Phosphatase	LB	Luria-Bertani
AP^R	Ampicillinresistenz	M, mM	Molar, Millimolar
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MCS	Multiple Klonierungsstelle
AR	Autoradiogramm	Mes	Morpholinoethansäure
ATP	Adenosintriphosphat	mg	Milligramm
BA	Bis-Acrylamid	MG	Molekulargewicht
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	min	Minute
BNP	gehirnspezifisches natriuretisches Peptid	ml	Milliliter
bp	Basenpaare	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
BSA	Rinderserumalbumin	MP	Magermilchpulver
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase	µg	Mikrogramm
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	µl	Mikroliter
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase	µm	Mikrometer
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	NBT	Nitroblautetrazolium
CML	Chronische myeloische Leukämie	ng	Nanogramm
CNG	durch zyklische Nukleotide aktiviert	nm	Nanometer
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid	NO	Stickstoffmonoxid
cpm	counts per minute	NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat	OD	Optische Dichte
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid	PAS	Protein A Sepharose
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	Phosphat gepufferte Saline
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PDE	Phosphodiesterase
DTT	Dithiothreitol	pGC	partikuläre Guanylylzyklase
		PhI	Phosphataseinhibitoren
		PI	Proteaseinhibitoren

EDTA	Natrium-Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	pmol	Picomol
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetat	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	pro	Promotor
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PVDF	Polyvinylidendifluorid
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	RNS	Ribonukleinsäure
EtOH	Ethanol	rpm	Umdrehungen pro Minute
FCS	Fötales Kälberserum	RT	Raumtemperatur
g	Gravitationskonstante oder Gramm	SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
GTP	Guanosintriphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
h	Stunde	sec	Sekunde
HBS	Hepes gepufferte Saline	sGC	lösliche Guanylylzyklase
Hepes	Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA
HRPO	Meerrettichperoxidase	TBST	Tris gepufferte Saline Tween
IB	Immunblot	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
IgG	Immunglobulin G	TM	Transmembrandomäne
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
IP₃RI	IP ₃ -Rezeptor Typ I	U	Unit, Einheit
		UV	Ultraviolett
		Wt	Wildtyp
		Zyt	Zytosol

A Einleitung

A.1. Signaltransduktion durch NO/cGMP

Der gasförmige Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine entscheidende Rolle bei vielen physiologischen Prozessen. Neben der Regulation des Blutdrucks ist dieses Signalmolekül u.a. bei der Thrombozytenaktivität, der Sinneswahrnehmung und möglicherweise bei komplexen Leistungen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt. Außerdem fungiert NO als Neurotransmitter in Neuronen. Aufgrund seiner Zytotoxizität bei erhöhter Freisetzung aus Makrophagen und Granulozyten hat dieser Botenstoff auch bei der Immunabwehr eine große Bedeutung. Im Organismus wird die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS) katalysiert (Abb. A-1). Bei dieser Reaktion wird der terminale Guanidinstickstoff des Arginins unter Bildung von Citrullin zu NO oxidiert (Ignarro et al., 1999). In der Familie der NOS werden drei Isoformen unterschieden: eine Kalzium-unabhängige induzierbare NO-Synthase (iNOS), die hauptsächlich in Makrophagen und Neutrophilen vorkommt, und zwei Kalzium-abhängige konstitutive Formen, welche in Endothelzellen und Thrombozyten (endotheliale NO-Synthase, eNOS) bzw. in Nervenzellen (neuronalen NO-Synthase, nNOS) gefunden werden (Förstermann et al., 1991). Freigesetztes NO kann leicht durch die Zellmembran der Zielzellen diffundieren und dort verschiedene Reaktionen verursachen. So kann es zur Entstehung von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffradikalen, zur ADP-Ribosylierung von Proteinen oder zur Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC) kommen. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Der sekundäre Botenstoff cGMP wird ebenfalls durch die partikuläre Guanylylzyklase (pGC) generiert, deren Isoformen A, B, und C u.a. durch natriuretische Peptide (ANP, BNP und CNP) aktiviert werden (Abb. A-1).

Bisher sind drei Zielstrukturen von cGMP bekannt, die das NO-Signal in verschiedenen Zelltypen weiterleiten (Abb. A-1). Zum einen werden cAMP-spezifische Phosphodiesterasen (PDE) aktiviert oder gehemmt, wodurch die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration beeinflusst wird (Sonnenburg & Beavo, 1994). In der Retina oder im olfaktorischen System können zyklisches-Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) geöffnet werden, die für die Signalverarbeitung im Seh- bzw. Riechprozess notwendig sind (Biel et al., 1998). Außerdem werden cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) aktiviert (Pfeifer et

al., 1999; Ruth, 1999), was u.a. zur Relaxation des glatten Muskels (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000) oder zur Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Massberg et al., 1999) führt.

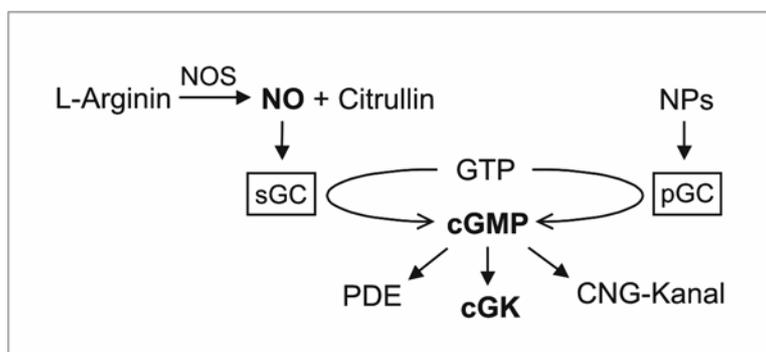


Abbildung A-1: NO/cGMP-Signaltransduktion. NO entsteht aus L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS). Die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC) durch NO und die Stimulierung der partikulären Guanylylzyklase (pGC) durch natriuretische Peptide (NPs) führt zur Generierung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Zielproteine für cGMP sind Phosphodiesterasen (PDE), zyklisches-Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK).

A.2. Struktur und Lokalisation der cGMP-Kinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. In Säugetieren existieren zwei cGK-Gene, eines kodiert die lösliche cGKI und das andere die membrangebundene cGKII. Durch alternatives Spleißen des Aminoterminus der cGKI entstehen die beiden Isoformen cGKI α und cGKI β , die sich in den ersten 90-100 Aminosäuren unterscheiden (Wernet et al., 1989). Bei den cGKs handelt es sich um Homodimere, deren monomere Untereinheiten ein Molekulargewicht von 76-78 kDa (cGKI) bzw. von 87 kDa (cGKII) aufweisen. In ihrer Grundstruktur bestehen die Kinasen aus drei funktionellen Untereinheiten: einer aminoterminalen, einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne (Pfeifer et al., 1999). Der N-Terminus enthält eine Leucinzipper-Region, welche die Homodimerisierung der Enzyme und die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht (Atkinson et al., 1991; Surks et al., 1999; Ammendola et al., 2001). Außerdem ist der Aminoterminus für die Autoinhibierung der katalytischen Domäne bei Abwesenheit von cGMP verantwortlich und vermittelt die intrazelluläre Zielsteuerung der Kinasen zu verschiedenen subzellulären Strukturen (Hofmann et al., 1992; Hofmann et al., 2000). Die regulatorische Domäne besteht aus zwei cGMP-Bindungstaschen. Durch Bindung von cGMP kommt es zur Konformationsänderung der Enzyme, wodurch die autoinhibitorische

Wirkung des N-Terminus aufgehoben und die Phosphorylierung der Substratproteine ermöglicht wird. Die katalytische Domäne enthält eine ATP- und eine Substratbindestelle. Nach Bindung von Mg-ATP katalysiert sie die Übertragung des endständigen Phosphatrestes von ATP auf Serin- oder Threoninreste der Zielproteine.

Die cGKII ist durch Myristoylierung des N-Terminus fest in der Zellmembran verankert (Vaandrager et al., 1996), während die cGKI überwiegend im Zytosol lokalisiert ist (Keilbach et al., 1992). Generell konnte die Expression der beiden cGMP-Kinasen in vielen verschiedenen Organen und Zelltypen nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration der cGKI wurde im glatten Muskel, in Thrombozyten und im Cerebellum detektiert. Außerdem ist sie im Hippocampus, in Spinalganglien, in der neuromuskulären Endplatte und in der Niere stark exprimiert. Geringe Mengen konnten in Endothelzellen von Blutgefäßen und einigen Immunzellen nachgewiesen werden (Pfeifer et al., 1999). Die cGKI α Isoform ist hauptsächlich in Lunge, Herz und Cerebellum lokalisiert, die cGKI β Isoform überwiegend in glattmuskulären Geweben wie Uterus, Aorta, Blutgefäße, Intestinum oder Trachea, sowie in Thrombozyten und im Hippocampus (Lincoln et al., 1988; Keilbach et al., 1992; Geiselhöringer, 2002). Die cGKII wird in verschiedenen Hirnregionen und in der intestinalen Mukosa, sowie in Niere, Lunge und Chondrozyten exprimiert (Gambaryan et al., 1996; Lohmann et al., 1997).

A.3. Wirkungsmechanismen der cGMP-Kinasen

Aufgrund ihrer weit verbreiteten Lokalisation in verschiedenen Geweben und Zelltypen sind die physiologischen Funktionen der cGKs entsprechend vielfältig. Die cGKII beeinflusst z.B. die Chlorid/Wasser-Sekretion im Intestinum durch Phosphorylierung des CFTR- (zystische Fibrose Transmembran-Leitfähigkeitsregulator) Chloridkanals (Vaandrager et al., 1997; Pfeifer et al., 1996). Außerdem ist sie bei der Reninfreisetzung in der Niere (Wagner et al., 1998), sowie an der enchondralen Ossifikation und damit am Knochenwachstum (Pfeifer et al., 1996) beteiligt.

Untersuchungen an cGKI-defizienten Mäusen zeigen eine deutlich reduzierte Lebenserwartung dieser Tiere mit einem Durchschnittsalter von 4-8 Wochen. Außerdem weisen cGKI knock-out Mäuse z.B. einen erhöhten Blutdruck und schwerwiegende intestinale Störungen auf (Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000; Ny et al., 2000). Durch die Analysen verschiedener glattmuskulärer Organe von cGKI-defizienten Mäusen zeigte sich,

dass eine der Hauptfunktionen der cGKI die Relaxation des glatten Muskels ist. Generell wird der Tonus der glatten Muskulatur durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration oder durch Modulation der Kalziumsensitivität der kontraktiven Elemente reguliert (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001; Schlossmann et al., 2003). Dabei kommt es durch verschiedene Agonisten, wie z.B. Noradrenalin oder Angiotensin II, zur Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen, welche im folgenden die Phospholipase C β stimulieren. Dies führt zur Synthese von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol. Durch Bindung von IP $_3$ an den IP $_3$ -Rezeptor Typ I (IP $_3$ RI), einen Kalziumkanal in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER), wird die Kalziumfreisetzung aus dem ER induziert. Außerdem strömt extrazelluläres Kalzium durch L-Typ Kalziumkanäle in die Zelle (Moosmang et al., 2003; Wegener et al., 2004). Diese erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert die Kalzium-Calmodulin abhängige Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), die darauf hin die leichte Kette des Myosins (MLC) phosphoryliert. Dadurch wird die Myosin-ATPase stimuliert und der glatte Muskel kontrahiert. Als Folge der sinkenden intrazellulären Kalziumkonzentration wird die MLC durch die Myosinphosphatase (PP1M) dephosphoryliert und der Muskel entspannt sich wieder. Kalzium-unabhängig wird die Kontraktion des glatten Muskels durch die Veränderung der Kalziumsensitivität des Aktin-Myosin-Gerüsts reguliert. Dabei kommt es u.a. über die Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins Rho zur Stimulierung der Rho-Kinase. Dies führt zur Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-bindenden Untereinheit (MBS) der PP1M, wodurch dessen Aktivität gehemmt wird. Da die MLCK davon nicht beeinflusst wird, nimmt die Phosphorylierung der MLC zu und der Muskel kontrahiert.

Durch Phosphorylierung ihrer Substratproteine greift die cGKI in die Regulation des glatten Muskeltonus ein und ist sowohl bei der Verminderung des intrazellulären Kalziumspiegels (Pfeifer et al., 1998) als auch bei der Modulation der Kalziumsensitivität (Bonnevier et al., 2004) beteiligt. Hierfür stehen verschiedene Mechanismen zur Diskussion:

Eine Möglichkeit stellt die Phosphorylierung der Phospholipase C β_3 oder des RGS-2 (Regulator des G-Protein signaling-2) dar, wodurch die IP $_3$ -Synthese reguliert wird (Ruth et al., 1993; Xia et al., 2001; Tang et al., 2004). Des Weiteren phosphoryliert die cGKI Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (BK $_{Ca}$) und erhöht damit deren Öffnungswahrscheinlichkeit. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran, spannungsabhängige Kalziumkanäle (z.B. L-Typ Kalziumkanäle) werden geschlossen und der Kalziumeinstrom in die Zelle wird verringert (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999; Sausbier et al., 2000;

Swayze & Braun, 2001). Durch Phosphorylierung des IP₃-Rezeptor assoziierten cGKI Substrates IRAG konnte eine Hemmung der IP₃-induzierten Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern (ER) nachgewiesen werden, wodurch ebenfalls die intrazelluläre Kalziumkonzentration vermindert wird (Schlossmann et al., 2000). IRAG ist Gegenstand dieser Arbeit und wird im folgenden (A.4) genauer beschrieben. Auch der IP₃-Rezeptor wird durch die cGKI phosphoryliert (Komalavilas & Lincoln, 1996), jedoch ist bisher noch unklar, ob diese Phosphorylierung direkt mit der Kalziumfreisetzung zusammenhängt (Haug et al., 1999). Ein weiteres Zielprotein der cGKI stellt Phospholamban dar (Raeymaekers et al., 1988), welches nach Aktivierung durch die cGKI den Kalziumrücktransport durch die Kalzium-ATPase in intrazelluläre Speichervesikel des ER moduliert.

Als Kalzium-unabhängiger Mechanismus wurde die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit (MBS) der PP1M durch die cGKI α -Isoform beschrieben (Surks et al., 1999). Allerdings konnte bisher noch keine direkte Auswirkung der Phosphorylierung auf die Aktivität der Phosphatase festgestellt werden (Nakamura et al., 1999). Außerdem wird möglicherweise das kleine GTP-bindende Protein Rho von der cGKI phosphoryliert, wodurch der GDP/GTP-Austausch verhindert wird und die Rho-Kinase inaktiv bleibt. Als Folge bleibt die PP1M im aktiven Zustand und die Sensitivität der kontraktile Elemente für intrazelluläres Kalzium wird reduziert (Somlyo & Somlyo, 2000; Pfitzer, 2001).

Neben der Relaxation der glatten Muskulatur stellt die Regulation der Thrombozytenaktivität eine weitere wichtige Funktion der cGKI dar. Grundsätzlich wird die Aktivität der Thrombozyten über sehr komplexe Mechanismen reguliert, welche durch verschiedene Agonisten und Antagonisten beeinflusst werden (Schwarz et al., 2001; Münzel et al., 2003) (Abb. A-2). Als Stimulatoren wirken dabei z.B. Thrombin, Thromboxan A₂ (TxA₂) oder Adenosindiphosphat (ADP), die über verschiedene GTP-bindende Proteine (G₁₃, G_q oder G_i) und anschließende Signalkaskaden die Veränderung der Plättchenoberfläche („shape change“), sowie die Adhäsion, Aggregation und Sekretion vermitteln (Abb. A-2). Auf der anderen Seite wird die Thrombozytenaktivität durch verschiedene Antagonisten gehemmt. Dabei können z.B. Prostaglandine (PGI₂, PGE₁) nach Stimulierung der Adenylylzyklase (AC) eine erhöhte Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und somit die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK) auslösen (Abb. A-2). Ein anderer Mechanismus kann über die NO/cGMP-Signalkaskade und anschließende Aktivierung der cGKI erfolgen. Die inhibitorische Wirkung von NO auf Thrombozyten, welche durch Stimulierung der sGC und einer daraus folgenden verstärkten cGMP-Synthese vermittelt

wird, ist bereits seit längerer Zeit bekannt (Moro et al., 1996). Da Thrombozyten die cGKI stark exprimieren (Waldmann et al., 1986), liegt die Weiterleitung des NO/cGMP-Signals über dieses Enzym nahe. In experimentellen Untersuchungen an Thrombozyten von cGKI knock-out Mäusen konnte eine erhöhte Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten festgestellt werden (Massberg et al., 1999), was ebenfalls darauf hindeutet, dass die cGKI bei der Hemmung der Thrombozytenaktivität beteiligt ist.

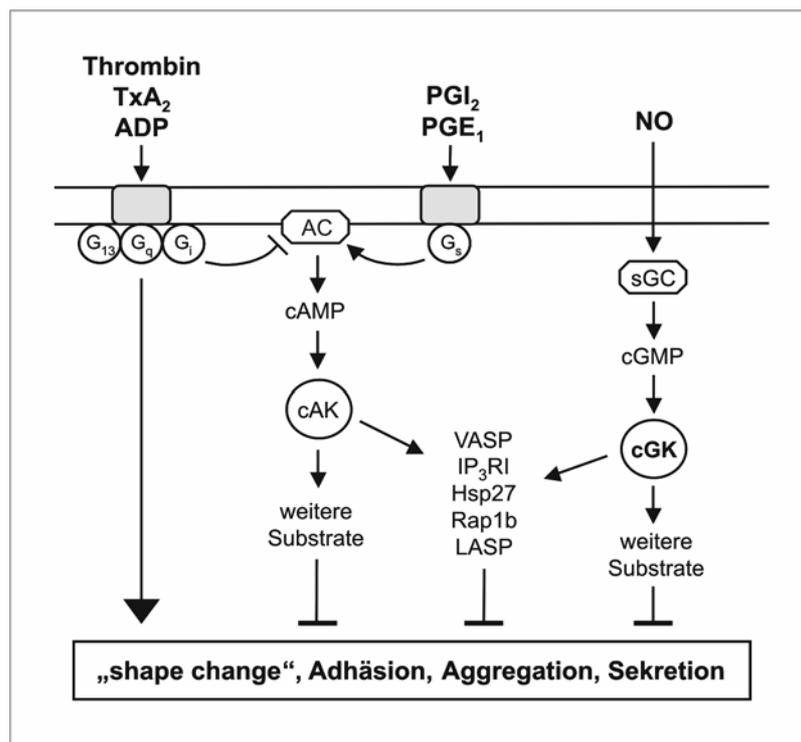


Abbildung A-2: Regulation der Thrombozytenaktivität. Agonisten: Thrombin, Thromboxan A₂ (TxA₂), Adenosindiphosphat (ADP); Antagonisten: NO, Prostaglandine (PGI₂, PGE₁); GTP-bindende Proteine (G₁₃, G_q, G_i, G_s), zyklisches Adenosin-/Guanosinmonophosphat (cAMP/cGMP), Adenylyl-/Guanylylzyklase (AC/sGC), cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase (cAK/cGK), Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP), IP₃-Rezeptor Typ I (IP₃RI), Hitzeschockprotein 27 (Hsp27), kleines GTP-bindendes Protein Rap1b (Rap1b), LIM und SH3 Protein (LASP). Weitere Erklärungen im Text.

Wie in den glatten Muskelzellen sind auch in Thrombozyten verschiedene Zielproteine bekannt, welche durch die cGKI phosphoryliert werden (Abb. A-2):

Eines der am besten untersuchten Substrate ist das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein, VASP, das an fokalen Adhäsionen assoziiert vorliegt und bei der Regulation der Aktin-filamentassemblierung und Aktinpolymerisation beteiligt ist (Reinhard et al., 2001). Dieses Protein weist drei Phosphorylierungsstellen auf, welche mit unterschiedlicher Spezifität von

der cGK und cAK phosphoryliert werden (Smolenski et al., 1998). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die VASP-Phosphorylierung in engem Zusammenhang mit der Inhibierung der Thrombozytenaktivität steht und möglicherweise über die Hemmung des Fibrinogenrezeptors (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) erfolgt (Horstrup et al., 1994; Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Neuere Untersuchungen an VASP-defizienten Thrombozyten aus der Maus weisen darauf hin, dass VASP bei der Inhibierung der Thrombozytenadhäsion an die Endothelschicht von Blutgefäßen beteiligt ist und dass die NO/cGMP-induzierte Hemmung der Endotheladhäsion bei diesen Thrombozyten unterbunden wird (Massberg et al., 2004). Abgesehen von VASP exprimieren Thrombozyten alle drei bisher bekannten IP₃-Rezeptoren (Typ I, II und III), wobei Typ I hauptsächlich in den intrazellulären Membranen lokalisiert ist und dort die Kalziumfreisetzung reguliert (El-Daher et al., 2000). Cavallini et al. (1996) konnten zeigen, dass die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP in Thrombozyten einerseits zur Hemmung der IP₃-induzierten Kalziumfreisetzung führen und andererseits die Phosphorylierung des IP₃RI fördern. Des Weiteren stellt das Hitzeschockprotein 27 (Hsp27) ein Substrat der cGKI dar, welches möglicherweise bei der Inhibierung der Aktinpolymerisation beteiligt ist (Butt et al., 2001). Auch das kleine GTP-bindende Protein Rap1b kann durch die cGKI phosphoryliert werden. Dadurch wird die Aktivität von Rap1b gehemmt und das Protein wandert von der Zellmembran der Thrombozyten zum Zytoskelett (Franke et al., 2000). Erst vor kurzem wurde LASP (LIM und SH3 Protein) als Substrat der cGKI entdeckt, welches ebenfalls nach Phosphorylierung von der Zellmembran ins Zytosol transloziert wird und wahrscheinlich bei der Organisation des Zytoskeletts und der Zellbewegung beteiligt ist (Butt et al., 2003). Alle hier genannten Zielproteine der cGKI werden außerdem von der cAK phosphoryliert (Abb. A-2).

Als weitere mögliche Funktionen wurde gezeigt, dass die cGKI auch bei der Migration, Proliferation und Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen beteiligt ist (Hofmann et al., 2000). Die hier beschriebenen Mechanismen verdeutlichen die unterschiedlichen Wirkungsweisen der cGKI, die vor allem die Funktion von Blutgefäßen und Thrombozyten beeinflussen.

A.4. Struktur, Lokalisation und Funktion von IRAG

Das Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG wurde aus mikrosomalen Membranen von glatten Muskelzellen der Rindertrachea isoliert und als Substratprotein der cGKI identifiziert (Schlossmann et al., 2000). Es wird durch die cGKI phosphoryliert und liegt in einem trimeren Komplex zusammen mit dem IP₃RI und der cGKI β im glatten Muskel vor. Die beiden Isoformen IRAGa und IRAGb unterscheiden sich lediglich darin, dass IRAGa eine zusätzliche N-terminale Sequenz aus 52 Aminosäuren enthält (vgl. Abb. A-3). Mittels Hydropathie-Analyse konnte für beide Isoformen eine mögliche C-terminale Transmembrandomäne (TM_C) ermittelt werden, welche wahrscheinlich der Verankerung von IRAG in der Membran dient. IRAGa weist eine weitere putative TM (TM_N) am N-Terminus auf (Abb. A-3). In der zentralen Region beinhaltet IRAG eine coiled-coil Domäne, die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein könnte. Die Interaktionsstelle von IRAG mit der cGKI konnte auf 33 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des IRAG Proteins eingegrenzt werden (vgl. Abb. A-3). Dieser Bereich interagiert spezifisch mit der Leucinzipper-Region der cGKI β , jedoch nicht mit cGKI α oder cGKII (Ammendola et al., 2001). Mittels Massenspektrometrie konnten fünf cGMP-abhängige *in vitro* Phosphorylierungsstellen von IRAG identifiziert werden (Abb. A-3).

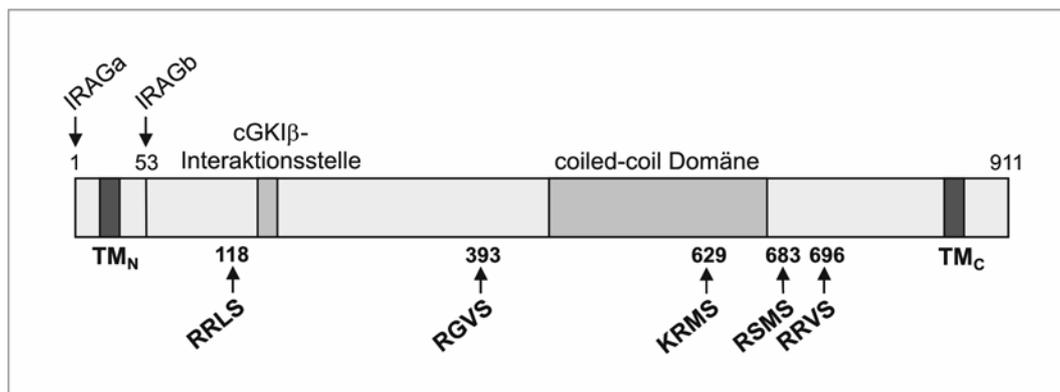


Abbildung A-3: Schematische Struktur von IRAG. Angegeben sind Aminosäurepositionen und Konsensussequenzen der fünf cGMP-abhängigen *in vitro* phosphorylierten Serine. TM_C bzw. TM_N steht für C- bzw. N-terminale Transmembrandomäne. Weitere Erklärungen im Text.

Ähnlich der cGKI β ist IRAG hauptsächlich in glattmuskulären Geweben, wie z.B. Aorta, Magen-Darmtrakt, Uterus, Trachea und Blase, sowie in Thrombozyten lokalisiert (Geiselhöringer, 2002). Untersuchungen mit heterolog exprimierten IRAG-Konstrukten in COS-7

Zellen zeigten außerdem eine perinukleäre Lokalisation von IRAG innerhalb der Zellen (Schlossmann et al., 2000). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass der trimere Komplex aus IRAG, IP₃RI und cGKI β an den Membranen des ER gebildet wird und IRAG somit möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Modulation der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern spielen könnte.

Funktionelle Studien in COS-7 Zellen bestätigten diese Vermutung, nachdem eine Hemmung der IP₃-induzierten Kalziumfreisetzung aus dem ER nach Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI β beobachtet wurde (Schlossmann et al., 2000). Erst kürzlich konnte außerdem in isolierten humanen glatten Muskelzellen aus Colon gezeigt werden, dass IRAG auch in diesen Zellen bei der NO/cGMP-induzierten Inhibierung der Kalziumfreisetzung beteiligt ist (Fritsch et al., 2004). Der exakte Mechanismus, wie IRAG die Hemmung der Kalziumfreisetzung moduliert, ist allerdings noch unklar.

A.5. Ziele dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war, eine oder beide der möglichen Transmembrandomänen von IRAG, TM_C und/oder TM_N, eindeutig als echte TM zu identifizieren. Dazu sollten verschiedene Konstrukte von IRAG hergestellt werden, welche entweder nur eine oder keine der beiden Domänen enthalten. Nach Expression in COS-7 Zellen sollte dann zunächst die intrazelluläre Lokalisation dieser Konstrukte (frei im Cytosol oder in den Membranen verankert) überprüft werden. Des Weiteren sollte die Funktion von TM_C und TM_N bei der Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP₃RI mittels Affinitätschromatographie und Phosphorylierung untersucht werden.

Nachdem bereits fünf verschiedene Serine von IRAG identifiziert werden konnten, welche cGMP-abhängig *in vitro* phosphoryliert werden, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die exakten *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG aufzuklären. Dazu sollte vorab die Lokalisation und die gesamt *in vivo* Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten untersucht werden. Anschließend sollten mittels Massenspektrometrie die genauen *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG bestimmt werden. Durch Herstellung phosphospezifischer IRAG Antikörper sollte außerdem die *in vivo* Phosphorylierung der neu identifizierten phosphorylierten Aminosäuren nach Aktivierung der cGKI analysiert 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 einer kurzen Beschreibung und ihrer Herkunft aufgeführt. Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann und Low (1990).

Tabelle B-1: Verwendete Organismen

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	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^fZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	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 ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tabelle B-2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pcDNA3.1	CMVpro-MCS, Ap ^R	Klonierungsvektor	Invitrogen
pEGFP-N3	CMVpro-MCS und EGFP, Km ^R	Klonierungsvektor	Clontech
pCR [®] -BluntII-TOPO	<i>ccdB</i> (lethales Gen), Km ^R	Subklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pBluescript II KS+	T3/T7pro-MCS, Ap ^R	„Leervektor“ bei Transfektion	Stratagene
pMT3-cGKIβ	pMT3 (SV40pro-DHFR) mit cGKIβ, Ap ^R	Proteinexpression	Ruth et al., 1997
pCMVI-9-IP ₃ RI	CMVpro-MCS, Ap ^R , mit neuronalem IP ₃ RI (S1-/S2+)	Proteinexpression	Mignery et al., 1990
pcDNA3.1 IRAGa	pcDNA3.1 (-) mit IRAGa, Ap ^R	Proteinexpression, Template für PCR	Schlossmann et al., 2000
pcDNA3.1 IRAGb	pcDNA3.1 (-) mit IRAGb, Ap ^R	Proteinexpression	Schlossmann et al., 2000
pEGFP-N3 IRAGa	pEGFP-N3 mit IRAGa, Km ^R	Proteinexpression	Schlossmann et al., 2000
pEGFP-N3 IRAGb	pEGFP-N3 mit IRAGb, Km ^R	Proteinexpression	Schlossmann et al., 2000
pcDNA3.1 IRAGa-TM _C	pcDNA3.1 (-) mit IRAGa ohne carboxyterminale TM, Ap ^R	Proteinexpression	diese Arbeit
pcDNA3.1 IRAGb-TM _C	pcDNA3.1 (-) mit IRAGb ohne carboxyterminale TM, Ap ^R	Proteinexpression	diese Arbeit

pEGFP-N3 IRAGa-TM _C	pEGFP-N3 mit IRAGa ohne carboxyterminale TM, Km ^R	Proteinexpression	diese Arbeit
pEGFP-N3 IRAGb-TM _C	pEGFP-N3 mit IRAGb ohne carboxyterminale TM, Km ^R	Proteinexpression	diese Arbeit
pcDNA3.1 IRAGa _{RSMS/A}	pcDNA3.1 (-) mit RSMS/A-Mutante von IRAGa, Ap ^R	Proteinexpression	Ammendola et al., 2001
pcDNA3.1 IRAGa _{RRVS/A}	pcDNA3.1 (-) mit RRVS/A-Mutante von IRAGa, Ap ^R	Proteinexpression	Ammendola et al., 2001
pcDNA3.1 IRAGa _{RSMS/A-RRVS/A}	pcDNA3.1 (-) mit RSMS/A-RRVS/A Doppelmutante von	Proteinexpression	Ammendola et al., 2001

B.2. Anzucht und Stammhaltung

B.2.1. Nährmedium

Das verwendete LB-Vollmedium wurde zur Sterilisierung 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Temperaturempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Renner GMBH) und nach Abkühlen des Mediums auf 50°C (Festmedium) oder vor der Inokulation (Flüssigmedium) zugegeben. Dem festen Nährmedium wurden 18 g Agar pro Liter zugesetzt und mit dem Medium autoklaviert.

LB-Medium (Luria-Bertani)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l
pH 7,4	

B.2.2. Hemmstoffe

Zur Herstellung von Selektivmedien und zur Plasmidstabilisierung bei der Kultivierung plasmidhaltiger Stämme wurde als Hemmstoff Ampicillin mit einer Stammlösung von 100 mg/ml in 50% EtOH/H₂O_{bidest.} (100 µg/ml Endkonzentration im Medium) oder Kanamycin mit einer Stammlösung von 50 mg/ml in H₂O_{bidest.} (50 µg/ml Endkonzentration im Medium) verwendet. Das sterilfiltrierte (Porengröße 0,2 µm, Renner GMBH) Antibiotikum wurde dem Nährmedium nach dem Autoklavieren zugegeben.

B.2.3. Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (B.2.1). 5 ml Flüssigkulturen wurden ausgehend von einer Einzelkolonie angeimpft und in 14 ml Plastikröhrchen (Falcon) über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen 1:1000 bzw. mit einer gewissen Zellzahl (bestimmt durch Trübungsmessung bei OD₆₀₀) beimpft.

E. coli Stämme können 4 bis 6 Wochen bei 4°C auf Agarplatten gehalten werden. Dazu wurden Einzelkoloniausstriche über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Ausgehend von diesen Kulturen können Glycerinkulturen angelegt werden, die bei -80°C über mehrere Jahre stabil sind. Für deren Herstellung wurden *E. coli* Kulturen 2:1 mit 50%igem Glycerin (Roth) gemischt und in Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C aufbewahrt. Die Zugabe der Glycerinlösung bewirkt, dass die Zellen unempfindlicher gegenüber der Lagerung bei tiefen Temperaturen sind.

B.3. Molekularbiologische Methoden

B.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS

Für die Gewinnung hochwertiger Plasmid-DNS für präparative Zwecke (Sequenzierung und Klonierung) wurden die kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) und Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1997) und einer anschließenden DNS-Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Präparation erfolgte mit den im Kit enthaltenen Lösungen und nach den Angaben des Herstellers.

B.3.2. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten

Die Reinigung, Aufkonzentrierung und Umpufferung von DNS-haltigen Lösungen nach enzymatischer Modifikation (B.3.4) sowie die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarsegelen (B.3.5) und die Abtrennung der amplifizierten PCR-Fragmente von den Agenzien der PCR-Reaktion (B.3.6) erfolgte mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von Amersham. Diese Methode nützt die Eigenschaft der DNS aus, an eine spezifisch dafür entwickelte Säulenmatrix aus Glasfaser zu binden. Die anschließende Elution der DNS kann mit dem im Kit vorhandenen Elutionspuffer oder H₂O_{bidest.} erfolgen. Alle benötigten Lösungen und das Arbeitsprotokoll sind im Kit enthalten.

B.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch in einem UV-Vis-Spektrometer (Analytik Jena) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine 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 OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

B.3.4. Enzymatische Modifikation von DNS

B.3.4.1. Spaltung von DNS mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen (auch 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 werden entweder glatte Enden (blunt ends) oder einander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (sticky ends) gebildet. Die DNS-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-Hydroxylgruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht (B.3.4.3).

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen und sind in Tabelle B-3 angegeben. Die jeweiligen Erkennungssequenzen und Reaktionspuffer wurden den Produktbeschreibungen des Herstellers entnommen. Die optimale Inkubationstemperatur betrug für alle Enzyme 37°C.

Tabelle B-3: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Reaktionspuffer
<i>EcoRI</i>	5'-G/AATTC-3'	NEB 1-4
<i>BamHI</i>	5'-G/GATCC-3'	NEB 1-4
<i>XbaI</i>	5'-T/CTAGA-3'	NEB 2

Für analytische Zwecke wurden 0,2 bis 0,5 µg DNS mit 3 bis 5 U Enzym, für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten (für Klonierungen) wurden 2 bis 5 µg DNS mit 5 bis 10 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 µl für 1 bzw. 3 h bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend mit Auftragspuffer versetzt und zur Auswertung auf ein Agarosegel aufgetragen (B.3.5).

B.3.4.2. Dephosphorylierung linearer DNS durch alkalische Phosphatase

Die Abspaltung endständiger 5'-Phosphatgruppen verhindert die Ligation der modifizierten Enden, z.B. die Religation von linearisierten Vektor-Molekülen. Zu der durch Restriktionsverdau linearisierten (B.3.4.1) und anschließend aufgereinigten DNS (etwa 5 pmol) wurden 5 U alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP, Roche) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 20 min inaktiviert.

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 (B.3.4.1). 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-fach molarem Überschuß) wurden in Ligasepuffer (NEB) gemischt und für 3-16 h bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0.025 µm, Millipore) pipettiert und 20 min gegen H₂O_{bidest.} dialysiert, um den hohen Salzgehalt zu reduzieren. Das rekombinante Plasmid konnte im Anschluss in *E. coli* transformiert (B.3.8) werden.

B.3.5. Auftrennung von DNS-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

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 höher das Molekulargewicht ist. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht bei 302 nm als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum

Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1 kb Ladder, Invitrogen). 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.

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 0,2 bis 12 kb wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) verwendet. Für analytische und präparative Zwecke wurden 1-2% (w/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. Bei der präparativen Gelelektrophorese wurde die zu isolierende DNS-Bande möglichst rasch im UV-Licht sichtbar gemacht, der entsprechende Gelbereich mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Die DNS wurde anschließend mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ isoliert (B.3.2).

10x TBE

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20 mM

Elektrophoresepuffer

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H₂O_{bidest.})

Auftragspuffer (6x dye)

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18% (v/v)
EDTA, pH 8,0	0,12 mM
Bromphenolblau (Serva)	0,1% (w/v)
Xylencyanol FF (Sigma)	0,1% (w/v)

6x TBE

Ethidiumbromidstammlösung

10 mg/ml (Sigma), wässrig

B.3.6. Polymerase-Kettenreaktion

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 u.a. die Generierung artifiziieller 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 (Tabelle B-2) zu gewinnen.

B.3.6.1. Reagenzien und Standard-PCR

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert, die jeweiligen Sequenzen und Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle F-1 angegeben. Die lyophilisierte Primer-DNS wurde nach den Angaben des Herstellers in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst, so dass eine Stammlösung mit der Konzentration 100 pmol/ μl vorlag. Davon wurde eine Arbeitslösung von 25 pmol/ μl hergestellt. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Als Polymerase wurde die Platinum[®]Pfx DNA Polymerase von Invitrogen verwendet, die aufgrund der 3'→5'-Exonukleaseaktivität („Proofreading“) in der Lage ist, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu korrigieren. Die Arbeitslösung der dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP [NEB]) wurde auf 10 mM eingestellt. Die Reaktionsansätze für die PCR wurden nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Die folgende Amplifikation wurde in einem UNO-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt.

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

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe der zu amplifizierenden DNS-Fragmente (Elongationszeit und –temperatur) und Primersequenzen (Annealingtemperatur) optimiert.

Die amplifizierten DNS-Fragmente, welche für die Konstruktion von Plasmiden eingesetzt wurden, sind aufgereinigt (B.3.2) und nach ihrer Klonierung sequenziert (B.3.7) worden, um mögliche Fehler der Polymerase beim Einbau der Nukleotide zu erkennen.

B.3.6.2. Klonierung von PCR-Amplifikaten

Zur Subklonierung der gereinigten Pfx-PCR-Amplifikate ohne Überhänge wurde das Zero Blunt TOPO Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Im Kit sind kompetente *E. coli* TOP10 Zellen und der entsprechende Klonierungsvektor pCR[®]-BluntII-TOPO mit dem *ccdB* Gen enthalten (Tabelle B-1 und B-2). Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

B.3.7. 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 verschiedener fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Sequenzierautomaten von Perkin-Elmer Applied Biosystems (ABI Prism[™] Sequence-Analyser). Dabei erkennt ein Laser die Abfolge der fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmente, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Aus den Rohdaten wurde von einem Computerprogramm (Multiscan 100ES, Sony) die DNS-Sequenz errechnet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierprimer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert und sind mit den jeweiligen Sequenzen in Tabelle F-2 wiedergegeben. Nach dem Lösen der lyophilisierten Primer-DNS in H₂O_{bidest.} wurde eine Arbeitslösung von 0,8 pmol/μl hergestellt. Pro Reaktionsansatz wurden bis zu 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Dazu wurde ein Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer Applied Biosystems) gegeben, der die AmpliTaq DNS Polymerase, Pufferlösung, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthält.

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra (Uno-Thermoblock) durchgeführt.

Reaktionsansatz:	DNS (50-500 ng)	x μ l	
	Ready Reaction Mix (RRM)	4 μ l	
	Primer (0,8 pmol/ μ l)	4 μ l	
	H ₂ O _{bidest.}	ad 20 μ l	
Amplifikation:	Denaturierung	95°C, 2 min	
	Denaturierung	95°C, 30 sec	} 25x
	Primeranlagerung	50°C, 40 sec	
	Polymerisation	60°C, 4 min	

Nach der Reinigung der Sequenzierprodukte über eine Gelfiltrationssäule (CentriSep Column, Perkin-Elmer Applied Biosystems) wurde die getrocknete DNS in 20 μ l Template Suppression Reagent (TSR, Perkin-Elmer Applied Biosystems) aufgenommen und vor der Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

B.3.8. Transformation von Bakterien

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

B.3.8.1. Transfer von DNS in *E. coli* mittels Elektroporation

B.3.8.1.1. Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* XL1-Blue Zellen (Tabelle B-1) wurden 250 ml LB-Medium (B.2.1) mit einer *E. coli* XL1-Blue Übernachtskultur 1:1000 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 (logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 4000x g geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet erst mit eiskaltem H₂O_{bidest.} und dann mit eiskalter 10%iger Glycerinlösung (Roth) gewaschen (10 min, 4°C, 4000x g). Nach Dekantieren

des Überstandes wurden die Zellen 1:1 in 10% Glycerin resuspendiert und als 50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert.

B.3.8.1.2. Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem dialysierten Ligationsansatz (100-500 ng DNS) (B.3.4.3) vorsichtig gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Dicke 1mm, EquiBio) pipettiert. Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser und Gene Controller von BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: Spannung 2,5 kV, Kapazität 25 µF, Widerstand 200 Ω und durchschnittliche Zeitkonstante 4,5 ms. Nach der Transformation wurden die Bakterien in LB-Medium (B.2.1) zur phänotypischen Expression für 60 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidisolierung (B.3.1) und entsprechender Restriktionsanalyse (B.3.4.1) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

B.3.8.2. Transfer von DNS in *E. coli* mittels Hitzeschock

Zur Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock wurden die chemisch kompetenten *E. coli* XL2-Blue MRF' Zellen (Tabelle B-1) von Stratagene verwendet. Die Zellen wurden mit dem Ligationsansatz (B.3.4.3) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch den anschließenden Hitzeschock bei 42°C wurde die rekombinante DNS eingeschleust. Nach einer Erholungsphase in LB-Medium (B.2.1) bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transformanten wurden entsprechend der elektrokompenten Zellen und der Selektionsmarker auf das Vorhandensein der Plasmid-DNS untersucht.

B.4. Kultur und Transfektion von eukaryontischen COS-7 Zellen

B.4.1. Verwendete Zelllinie

Für die Expression von Proteinen wurden COS-7 Zellen (ECACC No: 87021302, European Collection of Cell Cultures) verwendet. Dabei handelt es sich um eine von Affennierenzellen abgeleitete Zelllinie, die durch Behandlung der Zellen mit einer Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist. 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.4.3) geeignet.

B.4.2. Zellkultur

COS-7 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA) mit einer Mischung aus 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep, PAA), 10% fötalem Kälberserum (FCS Gold, PAA), 1% nichtessentiellen Aminosäuren (PAA) und 2% 50x HT-Medium (Hypoxanthin und Thymidin, 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 CO₂-Gehalt von 5% (konstanter pH-Wert) inkubiert.

Für die Kultur der Zellen wurde ein frischer Gefrierstock von -196°C (Lagerung in flüssigem Stickstoff) auf Eis aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche (Corning) mit 15 ml Medium ausgesät. Sobald die Kulturflasche konfluent bewachsen war, wurden die Zellen in eine neue Flasche umgesetzt („passagiert“). Dazu wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml 0,25% Trypsin-EDTA in PBS (PAA) versetzt. Nach 30 sec wurde das Trypsin bis auf etwa 500 µl abgesaugt und die Zellen für 3-4 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst und mit 9 ml Medium resuspendiert.

Je nach Verwendungszweck wurde folgendermaßen fortgefahren:

- 1.) Zum Passagieren der Zellen wurden 800 µl der Zellsuspension in eine neue 75 cm² Kulturflasche mit 15 ml frischem Medium überführt.
- 2.) Für die Transfektion und anschließende Ernte der Zellen (B.4.4) wurden 800 µl der Zellsuspension in Kulturpetrischalen (Ø 10 cm, Corning) mit 10 ml frischem Medium ausgesät.
- 3.) Für die Transfektion und anschließende Untersuchung der Proteinexpression und Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie (B.4.5) wurden 200 µl der Zellsuspension in Kulturpetrischalen mit jeweils vier runden Deckgläsern (Ø 20 mm, Merck) und 10 ml frischem Medium ausgesät.
- 4.) Zum Anlegen neuer Gefrierstocks wurden die Zellen in großen Kulturflaschen (175 cm², Corning) mit 40 ml Medium angezogen. Sobald die Flaschen konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und anschließend mit 7 ml 0,25% Trypsin-EDTA versetzt. Nach 30 sec wurde das Trypsin bis auf etwa 0,8 ml abgesaugt und die Zellen für 3-4 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst und mit 8 ml Medium resuspendiert. Nach der folgenden Zentrifugation (10 min, 180x g, 4°C) wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 3 ml kaltem Gefriermedium resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde sofort bei -80°C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

PBS (Phosphat gepufferte Saline)		Gefriermedium	
NaCl	153 mM	DMEM (PAA)	20 ml
KCl	3 mM	FCS-Gold (PAA)	2 ml
Na ₂ HPO ₄	8 mM	nichtessentielle Aminosäuren (PAA)	0,2 ml
KH ₂ PO ₄	2 mM	DMSO (Roth)	2,2 ml
pH 7,4			

Bis auf das Gefriermedium wurden alle verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt.

B.4.3. Transfektion

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 Zell-

teilungen wieder verloren. Bei Co-Transfektionen werden gleichzeitig mehrere Gene in die Wirtszellen eingeschleust. Zur Expression von IRAG, cGKI und IP₃RI in COS-7 Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kalziumphosphat-Methode nach Chen & Okayama (1987) und das PolyFect Transfektions-Reagenz von Qiagen verwendet.

Kalziumphosphat-Methode:

Bei der Kalziumphosphat-Methode kommt es zur Bildung von Kalziumphosphat-DNS-Präzipitaten, die sich an der Zelloberfläche anlagern und durch Endozytose aufgenommen werden. Pro Kulturschale wurden dazu insgesamt 10 µg Plasmid-DNS in 210 µl H₂O_{bidest.} verdünnt und tropfenweise mit 30 µl CaCl₂ (2 M) versetzt. Dieses DNS-CaCl₂-Gemisch wurde tropfenweise in 240 µl 2x HBS pipettiert und dabei gut geschüttelt. Nach 30 min Inkubation bei RT (nach 15 min kurz vortexen) wurde das Präzipitat zu den Zellen ins Medium gegeben. Für die Proteinexpression erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für 2-3 Tage, wobei nach 24 h 2x mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 10 ml frisches Medium zugegeben wurde.

2x HBS (Hepes gepufferte Saline)

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
Glucose	12 mM
Hepes	50 mM
pH	7,05

PolyFect Transfektions-Reagenz (Qiagen):

Das Transfektions-Reagenz enthält kugelförmige Moleküle, die aus verzweigt angeordneten Monomeren (Dendrimeren) bestehen. Durch Interaktion der positiv geladenen Aminosäuren am Ende der verzweigten Ketten mit negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS kommt es zur Ausbildung von kompakten Strukturen, durch die der Transport der DNS in den Zellkern ermöglicht wird. Für die Transfektion wurden die Zellen 1x mit 10 ml PBS gewaschen und mit 9 ml frischem Medium versetzt. Pro Kulturschale wurden etwa 5 µg Plasmid-DNS in 375 µl DMEM (ohne Zusätze) verdünnt und mit 31 µl des PolyFect Reagenz gut gemischt. Nach Inkubation für 5-10 min bei RT wurde 1 ml DMEM mit allen Zusätzen zugegeben und

der Gesamtansatz ins Zellmedium pipettiert. Für die Proteinexpression wurden die Zellen weitere 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für beide Transfektionsmethoden wurde eine Plasmid-DNS mit IRAG (3 µg), cGKIβ (2 µg) und/oder IP₃RI (3 µg) eingesetzt (vgl. Tabelle B-2), welche jeweils mittels Maxiprep isoliert wurde (B.3.1). Bei der Kalziumphosphat-Methode wurde mit pBluescript II KS+ ad 10 µg DNS aufgefüllt.

B.4.4. Ernten der Zellen

Zwei bis drei Tage nach der Transfektion und Expression der Proteine wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde 2x mit je 10 ml PBS gewaschen, pro Schale je 2,5 ml 4°C kalte PBS mit Proteaseinhibitoren (PI) zugegeben und die Zellen vom Kulturschalenboden abgeschabt. Nach Zentrifugation (10 min, 700x g, 4°C) und einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in hypotonem 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) + 2 mM EDTA + PI lysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Durch Scheren mit einer G22-Kanüle (Becton Dickinson) wurden die Zellen homogenisiert. Das aufgeschlossene Zelllysate wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Proteaseinhibitoren (PI)

Benzamidin (Sigma):	1 M in H ₂ O _{bidest.} ;	Endkonzentration:	1 mM
Leupeptin (Gerbu):	2 mg/ml in 100% EtOH;	Endkonzentration:	0,2 µg/ml
PMSF (Roche):	200 mM in 100% EtOH;	Endkonzentration:	300 µM

B.4.5. Analyse der Proteinexpression und Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie

Zwei bis drei Tage nach erfolgter Transfektion und Expression der Proteine wurden die Zellen 2x mit je 10 ml Tyrode-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die mit adhärenen Zellen bewachsenen Deckgläser (B.4.2) in dafür vorgesehene Messkammern eingespannt und erneut mit Tyrode-Puffer versetzt. Die Analyse der Proteinexpression und Lokalisation erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop (LSM510) von Zeiss. Dabei wurden die Zellen von einem Krypton-Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die optischen Einzelschnitte mit einem 40er Objektiv (Ölimmersion) und verschiedenen Zoomfaktoren aufgenommen.

Tyrode-Puffer

NaCl	140 mM
Hepes	5 mM
Glucose	10 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	2 mM
pH 7,4	

B.5. Isolierung humaner Thrombozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Thrombozyten aus Blut von freiwilligen Spendern isoliert, um die Lokalisation und die *in vivo* Phosphorylierung von IRAG zu untersuchen.

Dazu wurden 1,5 ml Citratpuffer in einer 10 ml Spritze (Becton Dickinson) vorgelegt und auf 10 ml mit Blut (durch Flügelkanüle abgenommen, Becton Dickinson) aufgefüllt. Die Zugabe des Citratpuffers sollte durch Kalziumkomplexierung sowohl die Aggregation der Thrombozyten als auch die Blutgerinnung verhindern. Nach erfolgter Zentrifugation für 20 min bei RT und 300x g wurde das plättchenreiche Plasma im Überstand erneut zentrifugiert (10 min, RT, 300x g). Zum Pelletieren der Plättchen wurde der Überstand für 15 min bei RT und 1500x g zentrifugiert. Dann wurden die Thrombozyten mit Hepespuffer resuspendiert, einmal mit dem gleichen Puffer gewaschen (15 min, RT, 1500x g) und anschließend zur Regeneration für etwa 1 h bei 37°C inkubiert. Die in der Thrombozytensuspension vorliegende Proteinmenge wurde nach Bradford (B.6.1) bestimmt.

Hepespuffer

Hepes, pH 7,4	10 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Glucose	5,5 mM
EDTA	1 mM

Citratpuffer

Trinatriumcitratdihydrat	85 mM
Citronensäure	70 mM
Glucose	110 mM

Beide Puffer wurden vor Gebrauch filtriert (Porengröße 0,2 µm, Renner GMBH) und bei RT aufbewahrt.

B.6. Allgemeine Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen

B.6.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) werden die in saurer Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffes Coomassie Blau (braune Leukoform) 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 Eichgerade die Proteinkonzentration einer Probe ermitteln.

Zur Messung wurden 100 µl Proteinlösung (sollte 3-7 µg Protein enthalten), Standard-Lösung (1-10 µg BSA/100 µl H₂O_{bidest.}) oder Puffer (Referenz) mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption in einem UV-Vis-Spektrometer (Analytik Jena) bei 595 nm bestimmt.

Bradford-Reagenz:

Zur Herstellung der Bradford-Lösung wurden 200 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) in 100 ml EtOH gelöst. Anschließend wurde mit H₂O_{bidest.} ad 1,8 l aufgefüllt und 200 ml 85%ige Phosphorsäure zugegeben. Diese Lösung wurde über Nacht gerührt und dann so lange filtriert, bis die Extinktion bei 595 nm 0,35-0,4 betrug.

B.6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und charakterisiert werden (Laemmli, 1970). Durch Änderung des Vernetzungsgrades von Acrylamid (AA) mit Bis-Acrylamid (BA) lassen sich die Trenneigenschaften der Gele variieren. Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießvorrichtungen der Firma Bio-Rad (Mini Protean I und II Cell) verwendet. Dazu wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unter den oberen Rand der Apparatur 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 erst bei 100 V und später bei 150 V vertikal in 1x SDS-Laufpuffer

aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurden jeweils 8 µl eines vorgefärbten Proteinstandards (175 kDa - 6 kDa, Broad Range, NEB) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie gefärbt (B.6.3) oder auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert (B.6.4).

10x SDS-Laufpuffer

Tris-HCl, pH 8,3	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

4x Laemmli-Puffer

Tris-HCl, pH 6,8	240 mM
DTT (Gerbu)	200 mM
SDS	8% (w/v)
Glyzerin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0,004% (w/v)

11,5% Trenngel

1,8 M Tris-HCl, pH 8,8	1,8 ml
10% SDS	83,5 µl
30% AA/0,2 % BA	3,25 ml
10% APS (Serva)	100 µl
TEMED (Roth)	10 µl
H ₂ O _{bidest.}	3,25 ml

5% Sammelgel

0,6 M Tris-HCl, pH 6,8	0,5 ml
10% SDS	50 µl
30% AA (29:1 BA, Serva)	830 µl
10% APS (Serva)	50 µl
TEMED (Roth)	10 µl
H ₂ O _{bidest.}	3,6 ml

Die 30% AA/0,2% BA-Lösung wurde aus einer 40%igen Acrylamid-Lösung (Fluka) und N,N'-Methylenbisacrylamid (Fluka) hergestellt.

B.6.3. Coomassie-Färbung

Zur Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie Blau wurden die Gele 20 min bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend ca. 1-2 h durch häufiges Wechseln der Entfärbelösung entfärbt.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Blue R 250 (Sigma)	1,5 g
Methanol	455 ml
Essigsäure	90 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1l

Entfärbelösung

Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1l

B.6.4. Westernblot

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P, Millipore) transferiert. Durch Bindung spezifischer primärer und Enzym-gekoppelter sekundärer Antikörper konnten die Proteine anschließend identifiziert und charakterisiert werden (Immundetektion).

Für den Proteintransfer nach dem Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) wurden Filterpapiere (GB001, Schleicher & Schüll) und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, mit den entsprechenden Puffern getränkt und in folgender Reihenfolge (von unten nach oben) luftblasenfrei zwischen zwei Graphitplatten (Amersham) aufgebaut:

- 6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 1
- 4 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 2
- PVDF-Membran mit Methanol befeuchtet und Anodenpuffer2
- SDS-Polyacrylamidgel
- 6 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

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

Anodenpuffer 1

Tris-HCl, pH 10,4	300 mM
Methanol	20% (v/v)
	Methanol

Kathodenpuffer

Tris-HCl, pH 7,6	25 mM
ϵ -Aminocaprinsäure (Sigma)	40 mM
	20% (v/v)

Anodenpuffer 2

Tris-HCl, pH 10,4	30 mM
Methanol	20% (v/v)

Für die **Immundetektion** wurden die Membranen mit 5% Magermilchpulver (MP, in 1x TBST) über Nacht bei 4°C oder 1 h bei RT geschwenkt, um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurden die Membranen für 90 min bei RT mit entsprechend verdünnten spezifischen (primären) Antikörpern (in 1x TBST + 3% BSA + 0,05% NaN_3) inkubiert und anschließend wieder 3x gewaschen (2x mit 1% MP, 1x mit TBST). Dann wurde der Blot für 1 h bei RT mit an alkalische Phosphatase oder an

Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörpern (sekundäre Antikörper) inkubiert und erneut gewaschen (2x mit 1% MP, 1x mit TBST).

Die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind mit den Angaben des Herstellers, Spenderorganismus und entsprechender Verdünnung in Tabelle F-3 angegeben.

Um die Meerrettichperoxidase-Reaktion (horseradish peroxidase, HRPO) sichtbar zu machen, wurden die Membranen für 1 min mit dem Luminol-beinhaltenen ECL- (enhanced chemiluminescence) System von Perkin Elmer inkubiert. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert die Peroxidase das Luminol, wobei Chemilumineszenz entsteht. Diese konnte mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert werden, der mit einer Entwicklermaschine von Agfa (Curix 60) entwickelt wurde.

Zur Detektion der alkalischen Phosphatase (AP) wurden die Membranen mit 20 ml AP-Puffer + 80 µl BCIP + 80 µl NBT so lange inkubiert, bis ein blauer Farbkomplex nachzuweisen war. Diese Färbung entsteht, indem 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) durch die alkalische Phosphatase hydrolysiert wird und nach Oxidation mit Nitroblautetrazolium (NBT) einen blauen Indolfarbstoff bildet. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser und TBST gestoppt.

10x TBST

Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween 20 (Serva)	0,05% (v/v)

BCIP-Lösung

25 mg/ml BCIP (Calbiochem) in 50% DMF

AP-Puffer

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

NBT-Lösung

50 mg/ml NBT (Gerbu) in 70% DMF

B.7. Spezielle Methoden zur Charakterisierung von Proteinen

B.7.1. Membranpräparation aus COS-7 Zellen und humanen Thrombozyten

Durch Differenzialzentrifugation kann die sogenannte Mikrosomenfraktion und somit membrangebundene Proteine wie IRAG oder der IP₃-Rezeptor von restlichen Zellbestandteilen und cytosolischen Proteinen abgetrennt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewandt, um die Lokalisation von IRAG in COS-7 Zellen und humanen Thrombozyten zu untersuchen.

Für die Membranpräparation aus COS-7 Zellen wurden ca. 4-5 mg Protein der geernteten Zellen (B.4.4) in 500 µl 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) + 1 mM EDTA + PI (B.4.4) aufgenommen und mit einem 2 ml Teflon Potter homogenisiert. Dann erfolgte die erste Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 500x g. Das Pellet wurde in 100 µl des gleichen Puffers aufgenommen und ein Teil davon (etwa 30 µg äquivalent zum Ausgangsprotein) als Kontrolle für die SDS-PAGE (B.6.2) verwendet. Vom Überstand wurde ebenfalls eine entsprechende Menge zur Kontrolle mit aufgetragen. Der Rest des Überstandes wurde mit 1,5 ml 20 mM MOPS (pH 7,4) + 1 mM EDTA + 8% Sucrose + PI versetzt und einer zweiten (Ultra-) Zentrifugation (35 min, 4°C, 100000x g) unterzogen. Das hierbei gewonnene mikrosomale Pellet wurde in 50 µl MOPS-Puffer aufgenommen, ebenso wie der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Membranpräparation aus humanen Thrombozyten wurde das Pellet des plättchenreichen Plasmas (B.5) mit 10 mM Triethanolamin-HCl (pH 7,4) + 140 mM NaCl resuspendiert, einmal mit dem gleichen Puffer gewaschen und mit 10 mM Triethanolamin-HCl (pH 7,4) + 5 mM EDTA + PI resuspendiert. Durch Gefrierschock in flüssigem Stickstoff wurden die Thrombozyten lysiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 30000x g wurde der Überstand abgenommen, das Pellet einmal mit 10 mM Triethanolamin-HCl (pH 7,4) + 5 mM EDTA + PI gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert. Mehrere Aliquots der Thrombozytenfraktionen (Pellet = Membranen; Überstand = Zytosol) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

B.7.2. Affinitätsreinigung über cGMP-Agarose

Der an die cGMP-Kinase assoziierte Protein-Komplex kann über eine mit cGMP gekoppelte Agarose-Matrix aufgereinigt werden. In dieser Arbeit wurde die 8-AET-cGMP-Agarose der Firma BioLog verwendet, um den trimeren Komplex von IRAG, cGKI und IP₃RI aus COS-7 Zellen oder humanen Thrombozyten zu isolieren.

Zur Affinitätsreinigung der Proteine aus COS-7 Zellen wurde die Agarose zuerst 3x mit Lubrolpuffer + PI (B.4.4) gewaschen und 1:1 mit dem gleichen Puffer versetzt. Pro Ansatz wurden etwa 500 µg der Zelllysateproteine (B.4.4) mit H₂O_{bidest.} ad 50 µl aufgefüllt und mit 200 µl 2% Lubrol-PX + PI solubilisiert (20 min auf Eis, alle 5 min mischen). Nach der Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 11000x g wurde der Überstand zu 15 µl gepackter cGMP-Agarose-Säule gegeben, mit 4-facher Menge Lubrolpuffer + PI versetzt und für 2 h bei 4°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Säule wieder 3x mit Lubrolpuffer + PI gewaschen.

Lubrolpuffer

Tris-HCl, pH 8,0	20 mM
NaCl	80 mM
Lubrol-PX	0,1% (v/v)

2% Lubrol-PX

2% Lubrol-PX (Brij 35, Sigma) in H₂O_{bidest.}
Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

Zur Affinitätsreinigung des Protein-Komplexes aus humanen Thrombozyten wurden 1,5 mg Protein der isolierten Thrombozyten (B.5) mit Lysepuffer + PI + Phosphataseinhibitoren (PhI) lysiert und anschließend für 15 min bei RT und 20000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 20 µl gepackter cGMP-Agarose-Säule gegeben, die vorher 3x mit Lysepuffer + PI + PhI gewaschen wurde. Nach der Inkubation für 2 h bei 4°C wurde die Agarose wieder 3x mit dem gleichen Puffer gewaschen.

Lysepuffer

Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
Natriumdesoxycholat (Merck)	1% (w/v)
Triton X-100 (Roth)	1% (v/v)
EDTA	0,5 mM

Phosphataseinhibitoren (PhI)

Okadainsäure (Calbiochem):	120 μ M in H ₂ O _{bidest.} ;	Endkonzentration:	120 nM
Natriumvanadat (Sigma):	0,2 M in H ₂ O _{bidest.} ;	Endkonzentration:	0,2 mM
Natriumfluorid (Merck):	1 M in H ₂ O _{bidest.} ;	Endkonzentration:	50 mM

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proteine entweder mit einem Phosphorylierungsmix (bestehend aus Phosphorylierungspuffer, 8-pCPT-cGMP/H₂O_{bidest.} und γ^{32} P-ATP-Lösung) versetzt (B.7.4) oder mit 20 μ l 1x Laemmli-Puffer (B.6.2) von der cGMP-Agarose-Säule eluiert.

B.7.3. Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation werden bestimmte Antikörper über ihre Fc-Domäne an eine mit Protein A gekoppelte Sepharosematrix gebunden. Diese Antikörper binden dann spezifisch ihre Antigene. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Aufreinigung von IRAG aus humanen Thrombozyten verwendet.

Dazu wurde die Protein A Sepharose (PAS) von Sigma 3x mit RIPA-puffer (B.7.5) + PI (B.4.4) gewaschen und 1:1 im gleichen Puffer aufgenommen. Pro Fällung wurden je 25 bzw. 15 μ l gepackte PAS mit 300 bzw. 50 μ l spezifischen IRAG Antikörpern (Tabelle F-3) versetzt, ad 500 μ l mit RIPA-puffer aufgefüllt und für 2 h bei 4°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Antikörper-gekoppelte PAS 3x mit RIPA-puffer + PI gewaschen. Pro Ansatz wurden 10 mg bzw. 500 μ g Protein der phosphorylierten und lysierten Thrombozyten (B.7.5) zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der PAS mit RIPA-puffer + PI + PhI (B.7.2) wurden die Proteine mit 20 μ l 1x Laemmli-Puffer von der PAS eluiert, für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE (B.6.2) aufgetrennt.

B.7.4. *In vitro* Phosphorylierung

Die cGMP-Kinase katalysiert nach Aktivierung durch cGMP die Übertragung der endständigen γ -Phosphatgruppe von ATP auf verschiedene Substratproteine. Durch den Einbau von radioaktivem Phosphat können somit cGMP-abhängig phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden. Da die cGMP-Kinase auch nach Aufreinigung über cGMP-Agarose (B.7.2) noch biologisch aktiv ist, können daran assoziierte Proteine direkt an diesem Säulenmaterial phosphoryliert werden.

Zur *in vitro* Phosphorylierung von IRAG, cGKI und IP₃RI wurden in dieser Arbeit entweder 30 µg Protein der COS-7 Zelllysate (B.4.4) oder das Pellet nach Affinitätsreinigung über cGMP-Agarose (B.7.2) von COS-7 Zellen (500 µg) oder humanen Thrombozyten (1,5 mg) mit folgendem Phosphorylierungspuffer versetzt:

Phosphorylierungspuffer		5x Mes	
5x Mes	4 µl	Mes, pH 6,9	250 mM
100 mM DTT (Gerbu)	2 µl	EGTA	2 mM
2% Lubrol-PX (B.7.2)	1 µl	MgAc	5 mM
PI (1:50, B.4.4)	1 µl	NaCl	50 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 16 µl		

Anschließend wurden pro Ansatz 2 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-Lösung (1 mM mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP [Amersham] >1500 cpm/pmol) zugegeben und zusätzlich entweder 2 µl H₂O_{bidest.} oder 2 µl 8-pCPT-cGMP (30 µM, BioLog). Nach der Inkubation für 2 min bei 30°C wurde die Reaktion durch sofortige Zugabe von 7 µl 4x Laemmli-Puffer (B.6.2) gestoppt. Die Proteine wurden für 3 min bei 95°C denaturiert, über SDS-PAGE (B.6.2) aufgetrennt und mittels Westernblot (B.6.4) detektiert. Die Analyse der Phosphorylierungsreaktion bzw. der Nachweis von radioaktivem Phosphat erfolgte durch Autoradiographie (B.7.6).

B.7.5. *In vivo* Phosphorylierung

Neben der *in vitro* Phosphorylierung von Proteinen nach Lyse der jeweiligen Zellen, können Proteine auch in intakten Zellen oder lebenden Organismen (*in vivo*) phosphoryliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde IRAG in humanen Thrombozyten *in vivo* phosphoryliert.

Dabei wurden zur Identifizierung der *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG pro Ansatz 10 mg Protein der isolierten Thrombozyten (B.5) verwendet, mit Hepespuffer + 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) + 2 mM MgCl₂ versetzt und für etwa 1 h bei 37°C vorinkubiert. Für die gesamt *in vivo* Phosphorylierung von IRAG wurden pro Ansatz 500 µg Protein der isolierten Thrombozyten eingesetzt und mit Hepespuffer + ³³P-H₃PO₄ (500 µCi, Amersham) vorinkubiert. Für die Untersuchung der *in vivo* Phosphorylierung von Ser677 wurden pro Ansatz ebenfalls 500 µg Protein verwendet und mit Hepespuffer (pur) vorinkubiert.

Anschließend wurden (im Vergleich zu $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ als Kontrolle) zur Stimulierung der Phosphorylierungsreaktion verschiedene Substanzen zugegeben, die in Tabelle F-4 mit den Angaben des Herstellers, sowie der jeweiligen Arbeitslösung, Endkonzentration und Inkubationszeit angegeben sind.

Die einzelnen Phosphorylierungsreaktionen wurden für 5 min bei 4°C und 2000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,8 ml (bei 10 mg Protein) bzw. 150 µl (bei 500 µg Protein) SDS-Lysispuffer resuspendiert, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend mit 4-facher Menge RIPA-Correction-Puffer + PI (B.4.4) + PhI (B.7.2) gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 20000x g wurde der Überstand zu 25 bzw. 15 µl gepackter mit IRAG Antikörpern-gekoppelten PAS gegeben und IRAG mittels Immunpräzipitation aufgereinigt (B.7.3).

RIPA-Correction-Puffer

Natriumphosphatpuffer, pH 7,2	12,5 mM
Natriumdesoxycholat (Merck)	1,25% (w/v)
Nonidet P-40 (Sigma)	1,25% (v/v)
EDTA	2 mM

SDS-Lysispuffer

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
SDS	0,5% (w/v)
DTT (Gerbu)	1 mM

RIPA-Puffer: 4 Teile RIPA-Correction-Puffer + 1 Teil SDS-Lysispuffer

Für die *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 wurden pro Ansatz 30 µg Protein der isolierten Thrombozyten verwendet, mit Hepesbuffer (pur) vorinkubiert und anschließend mit den in Tabelle F-4 wiedergegebenen Phosphorylierungsreagenzien und entsprechenden Kontrollen versetzt. Die jeweilige Phosphorylierungsreaktion wurde hier durch Zugabe von Laemmli-Puffer (B.6.2) abgestoppt.

Nach erfolgter SDS-PAGE (B.6.2), Autoradiographie (B.7.6) und Westernblot-Analyse (B.6.4) unter Verwendung der phosphospezifischen IRAG Antikörper (B.8) konnte die Phosphorylierungsreaktion untersucht und die phosphorylierten Proteine detektiert werden.

B.7.6. Autoradiographie

Mit Hilfe der Autoradiographie können radioaktiv markierte Substanzen z.B. durch Schwärzung eines Films oder auf einer Phosphoimagerplatte sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die *in vitro* ($\gamma^{32}\text{P}$ -ATP) oder *in vivo* ($\gamma^{33}\text{P}$ -ATP) phosphorylierten Proteine (B.7.4 bzw. B.7.5) zu analysieren.

Dazu wurde nach SDS-PAGE (B.6.2) und Westernblot (B.6.4) die PVDF-Membran getrocknet, an vier Stellen mit radioaktiver Tinte markiert, in Folie eingepackt und über Nacht eine Phosphoimagerplatte (Super Sensitive, Packard) aufgelegt. Mit einem Phosphoimager der Firma Raytest (BAS-1500) wurde die Platte ausgewertet und ein Autoradiogramm (AR) erstellt. Nach erfolgter Immundetektion (B.6.4) wurde der Blot mit dem AR zur Deckung gebracht, wodurch der Einbau von radioaktivem Phosphat in bestimmte Proteine und somit die Phosphorylierung der Proteine sichtbar gemacht werden konnte.

B.7.7. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine analytische Methode, die zur Sequenzierung und Identifizierung von Proteinen und Peptiden verwendet wird. Bei dieser Methode können die Proteine direkt aus gefärbten Polyacrylamidgelen entnommen werden. Nach enzymatischem Verdau werden die entstandenen Peptide ionisiert, im elektrischen Feld beschleunigt und detektiert. Bei der sogenannten Nano-Elektrospray-Ionisations-MS (Nano-ESI-MS) wird die Proteinprobe in einem sauren flüchtigen Lösungsmittel gelöst und über eine Miniatur-Glaskapillare ins elektrische Feld des Massenspektrometers gesprüht. Die somit desolvatisierten und ionisierten Peptide werden dann im Hochvakuum beschleunigt, nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z -Wert) aufgetrennt und schließlich detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die auf Nano-ESI-MS basierende Precursor-Ion-Scan-Technik (Neubauer & Mann, 1999) angewandt, um die *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG zu identifizieren. Dazu wurden die entsprechenden Proteinbanden der Coomassie Blau gefärbten SDS-Gele (B.6.3) ausgeschnitten, gewaschen und reduziert. Die Proteine wurden tryptisch verdaut, aus dem Gel extrahiert und über eine Entsalzungssäule entsalzt. Mit 50% Methanol gefolgt von 50% Methanol/5% Ammoniak wurden die Phospho-/Peptide schrittweise in eine Nano-Elektrospray-Kapillare eluiert und in ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (API III, PE-Sciex) gesprüht. Die Detektion der Phosphopeptide erfolgte durch den sog. „precursor ion scan“ auf PO_3^- (entspricht einem m/z -Wert von -79) im negativen Ionenmodus. Um die Aminosäuresequenz der identifizierten Phosphopeptide im sog. „product ion scan“ zu bestimmen, wurden die Peptide anschließend mit 50% Methanol/5% Ameisensäure eluiert und der Arbeitsmodus auf positiv gewechselt.

Die Vorbereitung der Proteinproben und die massenspektrometrischen Analysen wurden in der Protein & Peptide Group am EMBL in Heidelberg von Thomas Köcher unter der Leitung von Matthias Wilm durchgeführt.

B.8. Herstellung phosphospezifischer IRAG-Antikörper

Zur Herstellung der phosphospezifischen pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper wurden zwei Phosphopeptide synthetisiert. Zum einen das Phosphopeptid CARSMpSLTLGK von der Firma Covalab, welches das Ser664 enthält und den Aminosäuren 659-668 der humanen IRAG-Sequenz (AF081249.1) entspricht. Zum anderen das Phosphopeptid CRRVpSVAV von der Firma Gramsch Laboratories, welches das Ser677 enthält und mit den Aminosäuren 674-680 übereinstimmt. Das zusätzliche N-terminale Cystein bei beiden Peptiden diente der späteren Kopplung an Keyhole limpet hemocyanin (KLH). Beide Peptide wurden vom jeweiligen Hersteller mittels HPLC aufgereinigt, über das aminoternale Cystein mit MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid) an KLH gekoppelt und in Kaninchen injiziert.

Die pSer664-IRAG Antikörper wurden aus den gewonnenen Antiseren von Covalab aufgereinigt und nach Zugabe von 50% Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

Die IgG des pSer667-IRAG Antiserum wurden über eine Hi Trap Protein A Säule (Amersham) isoliert. Dann erfolgte eine weitere spezifische Aufreinigung über eine Peptid- und im Anschluss über eine Phosphopeptidsäule.

Für die Aufreinigung über die Protein A Säule wurden 8 ml Antiserum für 20 min bei 4°C und 20000x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Lipidschicht auf der Oberfläche wurde das Antiserum mit Puffer A auf 20 ml verdünnt und filtriert (Porengröße 0,2 µm, Renner GMBH). Die Protein A Säule (5 ml) wurde mit 10-fachem Säulenvolumen Puffer A equilibriert, mit dem verdünnten Antiserum beladen und mit 10-fachem Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die gebundenen IgG wurden mit Puffer B in Fraktionen eluiert und mit 1 M Tris-HCl (pH 9,5) neutralisiert. Nach der Proteinbestimmung (B.6.1) wurden die IgG-enthaltenden Fraktionen gepoolt und über Nacht gegen PBS (B.4.2) dialysiert.

Puffer A = 100 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 8,5

Puffer B = 100 mM Citrat/NaOH; pH 3,0

Zur Herstellung der Phospho-/Peptidsäule wurden 9 mg Phosphopeptid bzw. 10 mg Peptid (Gramsch Laboratories) in 10% DMF gelöst. Um mögliche Disulfid-Brücken zwischen zwei Phospho-/Peptiden zu lösen, wurden die Peptide über eine Immobilized TCEP Disulfid Reducing Gel-Matrix (Pierce) nach den Angaben des Herstellers reduziert. Über die somit

freien Sulfhydryl-Gruppen der Cysteinreste konnten die Peptide an eine SulfoLink® Coupling Gel-Matrix (Pierce) gekoppelt werden. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten dabei ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Für die Aufreinigung der phosphospezifischen IgG wurden die dialysierten IgG der Protein A Säule zuerst auf die mit Peptid gekoppelte SulfoLink®-Säule geladen. Der Durchfluss (negative Selektion) wurde dann über die mit Phosphopeptid gekoppelte Säule aufgereinigt (positive Selektion). Nach dem Waschen mit 8-fachem Säulenvolumen PBS wurden die hier gebundenen IgG mit 100 mM Glycin (pH 2,7) in Fraktionen eluiert und mit 1 M Tris-HCl (pH 9,5) neutralisiert. Anschließend wurde die Proteinmenge der verschiedenen Fraktionen gemessen (B.6.1) und die IgG-enthaltenden Fraktionen gepoolt. Nach erfolgter Dialyse gegen PBS über Nacht wurden die IgG mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Die Spezifität der gereinigten pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper wurde mit entsprechenden in COS-7 Zellen exprimierten (B.4.3) und *in vitro* phosphorylierten (B.7.4) Serin-Alanin-Mutanten von IRAG untersucht.

C Ergebnisse

C.1. Identifizierung der Transmembrandomäne/n von IRAG

Wie in der Einleitung erwähnt, ergab die Hydropathie-Analyse eine mögliche Transmembrandomäne am Carboxyterminus des IRAG Proteins: TM_C . Außerdem enthält IRAGa eine weitere hydrophobe Sequenz am Aminoterminus, TM_N , bei der es sich möglicherweise auch um ein membrandurchspannendes Segment handeln könnte. Da die genaue Funktion dieser Domänen noch unklar war, stellte ein Ziel dieser Arbeit dar, TM_N und/oder TM_C eindeutig als Transmembrandomäne/n zu identifizieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese beiden Domänen bei der Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP $_3$ RI eine Rolle spielen. Mittels PCR wurden dazu verschiedene Konstrukte von IRAG hergestellt und in COS-7 Zellen exprimiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Lokalisation von IRAG sowie die Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP $_3$ RI überprüft.

C.1.1. Herstellung von IRAGa/IRAGb- TM_C Konstrukten

Zur Herstellung der verschiedenen IRAGa/IRAGb- TM_C Konstrukte, die keine C-terminale Domäne TM_C enthalten und somit entweder nur die N-terminale Domäne TM_N (im Falle von IRAGa) oder keine der beiden Domänen (im Falle von IRAGb) aufweisen, diente die Plasmid-DNA des IRAGa pcDNA3.1 Konstrukts (Tabelle B-2) als Template in der PCR (B.3.6). Die einzelnen Primer (Tabelle F-1) wurden so gewählt, dass entweder IRAGa oder IRAGb amplifiziert wurde, jeweils ohne TM_C (- TM_C) und jeweils mit oder ohne Stop-Codon (vgl. Abb. C-1). Nach erfolgter Aufreinigung (B.3.2) und Subklonierung der PCR-Amplifikate in *E. coli* TOP10 Zellen (B.3.6.2) wurden die Konstrukte *EcoRI/BamHI* geschnitten und in entsprechende Vektoren ligiert (B.3.4). Dabei wurden DNS-Fragmente mit Stop-Codon (Primer AG11 r) in den Vektor pcDNA3.1 und Fragmente ohne Stop-Codon (Primer MA1 r) in den Vektor pEGFP-N3 (Abb. C-1) inseriert. Dieser Vektor beinhaltet das verstärkt grün fluoreszierende Protein (EGFP). Durch Insertion der IRAGa/IRAGb- TM_C Konstrukte konnten IRAG-EGFP Fusionsproteine generiert werden, welche C-terminal zu IRAG das verstärkte GFP aufweisen. Nach Transformation in *E. coli* (B.3.8) wurden die Plasmide vervielfältigt und isoliert (B.3.1). Zur Überprüfung der korrekten Nukleotidsequenzen wurden die Inserts mit entsprechenden Primern (Tabelle F-2) sequenziert (B.3.7).

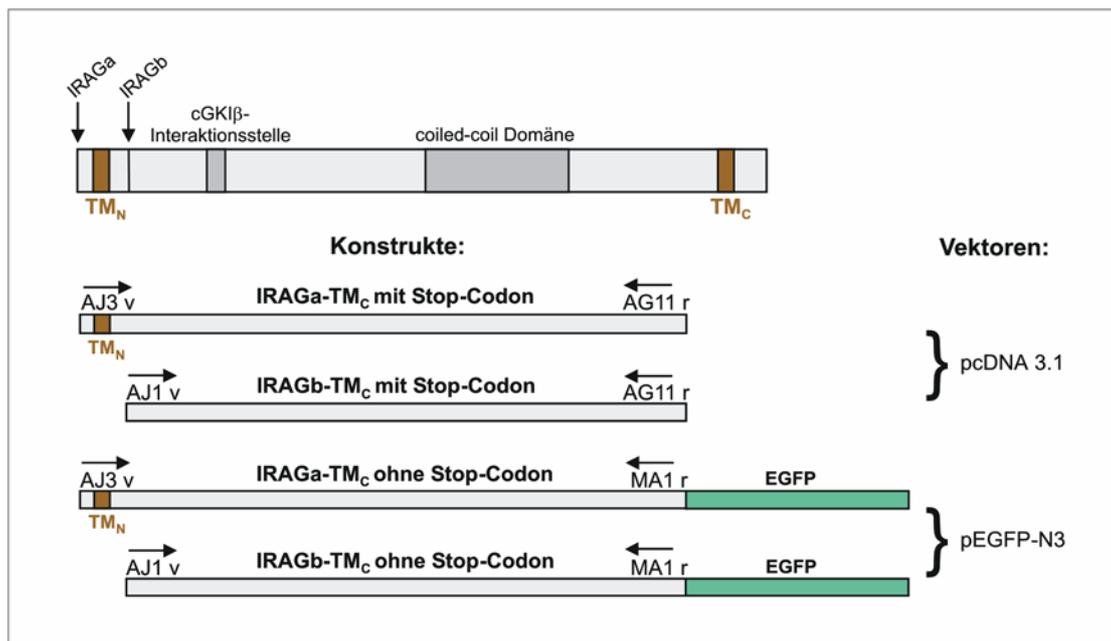


Abbildung C-1: IRAG Konstrukte zur Identifizierung der Transmembrandomäne/n. Gezeigt ist die schematische Struktur von IRAG (oben), sowie die verschiedenen IRAGa/IRAGb-TM_C-Konstrukte, die mittels PCR und entsprechenden Primern (AJ1 v, AJ3 v, AG11 r, MA1 r) amplifiziert wurden. Zusätzlich sind die jeweiligen Klonierungsvektoren angegeben (rechts). TM_N bedeutet N-terminale und TM_C C-terminale Transmembrandomäne. EGFP steht für „enhanced“ grün fluoreszierendes Protein.

C.1.2. Intrazelluläre Lokalisation von IRAGa/IRAGb-TM_C

C.1.2.1. Untersuchung der IRAG-TM_C-EGFP Fusionsproteine

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der IRAGa/IRAGb-TM_C-EGFP Fusionsproteine wurden COS-7 Zellen mit den in C.1.1 hergestellten IRAGa-TM_C und IRAGb-TM_C pEGFP-N3 Konstrukten (vgl. Abb. C-1) transfiziert (B.4.3). Als Kontrolle wurden außerdem Wildtyp (Wt) IRAGa- und IRAGb-EGFP Proteine (Schlossmann et al., 2000) exprimiert, welche die C-terminale Domäne TM_C beinhalten. Mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop (B.4.5) wurden die auf Deckgläschen adhärenen COS-7 Zellen mit einem Krypton-Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und bei einer 40-fachen Vergrößerung untersucht. Anhand der grünfluoreszierenden Fusionsproteine konnte die Expression und Lokalisation der unterschiedlichen IRAG-EGFP Proteine nachgewiesen werden.

Wie in Abb. C-2 gezeigt ist, konnten die Wt IRAGa und IRAGb Fusionsproteine in netzartigen Strukturen angeordnet detektiert werden. Da auch das endoplasmatische Retikulum

(ER) ähnlich strukturiert in Zellen vorliegt, deutet dieser Befund darauf hin, dass IRAG in den Membranen des ER verankert sein könnte. Diese Annahme wird auch durch die von Schlossmann et al. (2000) veröffentlichten Experimente unterstützt, in denen eine perinukleäre Lokalisation von IRAG nach Expression in COS-7 Zellen beobachtet wurde. Für die Verankerung scheint die TM_N keine Rolle zu spielen, da IRAGb, welches nur die TM_C besitzt, ebenso am ER lokalisiert ist wie IRAGa mit der zusätzlichen TM_N (Abb. C-2).

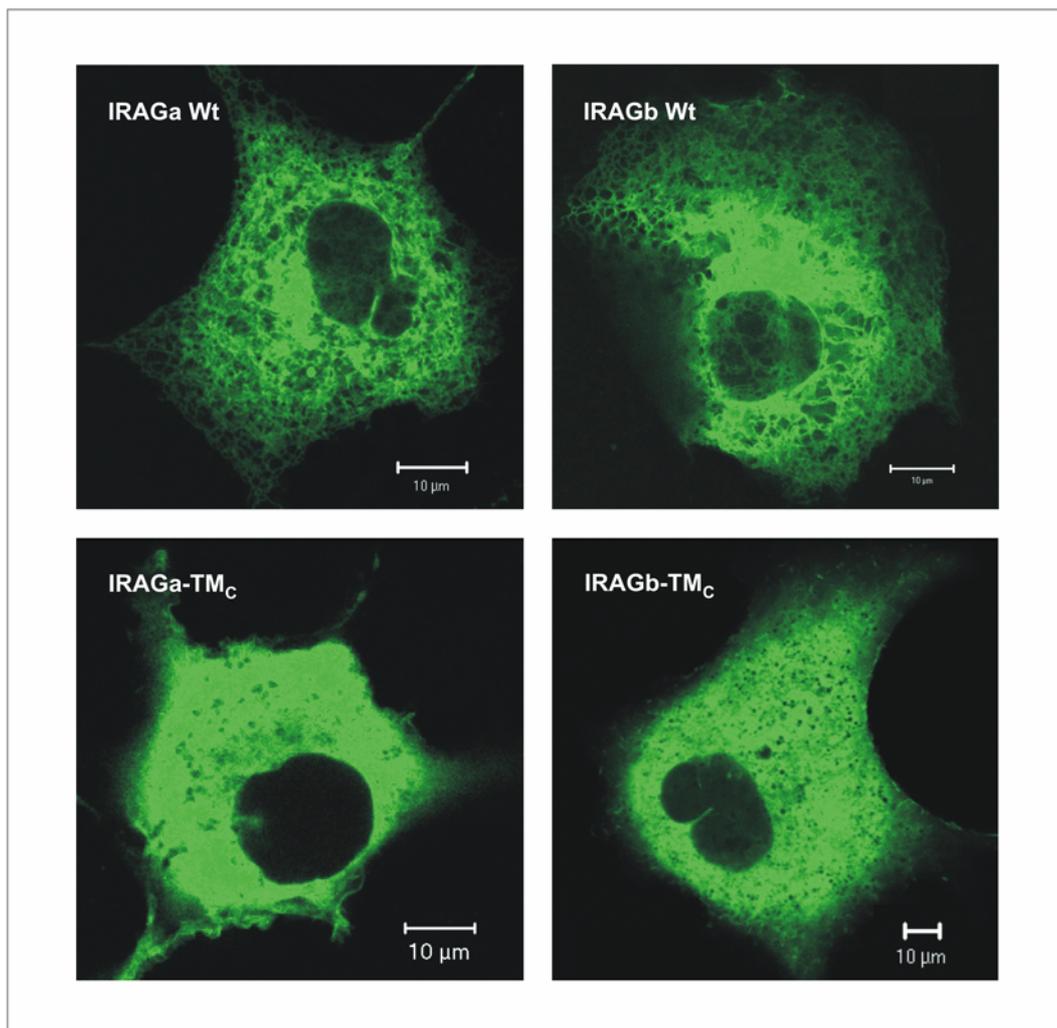


Abbildung C-2: Lokalisation der IRAGa oder IRAGb Wt/ TM_C -EGFP Fusionsproteine in COS-7 Zellen. Die Lokalisation wurde nach Expression der IRAGa oder IRAGb Wt/ TM_C -EGFP Fusionsproteine in COS-7 Zellen mittels konfokaler Laser-Scan Mikroskopie untersucht. (Originalvergrößerung x40).

Im Gegensatz zu den Wt Proteinen konnten IRAGa- TM_C und IRAGb- TM_C gleichmäßig im Zytosol verteilt lokalisiert werden (Abb. C-2). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass IRAG durch die fehlende TM_C offensichtlich nicht mehr an die Membranen des ER gebunden wird,

und dass die TM_C für die Verankerung von IRAG entscheidend ist. Da IRAGa- TM_C trotz der zusätzlichen TM_N ebenso im Zytosol vorliegt wie IRAGb- TM_C , scheint die TM_N für die Lokalisation von IRAG nicht erforderlich zu sein.

C.1.2.2. Untersuchung der IRAG- TM_C pcDNA3.1 Konstrukte

Um die intrazelluläre Lokalisation von IRAGa/IRAGb- TM_C weiterhin zu untersuchen, wurden COS-7 Zellen mit den IRAGa- TM_C und IRAGb- TM_C pcDNA3.1 Konstrukten (vgl. Abb. C-1) und der cGKI β (Tabelle B-1) co-transfiziert. Zusätzlich wurden auch hier die entsprechenden IRAGa und IRAGb Wt Proteine (Schlossmann et al., 2000) mit der cGKI β heterolog exprimiert. Die Anwesenheit aller Proteine wurde durch Westernblot (B.6.4) mit spezifischen Antikörpern überprüft (Abb. C-3).

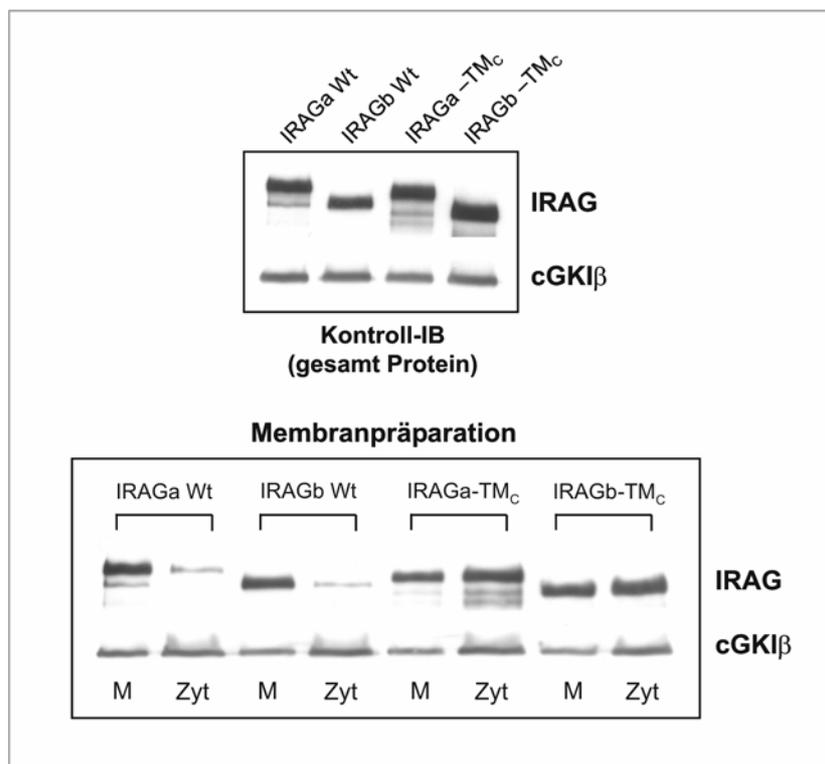


Abbildung C-3: Expression und Lokalisation von IRAGa oder IRAGb Wt/- TM_C und cGKI β in COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden mit IRAGa oder IRAGb Wt/- TM_C pcDNA3.1 Konstrukten und der cGKI β (im Vektor pMT3) co-transfiziert. Als Kontrolle der Proteinexpression wurden je 30 μ g Zelllysateproteine aufgetragen (Kontroll-IB). Zur Lokalisation von IRAG und cGKI β wurden nach erfolgter Membranpräparation je 30 μ g Protein des Membrananteils (M) und der zytosolischen Fraktion (Zyt) aufgetragen. Beide Blots wurden mit IRAG- und cGKI β -spezifischen Antikörpern detektiert.

Anschließend wurden mittels Membranpräparation (B.7.1) zytosolische von membran-gebundenen Proteinen und restlichen Zellbestandteilen abgetrennt. Durch Westernblot-Analyse mit IRAG- und cGKIcommon-spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3) konnte die Lokalisation der verschiedenen IRAG Proteine und der cGKI β nachgewiesen werden.

Wie in Abb. C-3 gezeigt ist, konnten die IRAGa und IRAGb Wt Proteine hauptsächlich im Membrananteil (M) der Zellen detektiert werden. Dies weist erneut auf eine Verankerung von IRAG in der Membran des ER hin und stimmt mit der Lokalisation der Wt IRAG-EGFP Fusionsproteine überein (vgl. C.1.2.1). Da bei einer Membranpräparation membrangebundene Proteine während des mechanischen Aufschlusses der Zellen (pottern) zum Teil aus der Membran herausgelöst werden können, wurde eine geringe Menge an Wt IRAGa und IRAGb auch in der zytosolischen Fraktion (Zyt) nachgewiesen. Für die Verankerung von IRAG im ER scheint auch hier wieder die TM_C alleine auszureichen, da das IRAGb Wt Protein, welches nur diese eine Domäne besitzt, ebenso wie das IRAGa Wt Protein überwiegend im Membrananteil der Zellen lokalisiert ist.

IRAGa-TM_C und IRAGb-TM_C hingegen konnten verstärkt in der zytosolischen Fraktion der Zellen nachgewiesen werden (Abb. C-3). Entsprechend der Untersuchungen der IRAGa/IRAGb-TM_C-EGFP Fusionsproteine scheinen auch hier die IRAG Proteine durch den Verlust der C-terminalen Domäne TM_C nicht mehr in der Membran des ER verankert zu sein. Da zytosolische Proteine auch mit membrangebundenen Proteinen interagieren, können diese nach erfolgter Zentrifugation auch im Membrananteil (Pellet) detektiert werden. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass IRAGa-TM_C und IRAGb-TM_C ebenfalls in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnten. Das gleiche gilt für die lösliche cGKI β , die zum Teil in den Membranen, hauptsächlich aber im Zytosol lokalisiert wurde. Übereinstimmend mit den Resultaten der mittels Laser-Scan Mikroskopie untersuchten Lokalisation der IRAG-EGFP Fusionsproteine (C.1.2.1), scheint auch hier bei den pcDNA3.1 Konstrukten nur die TM_C alleine verantwortlich für die Verankerung von IRAG im ER zu sein. Denn IRAGa-TM_C wurde trotz TM_N zu gleichen Proteinmengen im Zytosol detektiert, wie IRAGb-TM_C.

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei der C-terminalen Domäne TM_C tatsächlich um eine Transmembrandomäne handelt, die IRAG in den intrazellulären Membranen verankert. Die N-terminale Domäne TM_N hingegen stellt trotz hydrophober Sequenz keine funktionelle Transmembrandomäne dar.

C.1.3. Einfluss der Domänen TM_C und TM_N auf die Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP $_3$ RI

IRAG interagiert mit der cGKI β und dem IP $_3$ RI, wodurch ein multimerer Komplex gebildet wird (Schlossmann et al., 2000). Als Interaktionsstelle mit der cGK konnte bereits die Peptidsequenz zwischen Aminosäure 152 und Aminosäure 184 im IRAG Protein identifiziert werden (vgl. Abb. A-3), welche spezifisch mit dem Leucinzipper der cGKI β interagiert (Ammendola et al., 2001). Für den IP $_3$ RI konnten bisher noch keine definierten Interaktionsstellen von IRAG ermittelt werden. Um die Assoziation der drei Proteine weiter aufzuklären, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die beiden N- und C-terminalen Domänen TM_N und TM_C bei der Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP $_3$ RI eine Rolle spielen. Da IRAG und der IP $_3$ RI als Substrate der cGKI β durch diese phosphoryliert werden, sollte außerdem überprüft werden, ob die beiden Domänen bei diesem enzymatischen Prozess beteiligt sind.

Dazu wurden COS-7 Zellen mit den IRAGa/IRAGb Wt/ TM_C pcDNA3.1 Konstrukten (vgl. C.1.1), der cGKI β und dem IP $_3$ RI (Tabelle B-2) co-transfiziert. Nach erfolgter Kontrolle der Proteinexpression mittels Westernblot (siehe Abb. C-4) wurden die Zellen solubilisiert und der trimere Komplex mittels Affinitätschromatographie über cGMP-Agarose isoliert (B.7.2). Durch eine anschließende Inkubation der aufgereinigten Proteine mit dem cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP und mit $\gamma^{32}P$ -ATP wurden die einzelnen Komponenten des Komplexes *in vitro* phosphoryliert (B.7.4). Mittels Westernblot-Analyse (B.6.4) mit IRAG-, cGKIcommon- und IP $_3$ RI-spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3) erfolgte die Detektion der Proteine. Durch Autoradiographie (B.7.6) wurde die Phosphorylierungsreaktion analysiert.

Wie in Abb. C-4 zu sehen ist, konnten nach erfolgter Affinitätsaufreinigung alle IRAG Varianten sowie die cGKI β und der IP $_3$ RI im Immunblot (IB) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Interaktion von IRAG sowohl mit der cGKI β als auch mit dem IP $_3$ RI möglich ist, selbst wenn die C-terminale TM_C und/oder die N-terminale TM_N fehlen. Im Autoradiogramm (AR) ist außerdem in jedem Ansatz eine effiziente Phosphorylierung des jeweiligen IRAG Konstruktes, der cGKI β und des IP $_3$ RI zu sehen, was darauf hinweist, dass die Phosphorylierungsreaktion auch ohne diese beiden Domänen erfolgt. Damit scheinen TM_C und TM_N weder einen Einfluss auf die Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP $_3$ RI zu haben, noch bei der Phosphorylierung des trimeren Komplexes durch die cGKI β beteiligt zu sein.

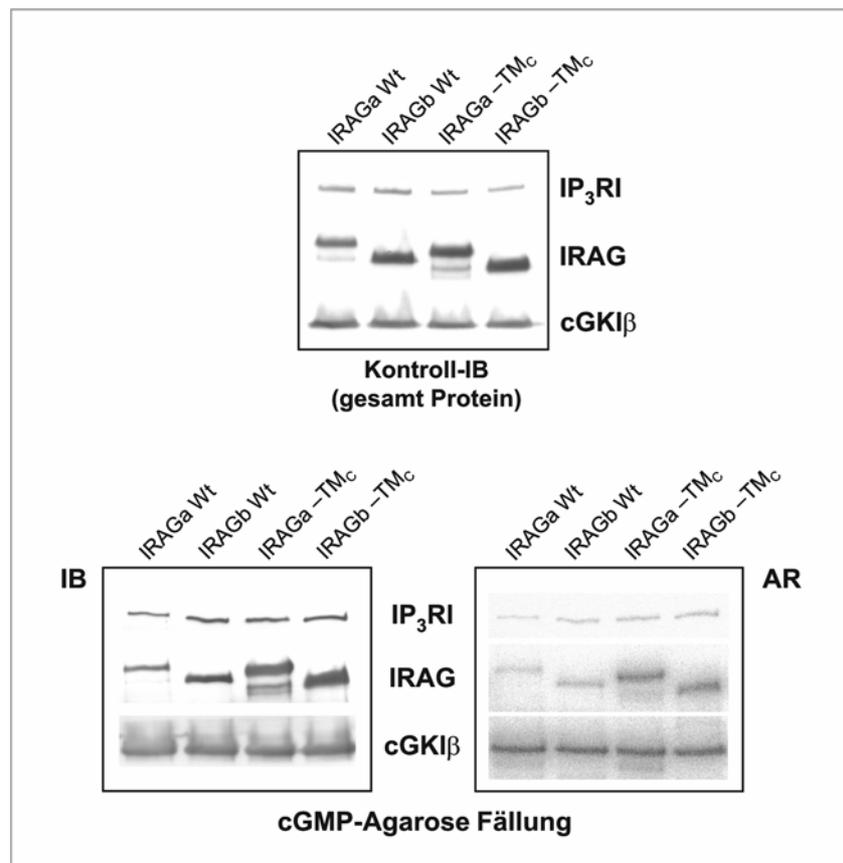


Abbildung C-4: Interaktion von IRAGa oder IRAGb Wt/-TM_C mit cGKIβ und IP₃RI in COS-7 Zellen. Gezeigt ist ein Kontroll-Immunblot (Kontroll-IB) der co-exprimierten Proteine mit je 30 µg Gesamtprotein, sowie ein Immunblot (IB) und ein Autoradiogramm (AR) der mittels cGMP-Agarose aufgereinigten und anschließend *in vitro* phosphorylierten Proteine (je 500 µg). Die Detektion der Proteine erfolgte mit IRAG-, cGKI_{common}- und IP₃RI-spezifischen Antikörpern.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Untersuchungen der verschiedenen IRAGa oder IRAGb Wt/-TM_C pEGFP-N3 bzw. pcDNA3.1 Konstrukte gezeigt werden, dass IRAG über die C-terminale Transmembrandomäne TM_C in den Membranen des ER verankert wird. Die N-terminale Domäne TM_N hingegen dient nicht als Membrananker. Des Weiteren wurde gezeigt, dass keine der beiden Domänen bei der Interaktion von IRAG mit der cGKIβ oder dem IP₃RI eine Rolle spielen und alle Komponenten des trimeren Komplexes auch in Abwesenheit von TM_N und TM_C effizient durch die cGKIβ phosphoryliert werden.

C.2. Identifizierung der *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG

Da bisher fünf verschiedene Serine des IRAG Proteins als *in vitro* Phosphorylierungsstellen identifiziert werden konnten (Schlossmann et al., 2000; vgl. Abb. A-3), war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die exakten *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG aufzuklären. Als „*in vivo* System“ dienten dazu humane Thrombozyten, die aus Blut von freiwilligen Spendern isoliert wurden. Nachdem zunächst die Lokalisation von IRAG in diesen Zellen überprüft wurde, konnte anschließend die *in vivo* Phosphorylierung analysiert und die genauen *in vivo* Phosphorylierungsstellen bestimmt werden.

C.2.1. Intrazelluläre Lokalisation von IRAG in humanen Thrombozyten

Die Expression von IRAG und cGKI β in humanen Thrombozyten wurde bereits von Geiselhöringer (2002) nachgewiesen. Die cGKI α -Isoform hingegen ist dort nicht vorhanden. Da im vorherigen Abschnitt (C.1.2) gezeigt wurde, dass heterolog exprimiertes IRAG in den intrazellulären Membranen von COS-7 Zellen verankert wird, sollte im folgenden die intrazelluläre Lokalisation von endogenem IRAG in humanen Thrombozyten aufgeklärt werden. Ebenso sollte die Lokalisation von cGKI β in Thrombozyten untersucht werden.

Dazu wurde mit humanen Thrombozyten (B.5) eine Membranpräparation (B.7.1) durchgeführt, um zytosolische von membrangebundenen Proteinen abzutrennen. Durch die folgende Westernblot-Analyse (B.6.4) mit IRAG-, cGKI α - und cGKI β -spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3) wurde die Lokalisation der entsprechenden Proteine in den jeweiligen Zellfraktionen überprüft.

Wie in Abbildung C-5 gezeigt ist, konnte IRAG nur in der Membranfraktion (M), jedoch nicht im Zytosol (Zyt) detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass IRAG auch in humanen Thrombozyten in den Membranen verankert vorliegt, ähnlich wie IRAG α und IRAG β Wt nach Expression in COS-7 Zellen (C.1.2). Des Weiteren konnte übereinstimmend mit den Untersuchungen von Geiselhöringer (2002) nur die Expression von cGKI β (Abb. C-5B), nicht aber von cGKI α (Abb. C-5A) nachgewiesen werden. Dabei wurde die β -Isoform im Membrananteil und der zytosolischen Fraktion detektiert, was ebenfalls der Lokalisation von cGKI β in COS-7 Zellen entspricht (vgl. C.1.2.2).

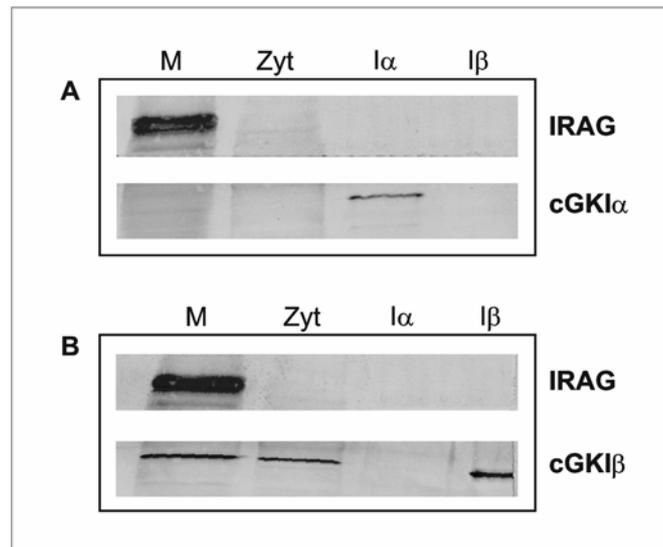


Abbildung C-5: Lokalisation von IRAG und cGKIβ in humanen Thrombozyten. Gezeigt sind zwei Immunblots der mittels Membranpräparation aufgetrennten zytosolischen (Zyt) und membran-gebundenen (M) Proteine aus humanen Thrombozyten. Zur Kontrolle der Immundetektion wurden 10 ng reines Protein der entsprechenden cGKI-Isoform (Iα und Iβ) mit aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit cGKIα- (A), cGKIβ- (B) und IRAG-spezifischen Antikörpern.

Anhand dieser Resultate konnte die Expression von IRAG und cGKIβ in humanen Thrombozyten bestätigt und auf eine Verankerung von IRAG in den Membranen der Blutplättchen geschlossen werden.

C.2.2. Interaktion von IRAG mit cGKIβ und IP₃RI in humanen Thrombozyten

Der trimere Komplex aus IRAG, cGKIβ und IP₃RI konnte bisher aus glattmuskulärem Gewebe der Rindertrachea (Schlossmann et al., 2000) und aus COS-7 Zellen (diese Arbeit und Geiselhöringer, 2002) isoliert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass alle drei Komponenten in beiden Zellsystemen cGMP-abhängig *in vitro* phosphoryliert werden (vgl. Abb. C-4). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun auch die Interaktion von IRAG mit der cGKIβ und dem IP₃RI sowie die Phosphorylierung der drei Proteine in humanen Thrombozyten untersucht werden.

Dazu wurde der trimere Proteinkomplex aus humanen Plättchen mittels Affinitätschromatographie über cGMP-Agarose isoliert (B.7.2). Durch Zugabe von 8-pCPT-cGMP und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurden die gefällten Proteine anschließend *in vitro* phosphoryliert. Nach Analyse der

Phosphorylierungsreaktion mittels Autoradiographie (B.7.6) erfolgte die Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3) im Westernblot (B.6.4).

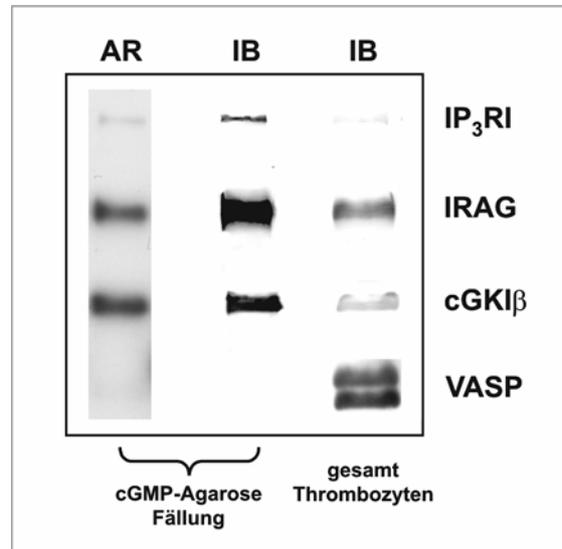


Abbildung C-6: Interaktion von IRAG mit cGKI β und IP₃RI in humanen Thrombozyten. Im linken Autoradiogramm (AR) und mittleren Immunblot (IB) sind die mittels cGMP-Agarose aufgereinigten und anschließend *in vitro* phosphorylierten Proteine aus humanen Thrombozyten (1,5 mg Ausgangsprotein) abgebildet. Der rechte Immunblot (IB) zeigt die Expression von IRAG, cGKI β , IP₃RI und VASP in gesamt Thrombozyten (50 μ g Protein) ohne Aufreinigung. Die Blots wurden mit IRAG-, cGKI β -, IP₃RI- und VASP-spezifischen Antikörpern detektiert.

Der mittlere Immunblot (IB) in Abb. C-6 zeigt die Isolierung des trimeren Komplexes aus IRAG, cGKI β und IP₃RI. Im Autoradiogramm (AR) ist die ³²P-Phosphorylierung der drei Proteine zu sehen. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass IRAG und der IP₃RI auch in humanen Thrombozyten Substrate der cGKI darstellen und von diesem Enzym cGMP-abhängig *in vitro* phosphoryliert werden. Außerdem scheinen alle drei Proteine auch in diesen Zellen als multimerer Proteinkomplex zu interagieren. In gesamt Thrombozyten konnte neben den drei Komponenten die Expression eines weiteren Proteins nachgewiesen werden (Abb. C-6, rechter IB). Dabei handelt es sich um das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), das ebenso wie IRAG stark in Thrombozyten exprimiert wird und dort ebenfalls als ein Substrat der cGKI identifiziert wurde (Smolenski et al., 1998). Da dieses Protein jedoch nicht in dem trimeren Komplex enthalten ist, scheint VASP weder mit IRAG noch mit der cGKI β oder dem IP₃RI stabil zu interagieren.

C.2.3. *In vivo* Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war, die *in vivo* Phosphorylierung von IRAG zu analysieren, und zu überprüfen, ob IRAG auch *in vivo* ein Substrat der cGKI darstellt und durch diese NO/cGMP-abhängig phosphoryliert wird.

Um die gesamt *in vivo* Phosphorylierung von IRAG zu untersuchen, wurden humane Thrombozyten mit ^{33}P -haltigem Hepespuffer (B.7.5) vorinkubiert und anschließend für 1-30 Minuten mit 8-pCPT-cGMP, dem NO-Donor GEA/NO 3162 oder dem cAMP-Analagon Sp-5,6-DCI-cBIMPS (cBIMPS) versetzt (vgl. Tabelle F-4). Mittels Immunpräzipitation (B.7.3) wurden die IRAG Proteine aus den Thrombozyten isoliert und durch Autoradiographie (B.7.6) konnte die ^{33}P -Phosphorylierung nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Phosphorylierungsreaktion wurde zusätzlich die *in vivo* Phosphorylierung von VASP untersucht. Dies erfolgte mit phosphospezifischen pSer239-VASP Antikörpern (Tabelle F-3), welche die cGMP-abhängige Phosphorylierung von Ser239 detektieren (Smolenski et al., 1998). Außerdem wurde der Einsatz von annähernd übereinstimmenden Mengen an IRAG und VASP Protein in jedem Ansatz mit IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern überprüft (Abb. C-7).

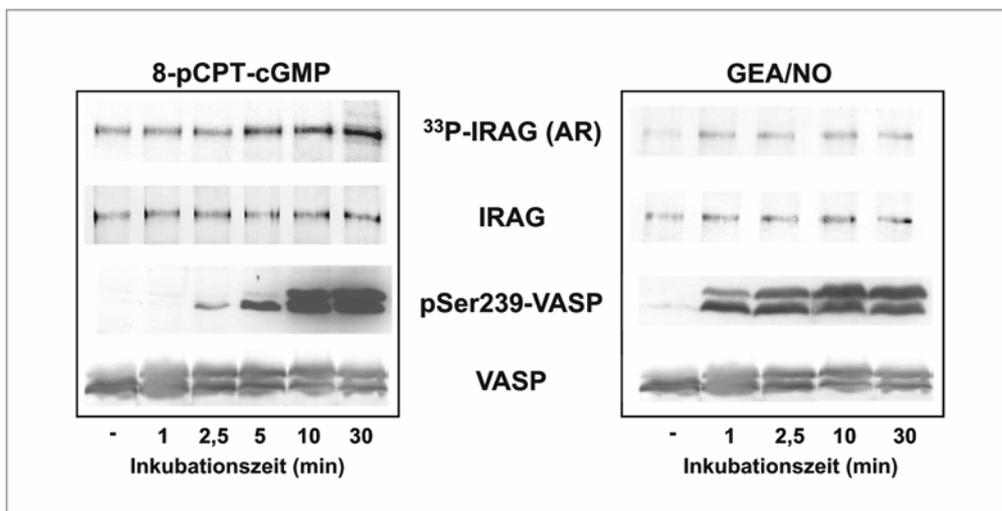


Abbildung C-7: Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten mit cGMP und GEA/NO. Humane Thrombozyten (500 μg Protein pro Ansatz) wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (-) als Kontrolle bzw. mit 8-pCPT-cGMP oder GEA/NO (je 100 μM) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Gezeigt sind zwei Autoradiogramme (AR) der ^{33}P -IRAG-Phosphorylierung, sowie Westernblots der mittels IRAG-, VASP- und pSer239-VASP Antikörpern detektierten Proteine.

Die beiden Autoradiogramme (AR) in Abb. C-7 zeigen einen deutlichen Anstieg der ^{33}P -Phosphorylierung von IRAG innerhalb der 30-minütigen Inkubation mit 8-pCPT-cGMP oder GEA/NO. Dabei konnte nach Stimulation der Thrombozyten mit dem cGMP-Analogen nach 5 Minuten ein etwa 2,5-facher und nach 30 Minuten ein etwa 3,5-facher Anstieg der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) festgestellt werden (vgl. Abb. C-8). Eine ähnliche Phosphorylierungskinetik konnte mit phosphospezifischen pSer239-VASP Antikörpern für das Ser239 des VASP Proteins detektiert werden. Auch hier nahm die Phosphorylierung innerhalb der 30-minütigen Inkubation mit cGMP zu, was an der stärker werdenden Doppelbande zu erkennen ist (Abb. C-7). Diese Doppelbande entsteht, indem das Ser157 des VASP Proteins phosphoryliert wird, wodurch die im SDS-Gel apparente molekulare Masse des Proteins von 46 auf 50 kDa „shiftet“ (Smolenski et al., 1998). Die ^{33}P -Phosphorylierung von IRAG durch Stimulation der Thrombozyten mit GEA/NO hingegen scheint schon nach einer Minute Inkubation das Maximum zu erreichen, wie das rechte AR in Abb. C-7 zeigt. Interessanterweise nahm die Phosphorylierung des Ser239 von VASP hier nach 2,5 und 10 Minuten Inkubation noch zu.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IRAG auch in humanen Thrombozyten ein Substrat der cGKI β darstellt und dort über den NO/cGMP-Signalweg *in vivo* phosphoryliert wird.

Wie in Abbildung C-8 zu sehen ist, konnte die IRAG-Phosphorylierung außerdem nach Inkubation der Thrombozyten mit dem cAMP-Analogen cBIMPS stimuliert werden. Hier konnte nach 5 Minuten ein etwa 2-facher und nach 30 Minuten ein etwa 3,5-facher Anstieg der IRAG-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass IRAG ebenfalls durch die cAMP-Kinase *in vivo* phosphoryliert werden könnte. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die cGMP-Kinase durch Kreuzreaktion mit cAMP (cBIMPS) aktiviert wird und diese daraufhin das IRAG Protein phosphoryliert.

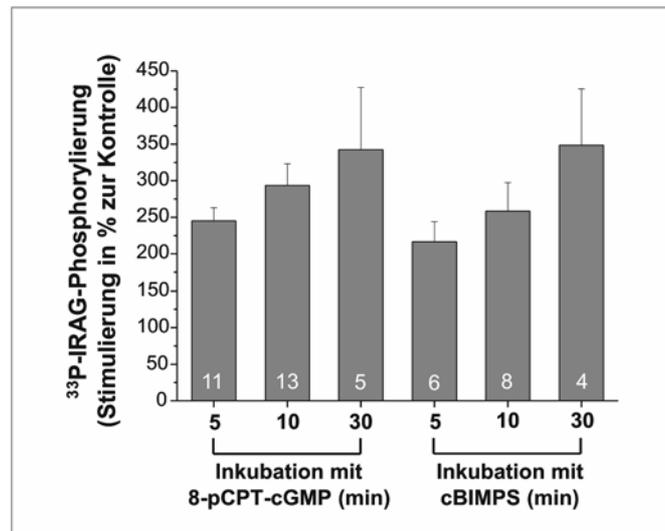


Abbildung C-8: Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten mit cGMP und cBIMPS. Gezeigt ist die statistische Auswertung (mit dem Computerprogramm OriginPro 6.1) der mit 8-pCPT-cGMP und cBIMPS (je 100 μ M) stimulierten 33 P-Phosphorylierung von IRAG im Vergleich zur Kontrolle ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$). Im Diagramm ist die Anzahl der Versuche für die jeweilige Inkubation mit angegeben.

C.2.4. Identifizierung der *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG in humanen Thrombozyten

Schlossmann et al. (2000) isolierten IRAG aus den Membranen des glattmuskulären Gewebes der Rindertrachea und identifizierten fünf Serine dieses Proteins als *in vitro* Phosphorylierungsstellen (vgl. Abb. A-3). Ein Ziel dieser Arbeit war, die *in vivo* phosphorylierten Aminosäuren von IRAG aufzuklären und zu überprüfen, ob diese mit den *in vitro* Phosphorylierungsstellen übereinstimmen.

Dazu wurden humane Thrombozyten mit phosphathaltigem Hepespuffer vorinkubiert (B.7.5) und anschließend für 30 Minuten entweder mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (zur Kontrolle) oder mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP (Tabelle F-4) zur Stimulierung der Phosphorylierungsreaktion versetzt. Die IRAG Proteine wurden dann durch Immunpräzipitation mit IRAG-spezifischen Antikörpern aufgereinigt (B.7.3), mittels SDS-PAGE aufgetrennt (B.6.2) und anschließend Coomassie Blau gefärbt (B.6.3). In Abb. C-9A ist ein Coomassie Gel gezeigt, auf dem die mit (+) und ohne (-) 8-pCPT-cGMP inkubierten IRAG Proteine als deutliche Bande zu erkennen sind. Zur Überprüfung der Phosphorylierungsreaktion diente auch hier der Vergleich mit der VASP-Phosphorylierung an Ser239. Dazu wurden 30 μ g Protein der mit oder ohne cGMP inkubierten Thrombozyten abgenommen, mit Laemmli-Puffer versetzt und über

SDS-PAGE aufgetrennt. Mit phosphospezifischen pSer239-VASP Antikörpern erfolgte dann die Detektion des phosphorylierten Ser239. In Abb. C-9A (Kontroll-IB) ist zu sehen, dass die VASP-Phosphorylierung nur in dem Ansatz mit cGMP (+) detektiert werden konnte. Dies zeigte eine effiziente Stimulierung der cGMP-Kinase. Die den IRAG Proteinen entsprechenden Coomassie gefärbten Gelbanden wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und entsalzt. Mittels Nano-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS) unter Verwendung der Precursor-Ion-Scan-Technik (B.7.7) konnten die Phosphopeptide detektiert werden und nach Analyse der Aminosäuresequenz wurden die exakten *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG bestimmt. Wie in Abb. C-9B gezeigt ist, konnten Ser374, Ser664 und Ser677 des humanen IRAG Proteins als *in vivo* phosphorylierte Aminosäuren identifiziert werden. Diese entsprechen auch genau drei der bereits bekannten *in vitro* Phosphorylierungsstellen von IRAG aus der Rindertrachea (vgl. Tabelle C-1).

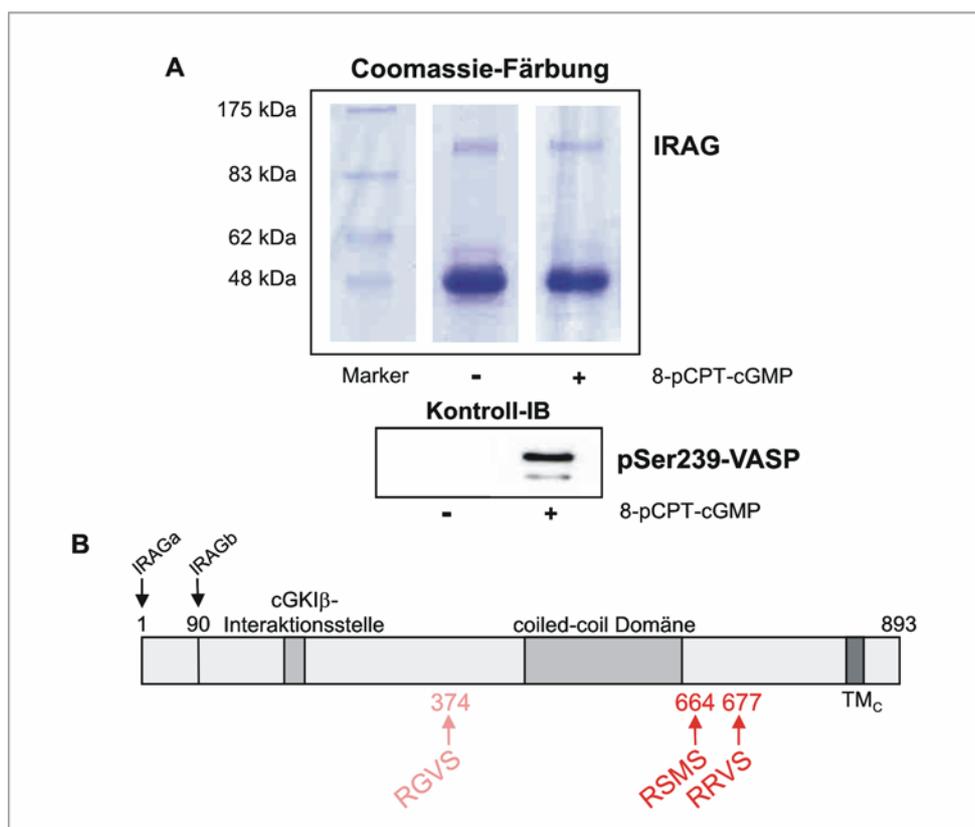


Abbildung C-9: Identifizierung der *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG in humanen Thrombozyten. A) zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel des mittels Immunpräzipitation aufgereinigten IRAG-Proteins aus mit (+) oder ohne (-) 8-pCPT-cGMP (100 μ M, 30 min) inkubierten humanen Thrombozyten (je 10 mg Protein), sowie die Detektion der Phosphorylierungsreaktion mit pSer239-VASP-spezifischen Antikörpern (Kontroll-IB). In B) ist die schematische Struktur des humanen IRAG mit den durch Massenspektrometrie identifizierten *in vivo* Phosphorylierungsstellen (Aminosäureposition und Teil der Konsensussequenz) wiedergegeben.

Tabelle C-1: Vergleich der cGMP-abhängigen *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG. Angegeben sind die mittels Massenspektrometrie identifizierten *in vitro* Phosphorylierungsstellen von IRAG aus glattmuskulärem Gewebe der Rindertrachea (vgl. Abb. A-3), sowie die homologen *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG aus humanen Thrombozyten (vgl. Abb. C-9B). Außerdem ist die Aminosäuresequenz und die Anzahl der detektierten *in vivo* Phosphopeptide nach Inkubation der Thrombozyten mit und ohne 8-pCPT-cGMP (+ cGMP bzw. - cGMP) wiedergegeben. Kein Nachweis von Phosphopeptiden bedeutet „----“ und „fett“ markierte Aminosäuren stimmen mit der Sequenz von IRAG aus Rind überein. „Mox“ steht für oxidiertes Methionin und „Sp“ für phosphoryliertes Serin.

Phosphorylierungsstellen		Phosphopeptide (<i>in vivo</i>)		Aminosäuresequenzen
<i>In vitro</i> (Rind)	<i>In vivo</i> (Mensch)	- cGMP	+ cGMP	(der <i>in vivo</i> Phosphopeptide)
S118	----	----	----	
S393	S374	1	1	GLSpWDSGPEEPGR
S629	----	----	----	
S683	S664	----	2	SMSpLTLGK, SMoxSpLTLGK
S696	S677	1	3	RRVSpVAVVPK, RVSpVAVVPK, VSpVAVVPK

Interessanterweise wurden zwei Phosphopeptide, welche das Ser664 enthalten, nur in dem Ansatz detektiert, der mit cGMP inkubiert wurde (siehe Tabelle C-1). Für Ser677 konnten nach Zugabe von cGMP drei Phosphopeptide identifiziert werden, von denen eines allerdings auch in dem Ansatz ohne cGMP nachgewiesen wurde. Diese Aminosäure weist somit eine geringe Basal-Phosphorylierung auf, die bereits ohne Zugabe von cGMP erkennbar ist. Das Phosphopeptid mit der Aminosäure Ser374 wurde nach Inkubation der Thrombozyten mit und ohne cGMP detektiert (Tabelle C-1), weshalb dieses Serin offensichtlich konstitutiv und cGMP-unabhängig phosphoryliert wird. Damit stellen Ser664 und Ser677 zwei cGMP-abhängige *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG dar.

C.2.5. Untersuchung der Phosphorylierungsstellen in COS-7 Zellen

Nachdem die Aminosäuren Ser664 und Ser677 als cGMP-abhängige *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG identifiziert werden konnten, wurde im folgenden die *in vitro* Phosphorylierung dieser Serine in COS-7 Zellen überprüft.

Dazu wurden verschiedene IRAG Varianten verwendet, deren Serin-kodierende Sequenzen (entsprechend Ser664 bzw. Ser677) mittels PCR in Alanin-kodierende Sequenzen mutiert wurden (Ammendola et al., 2001). Durch diese Mutationen sollte eine Phosphorylierung von IRAG an den jeweiligen Aminosäuren verhindert werden. Da zur Herstellung dieser Serin-Alanin (S/A) Mutanten die Sequenz von IRAG aus Rind als Template diente und die in humanen Thrombozyten identifizierten Phosphorylierungsstellen Ser664 bzw. Ser677 den Aminosäuren Ser683 bzw. Ser696 des bovinen IRAG entsprechen (vgl. Tabelle C-1), wurden die Mutanten der Einfachheit halber nach einer kurzen übereinstimmenden Aminosäuresequenz als IRAG_{RSMS/A} (für die Mutante von Ser664 bzw. Ser683), als IRAG_{RRVS/A} (für die Mutante von Ser677 bzw. Ser696) und als IRAG_{RSMS/A-RRVS/A} (für die Doppelmutante) bezeichnet. Für die Phosphorylierungsanalyse wurde die cGKI β und die verschiedenen IRAG S/A Mutanten in COS-7 Zellen co-exprimiert (vgl. Tabelle B-2). Nach Solubilisierung der Zellen wurden die Proteine mit und ohne 8-pCPT-cGMP inkubiert. Durch gleichzeitige Zugabe von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP konnte anschließend die *in vitro* Phosphorylierung von IRAG mittels Autoradiographie (B.7.6) analysiert werden. Mit IRAG- und cGKI common-spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3) wurden die entsprechenden Proteine detektiert und der Einsatz von annähernd übereinstimmenden Mengen an IRAG Protein in jedem Ansatz überprüft (Abb. C-10).

Wie im Autoradiogramm (AR) in Abb. C-10A zu sehen ist, weist IRAG Wt das stärkste radioaktive Signal und somit die stärkste *in vitro* Phosphorylierung von IRAG auf. Im Vergleich dazu war das Signal der beiden Einzelmutanten, IRAG_{RSMS/A} (entsprechend Ser664) und IRAG_{RRVS/A} (entsprechend Ser677), um etwa 30% verringert (Abb. C-10A und B). Die Phosphorylierung der Doppelmutante entsprach nur noch etwa 50% der gesamten Phosphorylierung von IRAG Wt, was darauf hinweist, dass die Phosphorylierung der beiden einzelnen Serine offensichtlich aufaddiert wird. Interessanterweise konnte bei IRAG Wt und IRAG_{RSMS/A} eine geringe Basal-Phosphorylierung detektiert werden (vgl. Abb. C-10A), die weder bei IRAG_{RRVS/A} noch bei der Doppelmutante zu erkennen ist. Offenbar wird IRAG an Ser696, entsprechend der Aminosäuresequenz von IRAG aus Rind, *in vitro* basal phosphory-

liert. Möglicherweise korreliert diese Phosphorylierung mit der in der MS-Analyse beobachteten basalen *in vivo* Phosphorylierung von Ser677 des humanen IRAG (siehe Tabelle C-1).

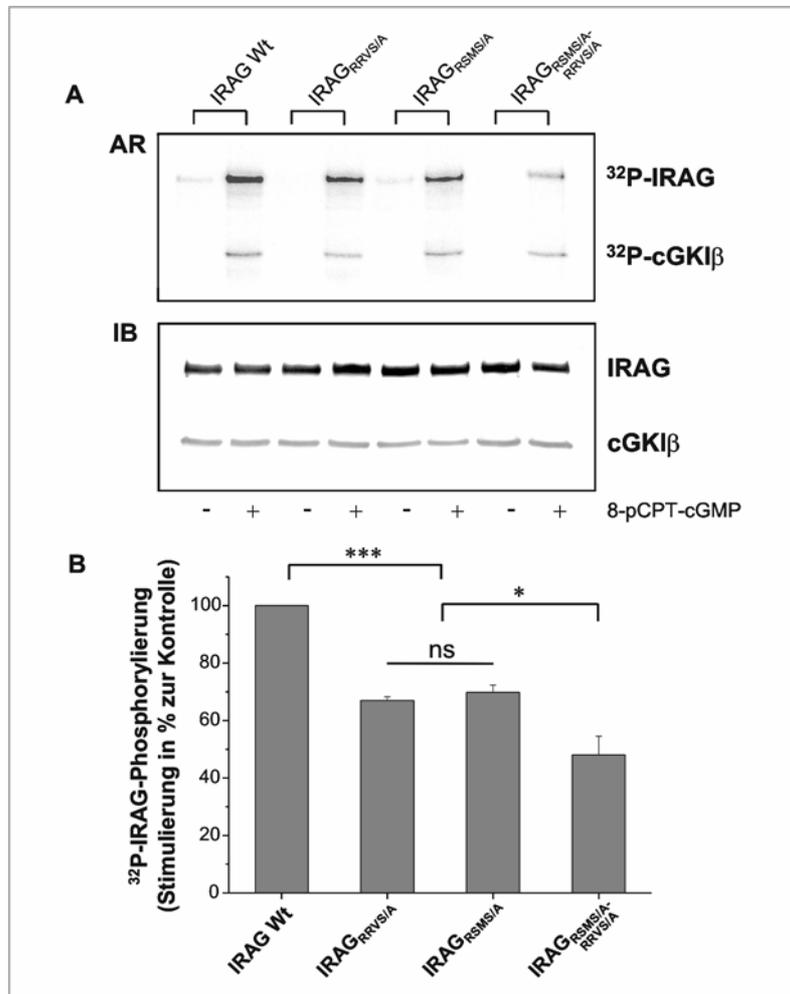


Abbildung C-10: *In vitro* Phosphorylierung von IRAG in COS-7 Zellen. In COS-7 Zellen wurde die cGKIβ und IRAG Wt bzw. verschiedene IRAG S/A Mutanten co-exprimiert. IRAG_{RSMS/A} entspricht der Mutante des humanen Ser664, IRAG_{RRVS/A} der Mutante des humanen Ser677 und IRAG_{RSMS/A-RRVS/A} der Doppelmutante (vgl. Tabelle C-1). Das Autoradiogramm (AR) in A) zeigt die *in vitro* ³²P-Phosphorylierung von IRAG nach Zugabe von 8-pCPT-cGMP (30 μM, 2 min) und γ³²P-ATP. Im Immunblot (IB) sind die mittels IRAG- und cGKI common-spezifischen Antikörpern detektierten Proteine zu sehen. Die statistische Auswertung (OriginPro 6.1) in B) erfolgte im Vergleich zur Phosphorylierung des IRAG Wt Proteins (auf 100% gesetzt). (n=4; *P<0,05; ***P<0,001; ns, nicht signifikant).

C.2.6. *In vivo* Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 in humanen Thrombozyten

Um insbesondere die *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 des IRAG Proteins untersuchen zu können, wurden zwei phosphospezifische Antikörper hergestellt, die spezifisch nur das jeweilige phosphorylierte Serin erkennen sollten. Diese Antikörper wurden entsprechend den Aminosäuren als pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper bezeichnet. Nach Überprüfung der Antikörperspezifität mit in COS-7 Zellen exprimierten und *in vitro* phosphorylierten S/A Mutanten von IRAG wurden humane Thrombozyten mit verschiedenen Substanzen stimuliert und die *in vivo* Phosphorylierung der beiden Serine unter Verwendung der phosphospezifischen Antikörper analysiert.

C.2.6.1. Herstellung und Spezifität der pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper

Die Antiseren pSer664-IRAG bzw. pSer677-IRAG wurden von Covalab bzw. Gramsch Laboratories hergestellt (B.8). Dazu dienten chemisch synthetisierte Phosphopeptide (CARSMpSLTLGK mit Ser664 bzw. CRRVpSVAV mit Ser677) als Antigene, die an KLH (Keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt und in Kaninchen injiziert wurden. Die jeweiligen gewonnenen Antiseren wurden in regelmäßigen Abständen (nach jeder Blutung) mit in COS-7 Zellen exprimierten (B.4.3) und *in vitro* phosphorylierten (B.7.4) IRAG Wt Proteinen auf ihre Spezifität hin untersucht (nicht gezeigt).

Aus der Endblutung wurden die im Antiserum enthaltenen IgG der pSer677-IRAG Antikörper erst über eine Protein A Säule und anschließend über eigens dafür hergestellte Peptid- (negative Selektion) und Phosphopeptidsäulen (positive Selektion) aufgereinigt (B.8). Die pSer664-IRAG Antikörper wurden mit demselben Prinzip von Covalab gereinigt.

Zur Überprüfung der Antikörperspezifität wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurde die cGKI β und IRAG Wt bzw. IRAG_{RSMS/A} (entsprechend Ser664) oder IRAG_{RRVS/A} (entsprechend Ser677) in COS-7 Zellen co-exprimiert. Nach Inkubation der entsprechenden Zellextrakte mit 8-pCPT-cGMP und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurde dann die *in vitro* Phosphorylierung (B.7.4) von IRAG mittels Autoradiographie untersucht (B.7.6). Durch Westernblot-Analyse (B.6.4) unter Verwendung der aufgereinigten pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper konnte schließlich die Phosphorylierung der entsprechenden Aminosäure und somit die Phosphospezifität der Antikörper überprüft werden. Außerdem wurde der Einsatz von etwa

übereinstimmenden Mengen an IRAG Protein in jedem Ansatz mit IRAG-spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3) kontrolliert.

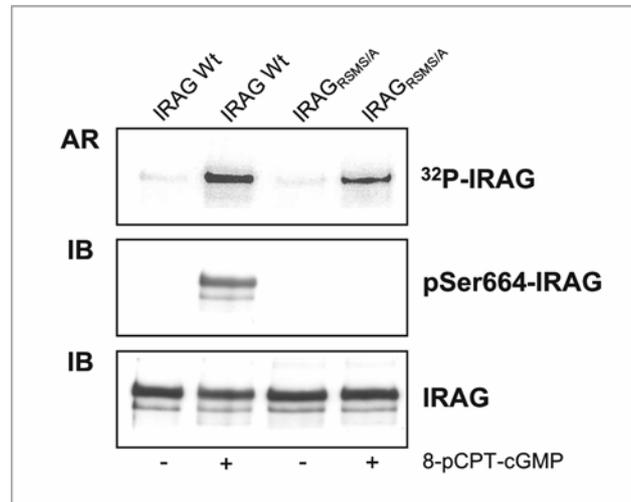


Abb. C-11: Spezifität der pSer664-IRAG Antikörper. In COS-7 Zellen wurde die cGKI β und IRAG Wt bzw. IRAG_{RSMS/A} (entsprechend Ser664) co-exprimiert. Das Autoradiogramm (AR) zeigt die *in vitro* ³²P-Phosphorylierung von IRAG nach Inkubation der Proteine mit (+) oder ohne (-) 8-pCPT-cGMP (30 μ M, 2 min). Im Immunblot ist die Detektion der Phosphorylierung von IRAG an Ser664 mit phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern (IB, Mitte), sowie der Nachweis von gesamt IRAG mit IRAG-spezifischen Antikörpern (IB, unten) abgebildet.

Wie das Autoradiogramm (AR) in Abb. C-11 zeigt, konnte eine deutliche *in vitro* Phosphorylierung von IRAG Wt und IRAG_{RSMS/A} nach Inkubation der Proteine mit 8-pCPT-cGMP (+) detektiert werden. Entsprechend den Untersuchungen im vorherigen Abschnitt (C.2.5) ist auch hier ein verringertes Phosphorylierungssignal der S/A Mutante im Vergleich zum Wt zu erkennen (vgl. Abb. C-10). Ebenfalls konnte die leichte Basal-Phosphorylierung von IRAG ohne Zugabe von 8-pCPT-cGMP (-) beobachtet werden, sowohl beim Wt als auch bei der Mutante. Durch Westernblot-Analyse mit IRAG-spezifischen Antikörpern wurde in jedem Ansatz etwa die gleiche Menge an IRAG Protein nachgewiesen (Abb. C-11, IB, unten). Im Gegensatz dazu erkannten die pSer664-IRAG Antikörper nur das mit cGMP stimulierte und somit phosphorylierte Wt Protein (IB, Mitte). Da die Antikörper nach Inkubation mit cGMP keine Phosphorylierung der IRAG_{RSMS/A} Mutante detektieren konnten, deutet dies darauf hin, dass die pSer664-IRAG Antikörper offensichtlich phosphospezifisch diese (dem pSer664 entsprechende) Phosphorylierungsstelle erkennen.

Abb. C-12 zeigt ein Autoradiogramm (AR) der durch Zugabe von cGMP (+) stimulierten *in vitro* Phosphorylierung von IRAG Wt und IRAG_{RRVS/A} (entsprechend Ser677). Übereinstimmend mit Abb. C-10 war auch hier die Phosphorylierung der Mutante im Vergleich zum Wt verringert. Ebenso konnte die Basal-Phosphorylierung von IRAG nur beim Wt Protein beobachtet werden.

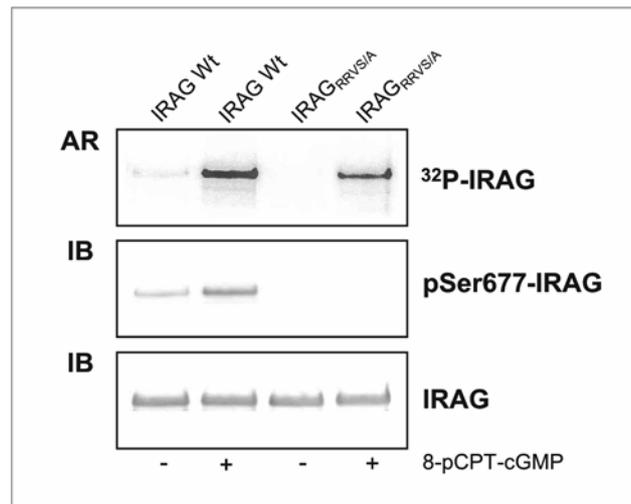


Abb. C-12: Spezifität der pSer677-IRAG Antikörper. In COS-7 Zellen wurde die cGKI β und IRAG Wt bzw. IRAG_{RRVS/A} (entsprechend Ser677) co-exprimiert. Das Autoradiogramm (AR) zeigt die *in vitro* ³²P-Phosphorylierung von IRAG nach Inkubation der Proteine mit (+) oder ohne (-) 8-pCPT-cGMP (30 μ M, 2 min). Im Immunblot ist die Detektion der Phosphorylierung von IRAG an Ser677 mit phosphospezifischen pSer677-IRAG Antikörpern (IB, Mitte), sowie der Nachweis von gesamt IRAG mit IRAG-spezifischen Antikörpern (IB, unten) abgebildet.

Im Gegensatz zu IRAG-spezifischen Antikörpern, welche das IRAG Protein zu annähernd übereinstimmenden Mengen in jedem Versuchsansatz nachweisen konnten (vgl. Abb C-12, IB, unten), detektierten die pSer677-IRAG Antikörper nur die IRAG Wt Proteine (IB, Mitte). Da in dem Ansatz mit cGMP ein deutlich stärkeres Signal zu sehen ist, als in dem Ansatz ohne Zugabe von cGMP und bei der S/A Mutante keine Immunreaktion nachgewiesen werden konnte, scheinen auch diese Antikörper phosphospezifisch zu sein und selektiv diese (dem pSer677 entsprechende) Phosphorylierungsstelle zu erkennen. Das schwache Signal von IRAG Wt in dem Ansatz ohne Zugabe von cGMP (-) deutet darauf hin, dass die pSer677-IRAG Antikörper bereits die geringe basale *in vitro* Phosphorylierung dieser Aminosäure erkennen.

C.2.6.2. *In vivo* Phosphorylierung von Ser677 in humanen Thrombozyten

Nachdem die Spezifität der phosphospezifischen pSer664- und pSer677-IRAG Antikörper überprüft wurde, konnten diese im folgenden zur Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 eingesetzt werden.

Um die *in vivo* Phosphorylierung von Ser677 zu untersuchen, wurden humane Thrombozyten mit Hespuffer vorinkubiert (B.7.5) und anschließend entweder mit 8-pCPT-cGMP, mit einem Inhibitor der cGMP-Kinase (Rp-8-Br-PET-cGMPS) und 8-pCPT-cGMP oder mit cBIMPS versetzt (vgl. Tabelle F-4). Nach Solubilisierung der Thrombozyten erfolgte die Aufreinigung von IRAG mittels Immunpräzipitation (B.7.3). Durch Westernblot-Analyse (B.6.4) wurde die *in vivo* Phosphorylierung von Ser677 mit phosphospezifischen pSer677-IRAG Antikörpern detektiert und mit der Phosphorylierung von VASP an Ser239 verglichen. Der Einsatz von etwa übereinstimmenden Mengen an IRAG und VASP Protein in jedem Ansatz wurde mit IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern überprüft (Tabelle F-3).

Wie in Abb. C-13 gezeigt ist, erkannten die pSer677-IRAG Antikörper eine relativ schwache *in vivo* Phosphorylierung von IRAG in der Kontrolle ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$). Dies könnte der geringen Basal-Phosphorylierung von Ser677 entsprechen, welche bereits in der MS-Analyse detektiert wurde (vgl. C.2.4). Nach Zugabe von 8-pCPT-cGMP oder cBIMPS hingegen konnte eine deutlich stärkere Phosphorylierung von Ser677 nachgewiesen werden (Abb. C-13). Dieses Resultat zeigt, dass IRAG an dieser Aminosäure *in vivo* phosphoryliert wird und zwar nicht nur cGMP-, sondern auch cAMP-abhängig. Übereinstimmend mit den vorherigen Untersuchungen der gesamt *in vivo* ^{33}P -Phosphorylierung (vgl. C.2.3 und Abb. C-8), wird IRAG offenbar nicht nur durch die cGK, sondern auch durch die cAK bzw. durch Kreuzreaktion des cAMP-Analogons mit der cGK *in vivo* phosphoryliert.

Nach Vorinkubation der Thrombozyten mit dem cGK Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS und anschließender Zugabe von 8-pCPT-cGMP konnte eine deutlich schwächere Ser677-Phosphorylierung detektiert werden, als nach der Inkubation mit cGMP alleine (vgl. Abb. C-13). Offensichtlich wird durch Inhibierung der cGK auch die cGMP-abhängige Phosphorylierung von IRAG an Ser677 gehemmt. Dieses Ergebnis bestätigt erneut die Vermutung, dass IRAG in humanen Thrombozyten über die cGK *in vivo* phosphoryliert wird.

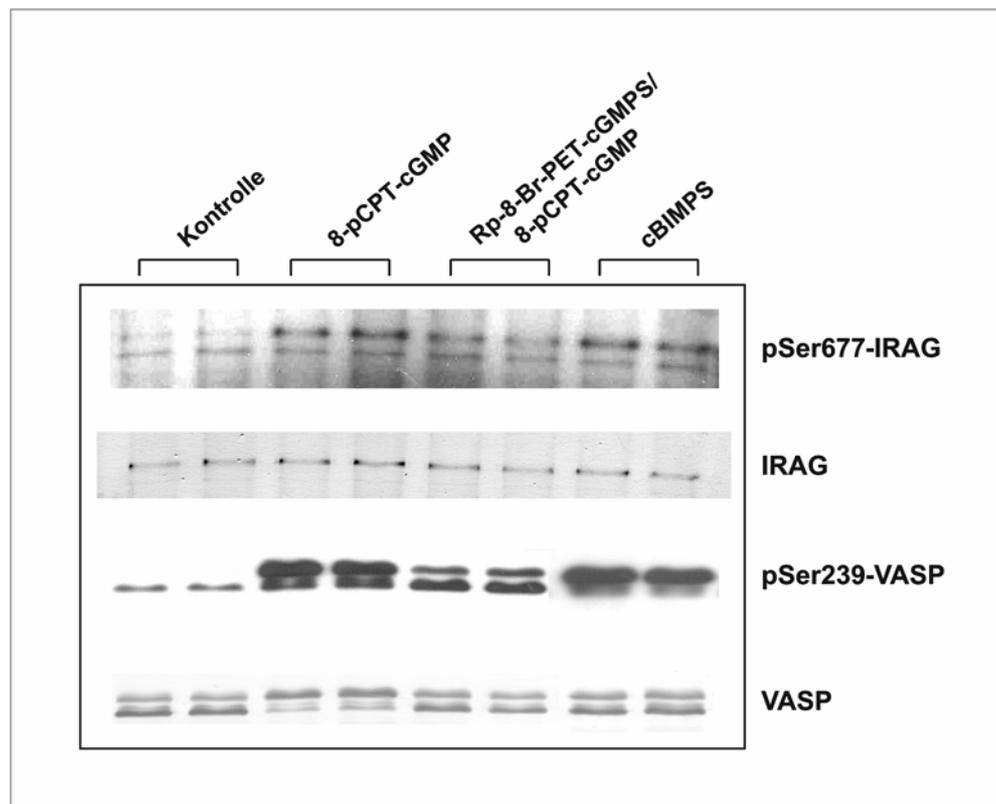


Abb. C-13: *In vivo* Phosphorylierung von Ser677 in humanen Thrombozyten. Humane Thrombozyten wurden für 30 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Kontrolle), 8-pCPT-cGMP oder cBIMPS (je $100 \mu\text{M}$) inkubiert. Außerdem wurde ein Teil der Ansätze für 20 min mit $200 \mu\text{M}$ Rp-8-Br-PET-cGMPS vorinkubiert und anschließend für 30 min mit $100 \mu\text{M}$ 8-pCPT-cGMP versetzt. Der Immunblot zeigt die *in vivo* Phosphorylierung von Ser677, die mit phosphospezifischen pSer677-IRAG Antikörpern detektiert und mit der Phosphorylierung von VASP an Ser239 (pSer239-VASP) verglichen wurde. Des Weiteren ist der Nachweis von gesamt IRAG und VASP mit IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern abgebildet.

Der Vergleich mit der *in vivo* Phosphorylierung von Ser239 des VASP Proteins wies ein ähnliches Phosphorylierungsmuster auf (Abb. C-13): Durch Zugabe von cGMP oder cBIMPS konnte auch hier eine starke Stimulierung der Ser239-Phosphorylierung beobachtet werden, die nach Vorinkubation der Thrombozyten mit dem cGK Inhibitor deutlich verringert war. Ähnlich wie Ser664 des IRAG Proteins scheint auch diese Aminosäure von VASP, entweder durch Kreuzreaktion von cAMP mit der cGMP-Kinase, oder durch Aktivierung der cAK *in vivo* phosphoryliert zu werden. Smolenski et al. (1998) zeigten bereits, dass VASP an Ser239 zwar bevorzugt durch die cGK phosphoryliert wird, jedoch in geringem Maße auch durch die cAK.

C.2.6.3. *In vivo* Phosphorylierung von Ser664 in humanen Thrombozyten

Zur Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 wurden humane Thrombozyten mit 8-pCPT-cGMP oder mit DEA/NO als NO-Donor inkubiert (Tabelle F-4), um die Phosphorylierung von IRAG über den NO/cGMP/cGK-Signalweg zu analysieren. Für die Untersuchung der cAMP/cAK-Signalkaskade wurden die Blutplättchen mit cBIMPS oder Forskolin, einem Aktivator der Adenylylzyklase, versetzt (vgl. Tabelle F-4). Außerdem wurde je nach Löslichkeit dieser Substanzen entweder H₂O_{bidest.}, NaOH oder DMSO als Kontrolle zugegeben (vgl. Abb. C-14). Die jeweilige Phosphorylierungsreaktion wurde mit Laemmli-Puffer (B.6.2) abgestoppt und anschließend durch Westernblot-Analyse (B.6.4) mit phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern nachgewiesen. Zum Vergleich wurde wieder die *in vivo* Phosphorylierung von VASP an Ser239 mit phosphospezifischen pSer239-VASP Antikörpern detektiert. Der Nachweis von annähernd übereinstimmenden Mengen an IRAG und VASP Protein in jedem Ansatz erfolgte ebenfalls wieder mit entsprechenden spezifischen Antikörpern (Tabelle F-3).

Nach Inkubation der Thrombozyten mit 8-pCPT-cGMP wurde mit den phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern eine deutliche Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung an dieser Aminosäure erkannt (Abb. C-14A). In der zugehörigen Kontrolle mit H₂O_{bidest.} (Kontrolle 1) konnte keine Phosphorylierung festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten der MS-Analyse überein, in der ebenfalls nur in dem Ansatz mit cGMP zwei Phosphopeptide detektiert werden konnten, welche das Ser664 enthielten (vgl. Tabelle C-1). Wie in Abb. C-14A außerdem zu sehen ist, konnte auch nach Zugabe von DEA/NO eine Phosphorylierung des Ser664 beobachtet werden, die in der entsprechenden NaOH-Kontrolle (Kontrolle 2) nicht nachgewiesen wurde. Diese Befunde zeigen, dass IRAG an Ser664 in humanen Thrombozyten über den NO/cGMP-Signalweg *in vivo* phosphoryliert wird.

Obwohl in Kontrolle 3 (DMSO) eine sehr geringe Phosphorylierung von Ser664 nachgewiesen wurde, konnte nach Stimulation der Plättchen mit Forskolin ein sehr viel stärkeres Phosphorylierungssignal detektiert werden (Abb. C-14A). Ebenso wurde nach Zugabe von cBIMPS eine relativ starke Phosphorylierung dieser Aminosäure erkannt. Dies deutet darauf hin, dass IRAG an Ser664 ebenfalls cAMP-abhängig *in vivo* phosphoryliert wird, entweder durch Aktivierung der cAMP-Kinase oder durch Kreuzreaktion von cBIMPS mit der cGK

und stimmt mit den vorherigen Untersuchungen der gesamt *in vivo* ^{33}P -Phosphorylierung von IRAG überein (vgl. C.2.3).

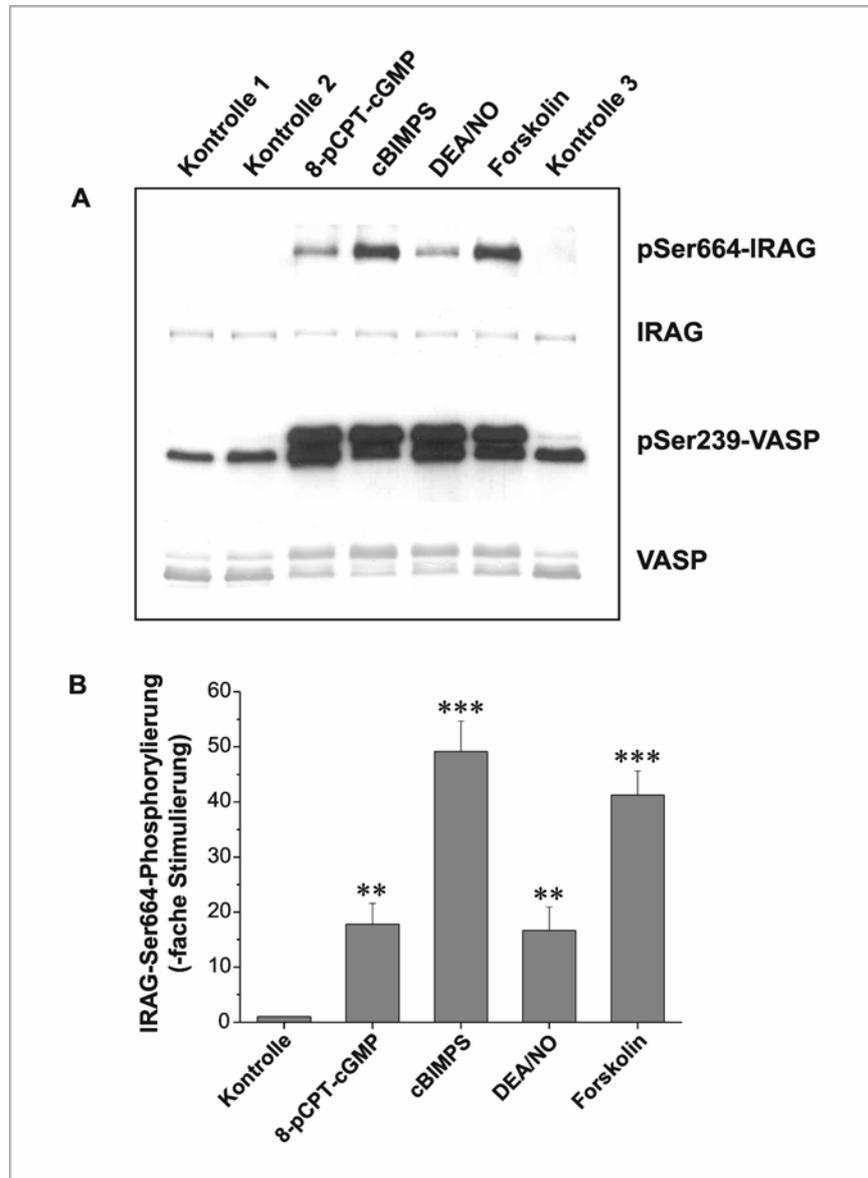


Abb.C-14: *In vivo* Phosphorylierung von Ser664 in humanen Thrombozyten. Humane Thrombozyten wurden mit 8-pCPT-cGMP (100 μM , 30 min), cBIMPS (100 μM , 30 min), DEA/NO (10 μM , 5 min) oder Forskolin (5 μM , 20 min) inkubiert. Als Kontrolle wurde entweder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (Kontrolle 1; 30 min, für cGMP und cBIMPS), 1 mM NaOH (Kontrolle 2; 5 min, für DEA/NO) oder 5% DMSO (Kontrolle 3; 20 min, für Forskolin) zugegeben. Der Immunblot in A) zeigt die *in vivo* Phosphorylierung von Ser664, die mit phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern detektiert und mit der Phosphorylierung von VASP an Ser239 (pSer239-VASP) verglichen wurde. Der Nachweis von gesamt IRAG und VASP Protein erfolgte mit IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern. In B) ist die statistische Auswertung (OriginPro 6.1) der IRAG-Ser664 *in vivo* Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert von Kontrolle 1, 2 und 3) dargestellt. (n=5; **P<0,01; ***P<0,001).

Wie in der Statistik in Abb. C-14B zu erkennen ist, wurde die Phosphorylierung von IRAG an Ser664 im Vergleich zur Kontrolle durch cGMP oder NO fast 20 mal so stark stimuliert und durch cBIMPS oder Forskolin etwa 40-50 mal so stark. Dies könnte bedeuten, dass IRAG an diesem Serin möglicherweise bevorzugt cAMP-abhängig bzw. durch Aktivierung der cAK phosphoryliert wird. Nach Inkubation der Thrombozyten mit cGMP, NO, cBIMPS oder Forskolin detektierten auch die pSer239-VASP Antikörper eine deutliche Stimulierung der Ser239-Phosphorylierung (Abb C-14A), was (im Falle von cGMP und cBIMPS) mit den Resultaten der vorherigen Untersuchungen von der *in vivo* Phosphorylierung des Ser677 übereinstimmt (Abb. C-13).

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Ser664, ebenso wie Ser677, in humanen Thrombozyten *in vivo* phosphoryliert wird, und zwar sowohl NO/cGMP- als auch cAMP-abhängig und nach Aktivierung der Adenylylzyklase. Aufgrund der starken Stimulierung der Ser664-Phosphorylierung durch cBIMPS und Forskolin zeigt diese Aminosäure möglicherweise eine Präferenz für eine *in vivo* Phosphorylierung über die cAMP/cAK-Signalkaskade.

Um die Phosphorylierungskinetiken der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 noch detaillierter aufzuklären, wurden die Thrombozyten im folgenden noch einmal mit denselben Substanzen inkubiert, jeweils für unterschiedlich lange Zeitspannen. Diese Zeitkinetiken sind in Abb. C-15, C-16 und C-17 wiedergegeben.

Abb. C-15 zeigt die Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von IRAG und VASP mit 8-pCPT-cGMP und cBIMPS im Vergleich zur Kontrolle (NaOH).

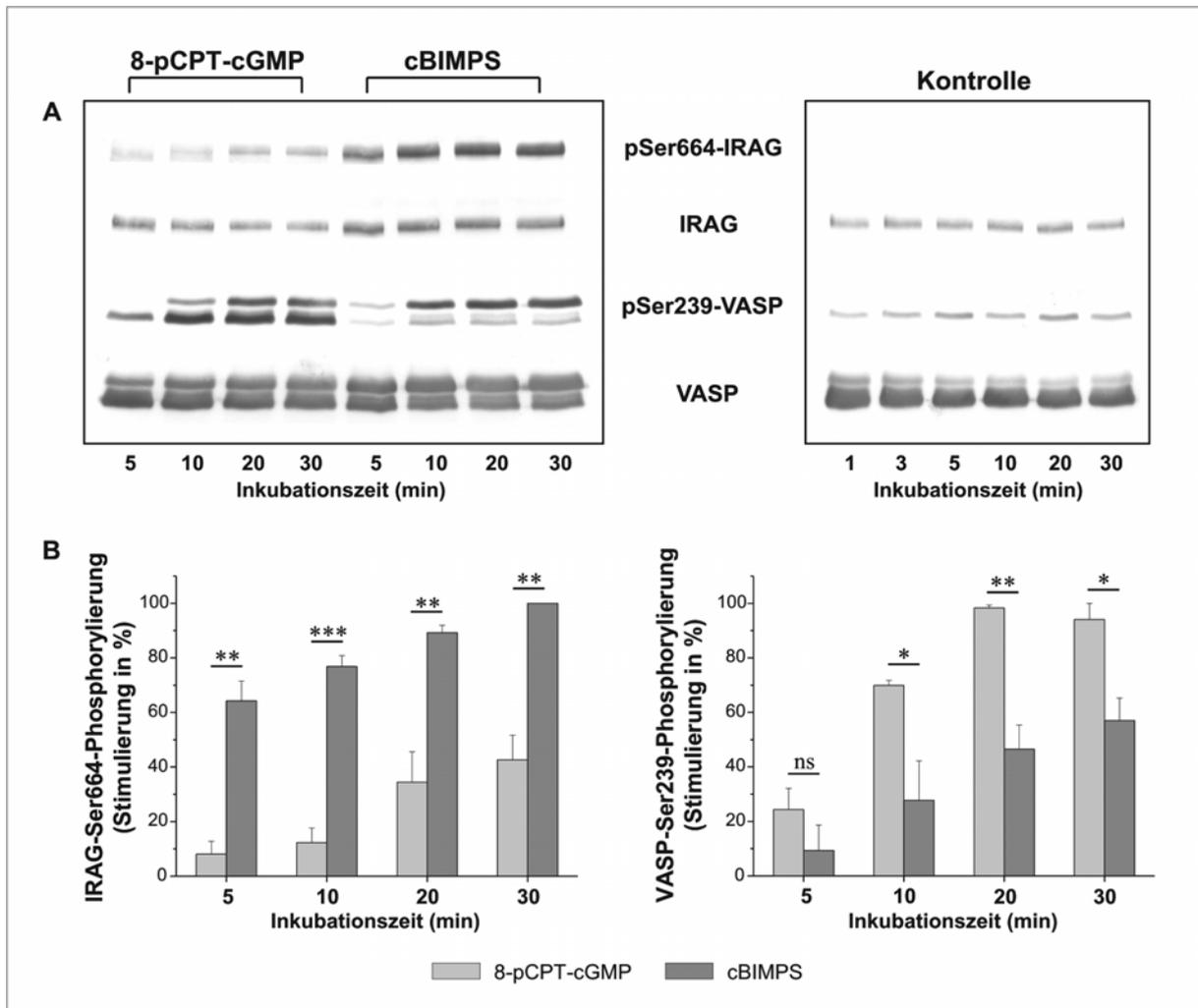


Abb. C-15: Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 mit cGMP und cBIMPS. Humane Thrombozyten wurden mit 8-pCPT-cGMP (100 μ M), cBIMPS (100 μ M) oder NaOH (1 mM; als Kontrolle) für die jeweils angegebenen Zeiten inkubiert. Gezeigt ist ein Immunblot (A) der mit phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern detektierten *in vivo* Phosphorylierung von Ser664, sowie der Vergleich mit der *in vivo* Phosphorylierung von VASP an Ser239 (pSer239-VASP). Mittels IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern erfolgte der Nachweis von gesamt IRAG und VASP Protein. In B) ist die statistische Auswertung (OriginPro 6.1) der IRAG-Ser664- und VASP-Ser239-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Der Maximalwert wurde auf 100% gesetzt. (n=3; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns, nicht signifikant).

Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen (vgl. Abb. C-14), konnten die phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörper auch diesmal in der Kontrolle keine Phosphorylierung von IRAG erkennen. Durch Inkubation der Thrombozyten mit dem cGMP- bzw. cAMP-Analogon jedoch, konnte eine deutliche Stimulierung der Ser664-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dabei wurde nach Zugabe von cBIMPS bei allen vier Inkubationszeiten ein jeweils stärkeres Phosphorylierungssignal detektiert, als nach Zugabe von cGMP. Wie auch in der Statistik (Abb. C-15B) zu erkennen ist, stieg die Phosphorylierung von Ser664 nach Stimulation mit cGMP im Laufe der Inkubation von etwa 8% (nach 5 Minuten) auf annähernd 40% des Maximalwertes (nach 30 Minuten) an, während die Phosphorylierung durch cBIMPS bereits nach 5 Minuten über 60% betrug. Dies bestätigt die Resultate der vorherigen Untersuchungen (Abb. C-14) und weist erneut auf eine mögliche Präferenz dieser Aminosäure für eine Phosphorylierung durch cAMP hin.

Die geringe Phosphorylierung von VASP an Ser239 in der Kontrolle weist auf eine leichte Vorstimulierung der Thrombozyten hin. Dennoch konnte auch an dieser Aminosäure des VASP Proteins nach ansteigenden Inkubationszeiten mit cGMP und cBIMPS eine zunehmende Stimulierung der Phosphorylierung detektiert werden. Im Gegensatz zu Ser664 des IRAG Proteins wurde hier nach Zugabe von cGMP ein stärkeres Phosphorylierungssignal nachgewiesen, als nach Zugabe von cBIMPS (Abb. C-15A und B). Auch in der Statistik ist zu erkennen, dass die Ser239-Phosphorylierung durch Inkubation mit cBIMPS von etwa 10% (nach 5 Minuten) auf knapp 60% der Maximalphosphorylierung (nach 30 Minuten) anstieg, während die Phosphorylierung durch Inkubation mit cGMP bereits nach 10 Minuten schon ca. 70% entsprach. Dies ist ebenfalls mit den vorherigen Untersuchungen (Abb. C-13 und C-14) vergleichbar.

In Abb. C-16 ist die durch Zugabe von DEA/NO stimulierte *in vivo* Phosphorylierung von IRAG und VASP wiedergegeben.

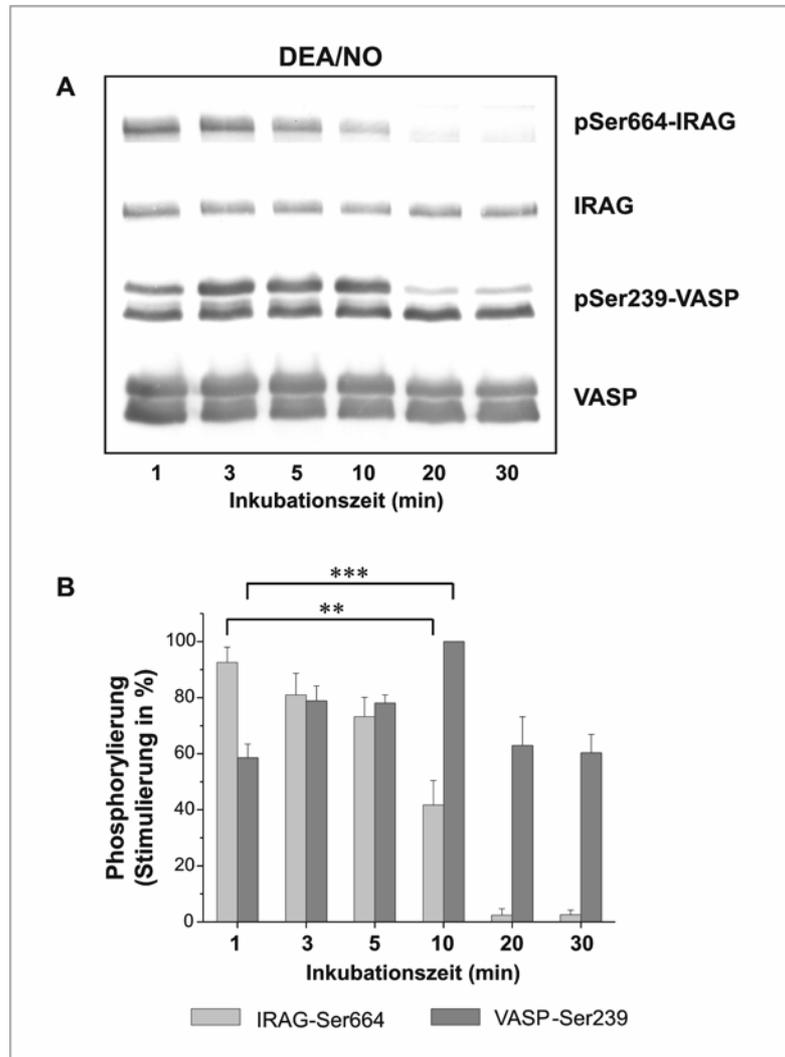


Abb. C-16: Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 mit DEA/NO. Humane Thrombozyten wurden mit 10 μ M DEA/NO für die jeweils angegebenen Zeiten inkubiert. Gezeigt ist ein Immunblot (A) der mit phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern detektierten *in vivo* Phosphorylierung von Ser664, sowie der Vergleich mit der *in vivo* Phosphorylierung von VASP an Ser239 (pSer239-VASP). Mittels IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern erfolgte der Nachweis von gesamt IRAG und VASP. In B) ist die statistische Auswertung (OriginPro 6.1) der IRAG-Ser664- und VASP-Ser239-Phosphorylierung im Vergleich zur NaOH-Kontrolle (vgl. Abb. C-15) dargestellt. Der Maximalwert wurde auf 100% gesetzt. (n=3; **P<0,01; ***P<0,001).

Hier ist zu erkennen, dass die mittels pSer664-IRAG Antikörpern detektierte Phosphorylierung von IRAG nach zunehmenden Inkubationszeiten deutlich schwächer wird. Die Phosphorylierung von Ser239 des VASP Proteins hingegen steigt im Laufe der Inkubation bis zu 10 Minuten zunächst an und nimmt erst nach 20 oder 30 Minuten wieder ab. Wie aus der Statistik in Abb. C-16B ersichtlich ist, fiel die Phosphorylierung des Ser664 von über 90% des Maximalwertes (nach einer Minute Inkubation) auf etwa 40% nach 10 Minuten Inkubation ab. Nach 20 oder 30 Minuten lag das Phosphorylierungssignal sogar unterhalb von 10%. Die phosphospezifischen pSer239-VASP Antikörper hingegen konnten erst nach 10 Minuten Inkubation mit DEA/NO die maximale Phosphorylierung von Ser239 detektieren. Auch bei der Untersuchung der gesamt *in vivo* Phosphorylierung von IRAG nach Stimulation der Thrombozyten mit GEA/NO (vgl. Abb. C-7) konnte bereits ein rascher Anstieg der ³³P-IRAG-Phosphorylierung beobachtet werden, während VASP an Ser239 erst nach 5 bis 10 Minuten Inkubation maximal phosphoryliert wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass IRAG an Ser664 in humanen Thrombozyten durch NO offensichtlich schneller phosphoryliert wird als VASP an Ser239.

Die Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von IRAG und VASP mit Forskolin und der zugehörigen Kontrolle (DMSO) ist in Abb. C-17 wiedergegeben. Entsprechend den vorherigen Untersuchungen der pSer664-Phosphorylierung (Abb. C-14), erkannten die phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörper bereits in der Kontrolle eine geringe Phosphorylierung dieser Aminosäure. Durch Zugabe von Forskolin jedoch konnte zu jeder Inkubationszeit ein deutlich stärkeres Phosphorylierungssignal als in den Kontrollreaktionen detektiert werden. Auch die phosphospezifischen pSer239-VASP Antikörper konnten eine leichte Vorstimulierung der Ser239-Phosphorylierung in der Kontrolle nachweisen, die nach Stimulation der Thrombozyten mit Forskolin wieder eindeutig anstieg. Wie die Statistik in Abb. C-17B zeigt, nahm die *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 innerhalb der ersten Inkubationszeiten von einer auf drei Minuten relativ deutlich zu (auf über 60% der Maximalphosphorylierung) und erhöhte sich in den folgenden Inkubationen bis 30 Minuten nur noch in kleinen Schritten. Ähnlich verhielt es sich bei Ser239, dessen Phosphorylierungssignal nach einer Minute etwa 40% entsprach und nach drei Minuten bereits über 80% betrug.

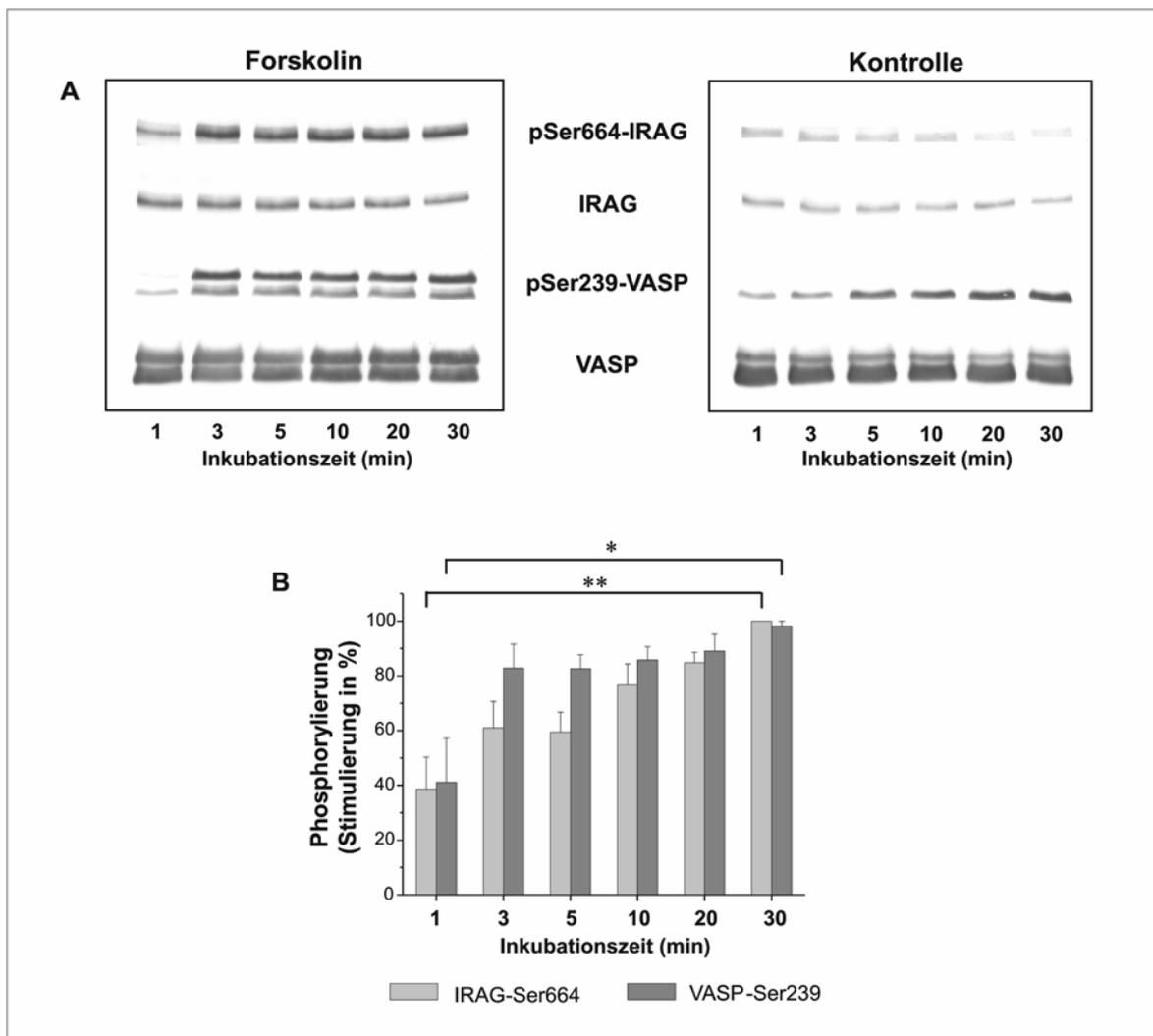


Abb. C-17: Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 mit Forskolin. Humane Thrombozyten wurden mit Forskolin (5 μ M) oder DMSO (5%, als Kontrolle) für die jeweils angegebenen Zeiten inkubiert. Gezeigt ist ein Immunblot der mit phosphospezifischen pSer664-IRAG Antikörpern detektierten *in vivo* Phosphorylierung von Ser664, sowie der Vergleich mit der *in vivo* Phosphorylierung von VASP an Ser239 (pSer239-VASP). Mittels IRAG- und VASP-spezifischen Antikörpern erfolgte der Nachweis von gesamt IRAG und VASP. In B) ist die statistische Auswertung (OriginPro 6.1) der IRAG-Ser664- und VASP-Ser239-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) dargestellt. Der Maximalwert wurde auf 100% gesetzt. (n=3; *P<0,05; **P<0,01).

Diese Ergebnisse der untersuchten Zeitkinetiken zeigen, dass sowohl IRAG an Ser664 als auch VASP an Ser239 durch verschiedene Substanzen unterschiedlich schnell oder stark *in vivo* phosphoryliert werden. Dabei scheint die Ser664-Phosphorylierung stärker cAMP-abhängig bzw. nach Aktivierung der Adenylylzyklase stimuliert zu werden, als durch Zugabe von cGMP. Dies deutet auf eine mögliche Präferenz dieser Aminosäure für eine Phosphorylierung durch die cAK hin. Da Ser664 jedoch auch nach Inkubation mit NO oder

cGMP deutlich phosphoryliert wird, erfolgt die *in vivo* Phosphorylierung von IRAG an diesem Serin offensichtlich auch über den NO/cGMP-Signalweg. Dabei könnte die relativ schnelle Ser664-Phosphorylierung durch NO möglicherweise einen wichtigen Mechanismus bei der Regulation der Thrombozytenaktivität darstellen. Außerdem könnten die unterschiedlichen Phosphorylierungskinetiken des IRAG und VASP Proteins auf unterschiedliche Wirkungsweisen dieser Substrate hinweisen, die entweder über die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade oder über den cAMP/cAK-Weg vermittelt werden.

D Diskussion

D.1. Funktionelle Bedeutung der Domänen TM_C und TM_N

Bereits in früheren Studien wurde die intrazelluläre Lokalisation von IRAG nach Expression von Wildtyp (Wt) IRAGa- und IRAGb-EGFP Fusionsproteinen in COS-7 Zellen untersucht (Schlossmann et al., 2000). Damals konnte die Fluoreszenz der Fusionsproteine perinukleär lokalisiert werden, während EGFP alleine im Nukleus akkumulierte. Da der IP_3RI über C-terminale Transmembrandomänen im endoplasmatischen Retikulum (ER) verankert ist (Berridge, 1993) und IRAG zusammen mit diesem Protein und der cGKI β als trimere Komplex isoliert werden konnte, führten diese Beobachtungen zu der Annahme, dass IRAG ebenfalls an die Membranen des ER gebunden wird. Mittels Hydropathie-Analyse konnte auch eine mögliche Transmembrandomäne am C-Terminus (TM_C) des IRAG Proteins sowie eine weitere hydrophobe Domäne (TM_N) in der zusätzlichen N-terminalen Sequenz von IRAGa ermittelt werden (vgl. Abb. A-3). Um nun die funktionellen Eigenschaften dieser beiden Domänen genauer zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Konstrukte von IRAG hergestellt, die keine TM_C beinhalten und somit entweder nur TM_N oder (im Falle von IRAGb) keine der beiden Domänen aufwiesen (vgl. Abb. C-1). Wie die Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation von IRAGa- TM_C - und IRAGb- TM_C -EGFP Fusionsproteinen ergaben, ist IRAG ohne C-terminale TM_C im Vergleich zum Wt Protein nicht mehr in netzartigen Strukturen angeordnet und auch nicht perinukleär lokalisiert, sondern liegt gleichmäßig im Zytosol verteilt vor. Anhand von IRAGa- TM_C und IRAGb- TM_C pcDNA3.1 Konstrukten konnte des weiteren eine deutliche Verlagerung der IRAG-Lokalisation von den mikrosomalen Membranen in die zytosolische Fraktion der Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass IRAG über die TM_C in den intrazellulären Membranen des ER verankert wird. Damit ist diese Domäne für die Lokalisation von IRAG entscheidend und kann als funktionelle Transmembrandomäne angesehen werden. Da das Vorhandensein der N-terminalen Domäne TM_N für die intrazelluläre Lokalisation von IRAG nicht von Bedeutung ist, stellt diese Domäne trotz hydrophober Sequenz keine Transmembrandomäne dar.

Der trimere Komplex aus IRAG, cGKI β und IP_3RI wurde bisher aus glattmuskulärem Gewebe der Rindertrachea (Schlossmann et al., 2000) und COS-7 Zellen isoliert. Auch die Interaktion von IRAG mit der cGKI β wurde eingehend untersucht und konnte auf einen 33

Aminosäuren umfassenden Abschnitt im N-terminalen Bereich des IRAG Proteins eingegrenzt werden, welcher spezifisch mit der Leucinzipper-Region der cGKI β interagiert (Ammendola et al., 2001). Für den IP₃RI konnten noch keine definierten Interaktionsstellen von IRAG ermittelt werden, jedoch wird vermutet, dass hier die coiled-coil Domäne beteiligt ist. Frühere Studien zeigen, dass der IP₃RI nur gemeinsam mit IRAG und der cGKI β über cGMP-Agarose aus COS-7 Zellen gefällt werden kann, aber nicht mit der cGKI β alleine (Ammendola et al., 2001). Auch in der Zwei-Hybrid Analyse konnte keine Interaktion zwischen IP₃RI und cGKI β detektiert werden. Dies könnte bedeuten, dass IRAG für die stabile Assoziation des trimeren Komplexes notwendig ist. Wie in dieser Arbeit anhand der in COS-7 Zellen exprimierten IRAGa-TM_C und IRAGb-TM_C Proteine gezeigt werden konnte, wird die Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP₃RI weder durch die Transmembrandomäne TM_C noch durch die Domäne TM_N beeinflusst. Ebenso scheint der gesamte 73 Aminosäuren enthaltende C-terminale Abschnitt, welcher bei IRAGa-TM_C und IRAGb-TM_C fehlt, nicht für die Interaktion des trimeren Komplexes erforderlich zu sein. Da außerdem alle drei Komplexproteine auch in Abwesenheit von TM_C und TM_N effizient durch die cGKI β phosphoryliert werden, spielen auch bei diesem Prozess weder TM_N noch TM_C oder der 73 Aminosäuren lange C-terminale Bereich von IRAG eine Rolle.

D.2. IRAG als Substrat der cGKI in humanen Thrombozyten

IRAG wurde erstmals aus der Membranfraktion von glatten Muskelzellen der Rindertrachea isoliert und als ein neues Substrat der cGKI identifiziert (Schlossmann et al., 2000). In folgenden Expressions-Analysen konnten IRAG und die cGKI β -Isoform auch in verschiedenen glattmuskulären Geweben der Maus, wie z.B. Aorta, Magen-Darmtrakt, Uterus, Trachea und Blase nachgewiesen werden (Geiselhöringer, 2002). Außerdem wurde eine starke Expression von IRAG und cGKI β in humanen Thrombozyten beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von IRAG in humanen Thrombozyten genauer überprüft. Dabei konnte IRAG ebenfalls wie in COS-7 Zellen (vgl. D.1) und glatten Muskelzellen in den Membranen detektiert werden. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (Geiselhöringer, 2002) konnte des weiteren nur die cGKI β -, nicht aber die cGKI α -Isoform in den Thrombozyten nachgewiesen werden.

Mittels Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal der trimere Komplex von IRAG, cGKI β und IP₃RI aus humanen Thrombozyten isoliert. Außerdem wurden

alle drei Komponenten durch Zugabe von cGMP *in vitro* phosphoryliert. Damit interagiert IRAG auch in Thrombozyten stabil mit der cGKI β und dem IP₃RI und wird auch in diesen Zellen als Substrat der cGK *in vitro* phosphoryliert. Nach Stimulation der Blutplättchen mit NO oder cGMP konnte des weiteren eine *in vivo* Phosphorylierung des IRAG Proteins festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass IRAG auch *in vivo* ein Substratprotein der cGKI β darstellt und nach Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges *in vivo* phosphoryliert wird. Da die IRAG-Phosphorylierung allerdings auch nach Inkubation mit dem cAMP-Analogen cBIMPS stimuliert wurde, könnte IRAG möglicherweise auch ein Zielprotein der cAK sein. Bereits in den 80er Jahren wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht (MG) von etwa 130 kDa in humanen Thrombozyten beschrieben, welches in den intrazellulären Membranen lokalisiert ist und sowohl cGMP- als auch cAMP-abhängig *in vitro* phosphoryliert wird (Waldmann et al., 1986). Ein Protein mit einem vergleichbaren MG wurde außerdem in den Membranen von glatten Gefäßmuskelzellen als cGMP-Kinase Substrat entdeckt (Casnellie & Greengard, 1974). Nachdem später das cGKI Substratprotein IRAG mit einem MG von etwa 130 kDa aus den Membranen von glatten Muskelzellen der Rindertrachea isoliert wurde (Schlossmann et al., 2000), könnte es sich bei dem 130 kDa Protein der Thrombozyten möglicherweise bereits um IRAG gehandelt haben.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG aufzuklären. Durch Sequenzanalyse von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten IRAG Proteinen, welche aus humanen Thrombozyten aufgereinigt wurden, konnten zwei cGMP-abhängige *in vivo* phosphorylierte Serine identifiziert werden: Ser664 und Ser677. Diese stimmen auch mit zwei bereits bekannten *in vitro* Phosphorylierungsstellen von IRAG aus der Rindertrachea überein (Schlossmann et al., 2000; vgl. Tabelle C-1). Untersuchungen der individuellen Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 mit eigens dafür hergestellten phosphospezifischen Antikörpern zeigten, dass beide Serine nicht nur cGMP-, sondern auch cAMP-abhängig *in vivo* phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von Ser664 konnte außerdem durch NO oder Forskolin, einem Aktivator der Adenylylzyklase, stimuliert werden. Diese Ergebnisse deuten erneut darauf hin, dass IRAG in humanen Thrombozyten sowohl ein Substrat der cGK als auch ein Substrat der cAK darstellt und damit einerseits über den NO/cGMP-Signalweg und andererseits nach Aktivierung der cAMP/cAK-Signalkaskade *in vivo* phosphoryliert wird. Nachdem die Ser664-Phosphorylierung besonders stark nach Zugabe von cBIMPS oder Forskolin stimuliert wurde, könnte das darauf hinweisen, dass dieses Serin bevorzugt durch die cAK phosphoryliert wird. Ein weiteres gut untersuchtes

Zielprotein der cGMP- und cAMP-Kinase in Thrombozyten ist das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein, VASP, welches mit Aktinfilamenten und fokalen Adhäsionen assoziiert ist (Reinhard et al., 2001). Dieses Protein weist drei Phosphorylierungsstellen auf (Ser157, Ser239 und Thr278), die mit unterschiedlicher Spezifität, sowohl durch die cGK, als auch durch die cAK *in vitro* phosphoryliert werden (Smolenski et al., 1998). Dabei zeigt Ser157 eine Präferenz für die cAK, während Ser239 bevorzugt durch die cGK phosphoryliert wird. Auch in intakten Zellen konnte die VASP-Phosphorylierung durch cGMP- bzw. cAMP-erhöhende Substanzen stimuliert werden (Halbrügge et al., 1990). Im Gegensatz zu IRAG scheint VASP allerdings nicht stabil mit der cGK zu interagieren, da dieses Protein nicht gemeinsam mit dem trimeren Komplex isoliert werden konnte. Auch die unterschiedliche Lokalisation von IRAG und VASP, einmal in den Membranen des ER im Falle von IRAG und einmal in der Nähe des Zytoskeletts im Falle von VASP, deutet auf eine unterschiedliche Beteiligung dieser Proteine bei verschiedenen Regulationsmechanismen hin. Ebenso zeigen die in dieser Arbeit untersuchten Zeitkinetiken der IRAG- und VASP-Phosphorylierung, dass diese beiden Proteine unter verschiedenen Phosphorylierungsbedingungen unterschiedlich schnell und stark *in vivo* phosphoryliert werden. Dabei ist besonders die relativ schnelle Phosphorylierung von Ser664 des IRAG Proteins durch NO interessant und könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass IRAG bei der NO-induzierten Hemmung der Thrombozytenaktivität beteiligt ist.

D.3. Physiologische Bedeutung von IRAG in Thrombozyten

Die Regulation der Thrombozytenaktivität stellt einen sehr komplexen Mechanismus dar, bei dem das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Prozessen essentiell für die normale Thrombozytenfunktion ist. Bei einer Störung dieses Gleichgewichtes kann es leicht zur Entstehung von Thrombosen, Arteriosklerose und anderen koronaren Herzerkrankungen kommen. Die Hemmung der Thrombozyten wird hauptsächlich über die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP, sowie deren weitergeleitetes Signal auf verschiedene Zielproteine vermittelt (Schwarz et al., 2001). Dabei kommt es z.B. durch NO oder PGI₂ zur erhöhten cGMP- bzw. cAMP-Synthese, was schließlich zur Stimulierung der cGK bzw. cAK führt (vgl. Abb. A-2). Über die Phosphorylierung ihrer Substratproteine beeinflussen dann letztendlich beide Kinasen die Regulation der Thrombozytenfunktion an unterschiedlichen Zielstrukturen (Übersicht: Schwarz et al., 2001; Münzel et al., 2003). Ein möglicher Angriffspunkt ist z.B. die Organisation des Zytoskeletts, welche durch Phospho-

rylierung von VASP (Harbeck et al., 2000; Smolenski et al., 2000), LASP (Butt et al., 2003), Hsp27 (Butt et al., 2001) oder Rap1b (Franke et al., 2000) negativ beeinflusst wird. Ebenfalls durch die VASP-Phosphorylierung konnte eine Hemmung des Fibrinogenrezeptors (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) beobachtet werden (Horstrup et al., 1994; Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Auch der Thromboxanrezeptor wird sowohl durch die cGK als auch durch die cAK phosphoryliert, wodurch wahrscheinlich dessen Kopplung an GTP-bindende Proteine und damit deren Aktivierung verhindert wird (Wang et al., 1998). Erst kürzlich wurde eine Inhibierung des G_i -gekoppelten ADP-Rezeptors (P2Y₁₂) nach Aktivierung der cGK durch NO und GMP beschrieben (Aktas et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus der Thrombozytenaktivität, welcher durch zyklische Nukleotide vermittelt wird, erfolgt über die Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dabei wurde eine Hemmung der IP₃-induzierten Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern sowohl durch cGMP als auch durch cAMP beschrieben (Geiger et al., 1992; Tertyshnikova et al., 1998; Tertyshnikova & Fein, 1998). Dass bei diesem Prozess die cGKI eine bedeutende Rolle spielt, konnte an humanen Thrombozyten von CML- (chronische myeloische Leukämie) Patienten gezeigt werden, die eine reduzierte Expression der cGKI aufwiesen (Egenthaler et al., 1993). In diesen Thrombozyten wurde die mit Thrombin- oder ADP-induzierte Kalziumfreisetzung nicht mehr durch cGMP gehemmt. Ebenso weist eine erhöhte Adhäsion und Aggregation von cGKI-defizienten Thrombozyten aus der Maus darauf hin, dass v.a. die cGKI bei der Inhibierung der Thrombozytenaktivität beteiligt ist (Massberg et al., 1999).

Der genaue Mechanismus, wie die cGKI die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Thrombozyten moduliert, ist bisher noch unklar. Ein mögliches Zielprotein könnte der IP₃RI sein, der ein Substrat der cGK und der cAK darstellt und durch diese phosphoryliert wird (Cavallini et al., 1996; El-Daher et al., 2000). Es ist jedoch fraglich, ob diese Phosphorylierung wirklich mit der Inhibierung der Kalziumfreisetzung zusammenhängt (Haug et al., 1999). Nachdem die durch zyklische Nukleotide induzierte Hemmung der Kalziumfreisetzung in VASP-defizienten Thrombozyten aus der Maus nicht beeinträchtigt ist, scheint VASP bei der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration nicht beteiligt zu sein (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnte in COS-7 Zellen sowie in humanen glatten Muskelzellen des Colons gezeigt werden, dass IRAG nach Aktivierung der cGKI die IP₃-induzierte Kalziumfreisetzung reduziert (Schlossmann et al., 2000; Fritsch et al., 2004). In COS-7 Zellen scheint dabei v.a. die Phosphorylierung des Ser696 (von

bovinem IRAG) eine Schlüsselrolle zu spielen (Ammendola et al., 2001). Nach den Untersuchungen dieser Arbeit konnte die entsprechende Aminosäure des humanen IRAG, Ser677, auch als cGMP-abhängige *in vivo* Phosphorylierungsstelle in Thrombozyten identifiziert werden. Da IRAG außerdem in den Membranen der Blutplättchen lokalisiert wurde und die spezifische Interaktion von IRAG mit der cGKI β und dem IP₃RI als trimerer Komplex auch in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte, deutet dies darauf hin, dass IRAG auch in Thrombozyten bei der Regulation des intrazellulären Kalziums eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise wird die cGKI β durch die Interaktion mit IRAG an die Membran des ER transloziert und nach Phosphorylierung von IRAG an Ser677 und/oder Ser664 kommt es dadurch zur Hemmung der IP₃-induzierten Kalziumfreisetzung aus dem ER (Abb. D-1). Als Substrat der cGKI könnte IRAG somit auch bei der NO/cGMP/cGKI-verursachten Hemmung der Thrombozytenaktivität beteiligt sein.

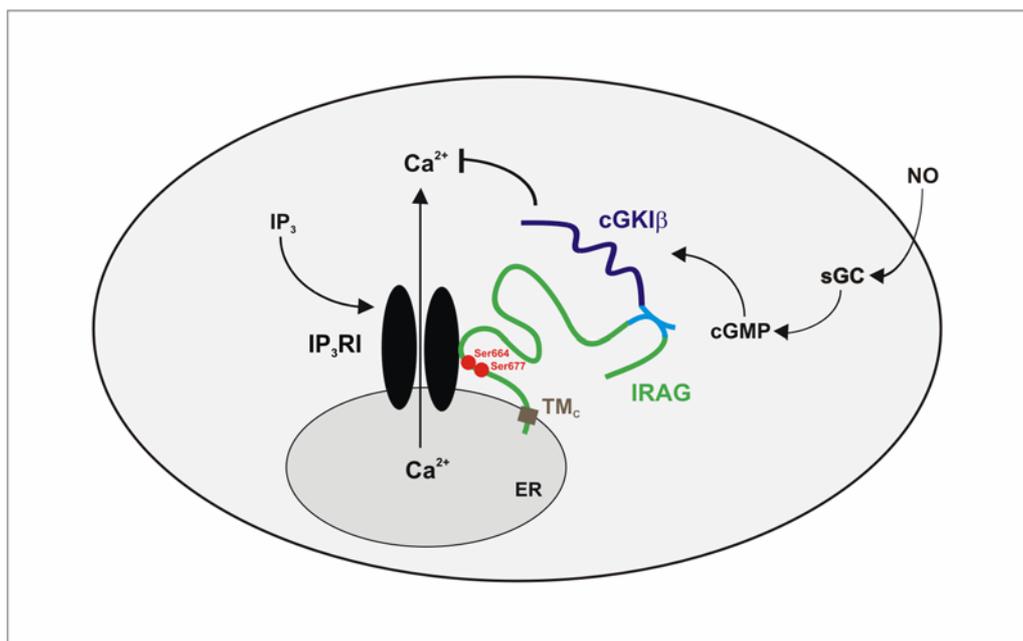


Abbildung D-1: Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch IRAG und cGKI β . Die Aktivierung der cGKI β durch NO/cGMP führt zur Phosphorylierung von IRAG an Ser664 und/oder Ser677 (rote Punkte), wodurch die IP₃-induzierte Freisetzung von Kalziumionen (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum, ER) durch den IP₃RI gehemmt wird. In hellblau ist die Interaktion von IRAG und cGKI β dargestellt. TM_C steht für C-terminale Transmembrandomäne.

Nachdem IRAG an Ser677 und Ser664 in humanen Thrombozyten auch durch cAMP oder Forskolin *in vivo* phosphoryliert wird, scheint IRAG nicht nur über cGMP-, sondern auch über cAMP-abhängig vermittelte Signalwege phosphoryliert zu werden und stellt damit möglicherweise eine Zielstruktur dar, an der diese beiden Wege zusammentreffen.

D.4. Ausblick

Um die physiologische Rolle von IRAG in Thrombozyten noch detaillierter aufzuklären, sind weitere Arbeiten erforderlich. Eine Möglichkeit wäre, die Funktion von Thrombozyten aus IRAG knock-out Mäusen hinsichtlich des „shape change“, der Adhäsion und Aggregation oder der Sekretion zu überprüfen, um die Frage zu klären, ob IRAG generell die Regulation der Thrombozytenaktivität beeinflusst. Des Weiteren könnten IRAG-defiziente Thrombozyten bezüglich der intrazellulären Kalziumfreisetzung untersucht werden, um zu sehen, ob IRAG auch in Thrombozyten speziell an diesem Prozess beteiligt ist. Anhand von Thrombozyten aus cGKI knock-out Mäusen könnte die *in vivo* Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 des IRAG Proteins mit den entsprechenden phosphospezifischen Antikörpern im Vergleich zu IRAG aus Wt Thrombozyten überprüft werden, damit eindeutig geklärt werden kann, ob die Phosphorylierung dieser Aminosäuren spezifisch durch die cGKI erfolgt. Zusätzlich könnten „shape change“- und Aggregationsmessungen mit Thrombozyten aus Wt Mäusen, cGKI knock-out Mäusen und erst kürzlich hergestellten IRAG-Deletionsmutanten (welchen das für den N-terminalen Bereich der coiled-coil Domäne codierende Exon 12 fehlt) durchgeführt und diese parallel mit den Phosphorylierungskinetiken der beiden Serine verglichen werden, um die Phosphorylierung von Ser664 und Ser677 mit der Regulation der Thrombozytenaktivität in Korrelation zu bringen.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche zur Hemmung der Thrombozytenaktivität führen, könnte dabei helfen, die Ursachen verschiedener Gefäßkrankheiten wie z.B. Angina Pectoris, Arteriosklerose und Thrombosen zu erkennen und geeignete Therapien zu entwickeln. Die Entdeckung von IRAG als Substratprotein der cGKI in humanen Thrombozyten, sowie ein besseres Verständnis der möglichen physiologischen Funktionen beider Proteine in Thrombozyten, ermöglicht die Herstellung verschiedener Pharmaka mit gezieltem Angriffspunkt in der NO/cGMP-Signalkaskade.

E Zusammenfassung

Die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade spielt bei verschiedenen physiologischen Prozessen, wie z.B. bei der Regulation des glatten Muskeltonus oder der Thrombozytenaktivität eine wichtige Rolle. In beiden Zellsystemen werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie die cGKI einerseits die Relaxation des glatten Muskels und andererseits die Hemmung der Thrombozytenfunktion mediiert. Auch einige Zielproteine der cGKI sind bekannt, über welche die Kinase ihre Wirkung vermitteln könnte. IRAG, ein relativ neu identifiziertes Substratprotein der cGKI, konnte in einem trimeren Komplex zusammen mit der cGKI β und dem IP₃RI aus den Membranen des glatten Muskels von der Rindertrachea isoliert werden. Von diesem Protein existieren zwei Isoformen, IRAGa und IRAGb. Beide Isoformen verfügen über eine coiled-coil Domäne, eine Interaktionstelle für die cGKI, sowie fünf *in vitro* Phosphorylierungsstellen.

Nachdem IRAG außerdem eine mögliche Transmembrandomäne am C-Terminus enthält (TM_C) und IRAGa eine weitere hydrophobe Domäne am N-Terminus aufweist (TM_N), sollte im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Eigenschaft von TM_C und TM_N als Transmembrandomänen überprüft werden. Dazu wurden mittels PCR verschiedene Konstrukte von IRAG hergestellt, die entweder nur eine oder keine der beiden Domänen aufwiesen. Nach Transfektion dieser IRAGa-TM_C und IRAGb-TM_C pEGFP bzw. pcDNA3.1 Konstrukte in COS-7 Zellen wurde die intrazelluläre Lokalisation der exprimierten IRAG Varianten im Vergleich zum Wt Protein untersucht. Diese Studien ergaben, dass IRAG über die TM_C in den intrazellulären Membranen des ER verankert wird und dass diese Domäne für die Lokalisation von IRAG entscheidend ist. Die TM_N scheint hierbei keine Rolle zu spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass weder TM_C noch TM_N bei der Interaktion von IRAG mit der cGKI β oder dem IP₃RI beteiligt sind und alle Komponenten des trimeren Komplexes auch in Abwesenheit von TM_C und TM_N effizient durch die cGKI β phosphoryliert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die *in vivo* Phosphorylierungsstellen von IRAG aufzuklären. Dazu wurde zunächst die Lokalisation von IRAG in humanen Thrombozyten untersucht. Ebenfalls wie in COS-7 Zellen konnte IRAG in den Membranen verankert gefunden werden. Auch der trimere Komplex aus IRAG, cGKI β und IP₃RI wurde erstmals aus Thrombozyten isoliert. Die Analyse der gesamt *in vivo* Phosphorylierung von IRAG in humanen

Thrombozyten zeigte, dass IRAG NO/cGMP-abhängig phosphoryliert wird und damit als *in vivo* Substrat der cGKIβ in Thrombozyten angesehen werden kann. Mittels Massenspektrometrie konnten zwei Aminosäuren des IRAG Proteins, Ser664 und Ser677, als cGMP-abhängige *in vivo* Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, welche zwei der bereits bekannten *in vitro* Phosphorylierungsstellen entsprechen. Durch Herstellung von zwei unterschiedlichen phosphospezifischen Antikörpern in dieser Arbeit konnte die individuelle Phosphorylierung der beiden Serine in humanen Thrombozyten überprüft werden. Diese Untersuchungen ergaben, dass Ser664 und Ser677 sowohl cGMP-abhängig, als auch cAMP-abhängig *in vivo* phosphoryliert werden. Die Ser664-Phosphorylierung kann außerdem durch NO und Forskolin stimuliert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IRAG in humanen Thrombozyten nicht nur ein Zielprotein der cGKI, sondern auch der cAK darstellt und damit einerseits über den NO/cGMP/cGKI-Signalweg und andererseits nach Aktivierung der cAMP/cAK-Kaskade *in vivo* phosphoryliert wird.

Welche physiologische Rolle IRAG in Thrombozyten wirklich spielt und ob dieses Protein als Substrat der cGKI möglicherweise auch bei der durch die cGMP-Kinase-vermittelten Hemmung der Thrombozytenaktivität beteiligt ist, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

F Anhang

F.1. Verwendete Primer in der PCR und Sequenzierung

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer (Tabelle F-1) und Sequenzierprimer (Tabelle F-2) aufgelistet. Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Die Arbeitslösung der PCR-Primer wurde auf 25 pmol/ μ l eingestellt, die der Sequenzierprimer auf 0,8 pmol/ μ l. Synthetische Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und „fett“ angegeben. „v“ steht für Vorwärts- und „r“ für Rückwärtsprimer.

Tabelle F-1: PCR-Primer für die Generierung von IRAGa/IRAGb-TM_C Konstrukten

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Konstrukt
AJ3 v AG11 r	<u>GGAATTC</u> ACCGCCATGGTAAAAGCTCCCCAGAG CGC <u>GGATCC</u> GCGCTAGGGATACATGACTTGTAAGAAATG	IRAGa-TM _C mit Stop
AJ1 v AG11 r	<u>GGAATTC</u> ACCGCCATGCCCCACATTCCCGAGGA CGC <u>GGATCC</u> GCGCTAGGGATACATGACTTGTAAGAAATG	IRAGb-TM _C mit Stop
AJ3 v MA1 r	<u>GGAATTC</u> ACCGCCATGGTAAAAGCTCCCCAGAG CGC <u>GGATCC</u> GGGATAACATGACTTGTAAGAA	IRAGa-TM _C ohne Stop
AJ1 v MA1 r	<u>GGAATTC</u> ACCGCCATGCCCCACATTCCCGAGGA CGC <u>GGATCC</u> GGGATAACATGACTTGTAAGAA	IRAGb-TM _C ohne Stop

Tabelle F-2: Verwendete Sequenzierprimer

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	IRAG-Sequenz
I1 r	CACAGAAGTCAGCGAAGCAGTG	Nukleotid 396-375
I1 v	GTCAACAGAGCCCCACAGTCCC	Nukleotid 319-339
I2 v	GAGAAGTCCAAAGAGATTACG	Nukleotid 835-855
I3 v	AAGAGAAGCGTTTTACAGGCA	Nukleotid 1250-1270
I4 v	GACAGAGGAAAACACAGAGAA	Nukleotid 1689-1709
I5 v	CTCTGAAGATGGAGTCCCTCGC	Nukleotid 2010-2031
I6 v	AGAACAGAAGAGCGAGAGCCC	Nukleotid 2415-2435

F.2. Verwendete Antikörper in der Westernblot-Analyse

In Tabelle F-3 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper mit den Angaben des Herstellers, Spenderorganismus und entsprechender Verdünnung für die Westernblot-Analyse angegeben. Die mit „*“ markierten Antikörper wurden in 1% MP verdünnt, alle anderen in 1x TBST + 3% BSA + 0,05% NaN₃. „AP“ steht für alkalische Phosphatase, „HRPO“ für Meerrettichperoxidase.

Tabelle F-3: Verwendete Antikörper in der Westernblot-Analyse

Antikörper	Spenderorganismus	Verdünnung	Referenz
IRAG; Nr. 90; gereinigt	Kaninchen, polyklonal	1:500	Geiselhöringer, 2002
pSer664-IRAG; gereinigt	Kaninchen, polyklonal	1:500	diese Arbeit
pSer677-IRAG; gereinigt	Kaninchen, polyklonal	1:1000	diese Arbeit
cGKIcommon; gereinigt	Kaninchen, polyklonal	1:200	Hofmann, Ruth
cGKI α ; gereinigt	Kaninchen, polyklonal	1:80	Schlossmann
cGKI β 105-4; gereinigt	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Schlossmann
IP ₃ -RI; ungereinigtes Serum	Kaninchen, polyklonal	1:1000	ABR
VASP; ungereinigtes Serum	Kaninchen, polyklonal	1:2500	Alexis
pSer239-VASP; gereinigt	Maus, monoklonal	0,7 μ g/ml	Alexis
Anti-Kaninchen-IgG, AP konjugiert	Esel, polyklonal	1:5000	Dianova
Anti-Kaninchen-IgG, HRPO konjugiert*	Ziege, polyklonal	1:100000	Dianova
Anti-Maus-IgG, HRPO konjugiert*	Esel, polyklonal	1:10000	Dianova

F.3. Verwendete Phosphorylierungsreagenzien

Zur Stimulierung der *in vivo* Phosphorylierung von IRAG in humanen Thrombozyten wurden die in Tabelle F-4 wiedergegeben Reagenzien mit den entsprechenden Arbeitslösungen, Endkonzentrationen und Inkubationszeiten verwendet.

Tabelle F-4: Verwendete Phosphorylierungsreagenzien

Substanz	Arbeitslösung	Endkonz.	Inkubation	Referenz
8-pCPT-cGMP ^{1,2,3,4}	1 mM in H ₂ O _{bidest.}	100 µM	1-30 min	BioLog
Rp-8-Br-PET-cGMPS ⁴	1 mM in H ₂ O _{bidest.}	200 µM	20 min	BioLog
Sp-5,6-DCI-cBIMPS ^{2,3,4}	1 mM in H ₂ O _{bidest.}	100 µM	1-30 min	BioLog
DEA/NO ³	10 mM in 10 mM NaOH	10 µM	1-30 min	Alexis
GEA/NO 3162 ²	1 mM in H ₂ O _{bidest.}	100 µM	1-30 min	Alexis
Forskolin ³	100 µM in DMSO	5 µM	1-30 min	Calbiochem

Die einzelnen Phosphorylierungsreagenzien wurden eingesetzt:

¹zur Identifizierung der *in vivo* Phosphorylierungsstellen

²zur Analyse der gesamt *in vivo* Phosphorylierung von IRAG

³zur Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von Ser664

⁴zur Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von Ser677.

Je nach Löslichkeit der Substanzen wurden die Thrombozyten zur Kontrolle mit H₂O_{bidest.}, 1 mM NaOH oder 5% DMSO inkubiert. Die genauen Inkubationszeiten der einzelnen Reagenzien und Kontrollen sind für die entsprechenden Versuche auch im Ergebnisteil (C) angegeben.

G Literaturverzeichnis

G.1. Zitierte Veröffentlichungen

- Aktas, B., Hönig-Liedl, P., Walter, U. & Geiger, J. (2002). Inhibition of platelet P2Y₁₂ and α _{2A} receptor signaling by cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Pharmacol*, **64**, 433-9.
- 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., 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 β . *J Biol Chem*, **276**, 24153-9.
- Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X.H., Ny, L., Andersson, K.E., Kehrel, B., Offermanns, S. & Fassler, R. (1999). The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensible for smooth muscle function. *Embo J*, **18**, 37-48.
- 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.
- Bachmann, B.J. & Low, K.B. (1990). Linkage map of Escherichia coli K-12, 8th ed. *Microbiol Rev*, **54**, 130-97.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-25.
- 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.
- Bonnevier, J., Fassler, R., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. & Arner, A. (2004). Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice. *J Biol Chem*, **279**, 5146-51.

- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F. & Lipp, P. (2001). Calcium signalling – an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 3-10.
- 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.
- Butt, E., Gambaryan, S., Göttfert, N., Galler, A., Marcus, K. & Meyer, H.E. (2003). Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *J Biol Chem*, **278**, 15601-7.
- Butt, E., Immler, D., Meyer, H.E., Kotlyarov, A., Laass, K. & Gaestel, M. (2001). Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerisation caused by hsp27 mutants. *J Biol Chem*, **276**, 7108-13.
- 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 USA*, **71**, 1891-5.
- Cavallini, L., Coassin, M., Borean, A. & Alexandre, A. (1996). Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem*, **271**, 5545-51.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-52.
- Eigenthaler, M., Ullrich, H., Geiger, J., Horstrup, K., Hönig-Liedl, P., Wiebecke, D. & Walter, U. (1993). Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukaemia. *J Biol Chem*, **268**, 13526-31.
- El-Daher, S.S., Patel, Y., Siddiqua, A., Hassock, S., Edmunds, S., Maddison, B., Patel, G., Goulding, D., Lupu, F., Wojcikiewicz, R.J.H. & Authi, K.S. (2000). Distinct localization and function of $^{1,4,5}IP_3$ receptor subtypes and the $^{1,3,4,5}IP_4$ receptor $GAP1^{IP4BP}$ in highly purified human platelet membranes. *Blood*, **95**, 3412-22.
- 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.
- Franke, B., Triest, M., Bruijn, K.M.T., Willingen, G., Nieuwenhuis, H.K., Negrier, C., Akkerman, J.W.N. & Bos, J.L. (2000). Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets. *Mol Cell Biol*, **20**, 779-85.
- Fritsch, R.M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhöringer, A., Hofmann, F. & Allescher, H.D. (2004). $InsP_3R$ -associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle. *J Biol Chem*, **279**, 12551-9.

- 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_{Ca} channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274**, 10927-35.
- 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.
- Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S.O. & Walter, U. (1992). Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 1031-5.
- Geiselhöringer, A. (2002). Interaktion und Gewebeverteilung von Komponenten des cGMP-Kinase Signalweges. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
- Halbrügge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbächer, P. & Walter, U. (1990). Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem*, **265**, 3088-93.
- Harbeck, B., Hüttelmaier, S., Schlüter, K., Jockusch, B.M. & Illenberger, S. (2000). Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem*, **275**, 30817-25.
- Haug, L.S., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S.I. & Ostvold, A.C. (1999). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J Biol Chem*, **274**, 7467-73.
- Hauser, W., Knobloch, K.P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U. & Zimmer, M. (1999). Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 8120-25.
- Hofmann, F., Ammendola, A. & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113**, 1671-6.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. & Ruth, P. (1992). Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Acta*, **1135**, 51-60.
- Horstrup, K., Jablonka, B., Hönig-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.
- 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.

- Keilbach, A., Ruth, P. & Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-73.
- 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.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-7.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- 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.
- Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. & de Jonge, H.R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*, **22**, 307-12.
- Massberg, S., Gruener, S., Konrad, I., Garcia Arguinzonis, M.I., Eigenthaler, M., Hemler, K., Kersting, J., Schulz, C., Mueller, I., Besta, F., Nieswandt, B., Heinzmann, U., Walter, U. & Gawaz, M. (2004). Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*, **103**, 136-42.
- 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.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F. & Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO*, **22**, 6027-34.
- Moro, M.A., Russel, R.J., Cellek, I., Lizasoain, I., Su, Y., Darley-USmar, V.M., Radomsky, M.W. & Moncada, S. (1996). cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 1480-5.
- Münzel, T., Feil, R., Mülsch, A., Lohmann, S.M., Hofmann, F. & Walter, U. (2003). Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosin 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation*, **108**, 2172-83.
- 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.

- Neubauer, G. & Mann, M. (1999). Mapping of phosphorylation sites of gel-isolated proteins by nano-electrospray tandem mass spectrometry: potentials and limitations. *Anal Chem*, **71**, 235-42.
- Ny, L., Pfeifer, A., Aszodi, A., Ahmad, M., Alm, P., Hedlund, P., Fässler, R. & Andersson, K.E. (2000). Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. *British J Pharmacol*, **129**, 395-401.
- 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.
- Pfitzer, G. (2001). Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, **91**, 497-503.
- Raeymaekers, L., Hofmann, F. & Casteels R. (1988). Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*, **252**, 269-73.
- Reinhard, M., Jarchau, T. & Walter, U. (2001). Actin-based motility: Stopp and go with ENA/VASP proteins. *Trends Biochem Sci*, **26**, 243-9.
- 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.
- 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.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **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.
- 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, IP₃ receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, **404**, 197-201.
- Schlossmann, J., Feil, R. & Hofmann, F. (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, **35**, 21-7.
- Schwarz, U.R., Walter, U. & Eigenthaler, M. (2001). Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*, **62**, 1153-61.
- Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H. & Walter, U. (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem*, **273**, 20029-35.
- Smolenski, A., Poller, W., Walter, U. & Lohmann, S.M. (2000). Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem*, **275**, 25723-32.
- 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*, **522.2**, 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⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J Biol Chem*, **276**, 19729-37.
- Tang, M., Wang, G., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. & Mendelsohn, M.E. (2004). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature Med*, **9**, 1506-12.
- Tertyshnikova, S. & Fein, A. (1998). Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 1613-7.

- Tertyshnikova, S., Yan, X. & Fein, A. (1998). cGMP inhibits IP₃-induced Ca²⁺ release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J Physiol*, **512.1**, 89-96.
- 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., 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⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ibeta. *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.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K.H. & Walter, U. (1986). Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem*, **158**, 203-10.
- Wang, G.R., Zhu, Y., Halushka, P.V., Lincoln, T.M. & Mendelsohn, M.E. (1998). Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: *in vivo* phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4888-93.
- Wegener, J.W., Schulla, V., Lee, T.S., Koller, A., Feil, S., Feil, R., Kleppisch, T., Klugbauer, N., Moosmang, S., Welling, A. & Hofmann, F. (2004). An essential role of Ca_v1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB*, **18**, 1159-61.
- Wernet, W., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, **251**, 191-6.
- Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M. & Liu, M. (2001). Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **276**, 19770-7.

G.2. Eigene Veröffentlichungen

Abstracts

Antl, M., Geiselhöringer, A., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2003). Phosphorylation of the cGMP kinase substrate IRAG in platelets. *cGMP2003*, **1**, 57.

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**, R39.

Geiselhöringer, A., Antl, M. & Schlossmann, J. (2003). Localization and assembly of IRAG. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **367**, R47.

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

Originalarbeiten

Koethe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetz, I. & Eberl, L. (2003). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the *cep* quorum-sensing system. *Cell Microbiol*, **5**, 343-51.

Danksagung

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

Herrn Professor Dr. Franz Hofmann für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, für sein stetes Interesse und für die Anregungen zur Lösung von kleineren und größeren Problemen.

Herrn Dr. Jens Schlossmann für die engagierte Betreuung, für viele gute Ideen und für seine fachliche Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Siess für die Aufnahme im Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (GRK 438) und für die Ermöglichung eines Promotionsstipendiums.

Herrn Dr. Matthias Wilm und Thomas Köcher von der Protein and Peptide Group am EMBL in Heidelberg für die gute Kooperation bei der Proteinsequenzierung und Phosphopeptidanalyse.

Katja Sigl und Sven Moosmang für ihre Ausdauer und Geduld bei den zahlreichen Blutspendeaktionen.

Allen Arbeitskollegen im 1. Stock (v.a. Katja Sigl, Angela Geiselhöringer und Angela Koller) für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Laborproblemen, für die gute Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima.

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes, von der Werkstatt bis zum 3. Stock, für ihre Hilfsbereitschaft und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Den „Mädels“ vom Graduiertenkolleg für den regen Austausch von Erfahrungen und für die aufmunternden Gespräche, die über so manchen Tiefschlag hinwegtröstet haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und Martin Baron für die Unterstützung, für das Verständnis und für den Rückhalt in den letzten Jahren.