

Etablierung und Charakterisierung von Modulatoren der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von
Nadejda Valtcheva

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. R. Feil in der Zeit von Januar 2005 bis Dezember 2008 am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Abteilung Signaltransduktion - Transgene Modelle angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung:

18.12.2008

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. Robert Feil

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

Meinem Vater

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Robert Feil für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Aufgabenstellung und für die Einführung in das A und O der wissenschaftlichen Praxis. Zusätzlich danke ich, dass ich meine Daten bei diversen Tagungen vorstellen durfte.

Prof. Dr. P. Ruth, Prof. Dr. G. Dodt, Prof. Dr. M. Duszenko und Prof. Dr. A. Nordheim für das Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Franz Hofmann für die freundliche Bereitstellung seines Labors und die Unterkunft in München. Dem Team in München für das Einweisen in die wichtigsten Labortechniken.

Matthias Hillenbrand für die fachliche Hilfe und für das Korrekturlesen des Manuskriptes, sowie für die Unterstützung außerhalb des Labors.

Dr. Alexander Beck für die Durchführung der Massenspektrometrie, Dr. Hubert Kalbacher für die Peptidsynthese und -aufreinigung, Dr. Michael Russwurm für die FRET-Messungen, Prof. Dr. Hans Bisswanger für die Aufstellung eines Kinetikmodells für die cGKI, den Mitarbeitern des Isotopenlabors für die Geduld.

Dr. Susanne Feil für die Einführung in die Tierzucht und Tierhandhabung, für die Bereitstellung von Versuchstieren, sowie für die stete Begleitung im Laboralltag.

Andrea Gerling für die Bereitstellung von *rescue*- und *knockout*-Gruppen für die Zellkulturexperimente. Zusätzlich danke ich für die gemeinsamen Freizeitaktivitäten, die entscheidend zum Stressabbau im letzten Jahr beigetragen haben.

Peter Nestorov für die gründliche Auseinandersetzung mit der cGKI-Kinetik, Martin Thunemann für die Hilfe bei Computerproblemen jeglicher Art, Robert Gnügge und Richard Griesbach für die scharfsinnigen Bemerkungen, Martina Fausel und Barbara Birk für die technische Hilfe.

Bei allen Laborkollegen und Praktikanten (sowohl in München als auch in Tübingen) bedanke ich mich für die freundliche Atmosphäre und effektive Zusammenarbeit.

Doris Wegend danke ich für die Freundschaft, die aus der Zeit in München mehr als nur einen Aufenthalt gemacht hat, dem Labor von Prof. Dr. Duszenko für die entspannenden Kaffeepausen. Viola Denninger und Caroline Schönfeld danke ich für die schöne Zeit zusammen, für die bewegenden Gespräche und aufmunternden Worte. Ivan Nikolov für den Aufbau meines Selbstbewusstseins in schwierigen Momenten.

Meiner Mutter danke ich, dass sie mich unterstützt, an mich geglaubt und mir bei jeder auch so bedrückenden Situation mit viel Humor und Lebensweisheit geholfen hat.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	viii
A. Einleitung	1
A.1. Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI).....	1
A.1.1. Biochemische Eigenschaften und biologische Relevanz der cGKI	1
A.1.2. Mausmodelle zur <i>in vivo</i> Analyse der cGKI.....	3
A.1.3. Rolle der cGKI in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der glatten Gefäßmuskulatur	4
A.2. Pharmakologische Inhibitoren der cGKI	7
A.2.1. Vorhandene Inhibitoren	7
A.2.2. Neue Ansätze.....	9
A.3. Die Proteintransduktion	9
A.4. Zielsetzung der Arbeit.....	11
B. Material und Methoden	12
B.1. Materialien	12
B.1.1. Materialien, Chemikalien und Geräte.....	12
B.1.2. Allgemeine Lösungen und Puffer	12
B.1.3. Plasmide, Oligonukleotide und Baculoviren.....	18
B.1.4. Antikörper	19
B.2. Verwendete Organismen und Zellsysteme.....	19
B.2.1. Mauszucht – Linien, Haltung und Genotypisierung	19
B.2.2. Zellkultur von VSMCs der Maus.....	21
B.2.3. Bakterien – Stämme, Nährmedien und Kultivierung	25
B.2.4. Insektenzellen – Linien, Nährmedien und Kultivierung	26
B.3. Molekularbiologische Methoden	26
B.3.1. Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA	26
B.3.2. Erzeugung rekombinanter Baculoviren	37
B.4. Expression rekombinanter Proteine	37
B.4.1. Proteinexpression in Bakterien	37
B.4.2. Proteinexpression in Insektenzellen.....	39
B.4.2.1. Proteinexpression in Monolayerkulturen	39
B.4.2.2. Proteinexpression in Suspensionskulturen	40
B.5. Proteinbiochemische Methoden	41
B.5.1. Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	41
B.5.2. Interaktionsanalyse	43
B.5.3. Dialyse.....	44
B.5.4. Ionenaustauschchromatographie	45
B.5.5. Proteinbestimmung	46
B.5.6. Proteinfällung	47
B.5.7. SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western Blot	48
B.5.8. Analytische Gelfiltration.....	51
B.5.9. Bestimmung der Kinaseaktivität (Kinase-Assay)	52
B.5.10. FRET-Messung mit dem cGMP-Indikator cGi-500	54
B.6. Bioanalytische Verfahren.....	54
B.6.1. Peptidsynthese und HPLC	54

Inhaltsverzeichnis

B.6.2. Massenspektrometrie	55
C. Ergebnisse	56
C.1. Charakterisierung der Effekte von Rp-PET auf die cGKI	56
C.1.1. Einfluss von Rp-PET auf das cGKI-abhängige Wachstum von VSMCs.....	56
C.1.2. Einfluss von Rp-PET auf die cGKI-abhängige VASP-Phosphorylierung in VSMCs.....	58
C.1.3. Einfluss von Rp-PET auf die <i>in vitro</i> Aktivität von cGKI α und cGKI β	59
C.1.4. Verifizierung der Homogenität der benutzten Rp-PET Präparationen über ESI-MS.....	61
C.1.5. Einfluss von Rp-PET auf die Konformation des cGMP-Indikators cGi-500	62
C.2. Charakterisierung der Effekte von Rp-pCPT auf die cGKI.....	63
C.2.1. Einfluss von Rp-pCPT auf die Aktivität von cGKI α und cGKI β	63
C.2.2. Verifizierung der Homogenität der benutzten Rp-pCPT Präparationen über ESI-MS.....	65
C.3. Etablierung neuer isoformspezifischer Inhibitoren	66
C.3.1. Coexpression von HT-I α -N bzw. HT-I β -N mit cGKI α , cGKI β oder cGKI β M mit anschließender Interaktionsanalyse	68
C.3.2. Expression und Reinigung von HT-I α -N und HT-I β -N	70
C.3.3. Charakterisierung von HT-I β -N	77
C.3.4. Synthese, Reinigung und Charakterisierung der Peptide tat β 24 und tat β 39	80
D. Diskussion.....	82
D.1. Charakterisierung von Rp-PET und Rp-pCPT	82
D.2. Konstruktion und Charakterisierung neuer isoformspezifischer Inhibitoren.....	84
D.3. Zukunftsperspektiven	89
E. Zusammenfassung.....	90
F. Anhang	92
F.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenz der HT-I-N-Termini und der <i>full length</i> -cGKI-Isoformen ..	92
F.2. Plasmide, Primer und Baculoviren.....	97
F.3. Antikörper.....	98
F.4. cGMP-Analoga und Enzyme.....	99
F.4.1. cGMP und cGMP-Analoga	99
F.4.2. Enzyme.....	99
F.5. Kommerziell erhältliche Kits.....	100
F.6. Chromatographie-Säulenmaterial.....	100
F.7. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	101
G. Literaturverzeichnis.....	104
H. Eigene Veröffentlichungen.....	110

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Akt	Akt/Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
8-Br-cGMP	8-Bromo-cGMP
8-Br-PET-cGMP	β -Phenyl-1,N ² -Etheno-8-Bromo-cGMP
8-pCPT-cGMP	8-(Chlorophenylthio)-cGMP
c	centi (10 ⁻²)
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	DNA komplementär zur mRNA
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
cGi-500	cGMP-Indikator mit den zwei cGMP-Bindungsstellen der cGKI
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cGMPS	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphorothioat
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
CNG	<i>cyclic nucleotide gated (channels)</i>
CPP	zellpenetrierende Peptide (<i>cell penetrating peptides</i>)
Cre	Cre-Rekombinase
Ctr	Kontrolle
CV	Säulenvolumen (<i>column volumes</i>)
Da	Dalton; biochemische Masseinheit (entspricht 1 u; keine SI-Einheit)
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO Synthase
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

g	Konstante der Erdanziehung ($9,8 \text{ m s}^{-2}$); Größe für Zentrifugalkraft
GC	Guanylylcyclase (s – <i>soluble</i> , p – <i>particulate</i>)
Gent	Gentamycin
GMP	Guanosin-5'-Monophosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPSF	hohe Reinheit, salzfrei (<i>high purity salt free</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HT	His ₆ + Tat
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGK Substrat (<i>IP₃ receptor-associated cGK substrate</i>)
k	kilo- (10^3)
K _a	Aktivierungskonstante; Konzentration eines Stoffes, bei der ein Enzym halbmaximale Aktivität besitzt
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase (1000 bp)
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibierungskonstante
ki	Knock-in
ko	Knockout
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro- (10^{-6})
m	milli- (10^{-3})
m	Meter
M	Konzentration in Mol pro Liter
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
min	Minute
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCK	<i>myosin-light-chain kinase</i>
MLCP	<i>myosin-light-chain phosphatase</i>
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium)
mRNA	messenger RNA
n	nano- (10^{-9})
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
NP	natriuretische Peptide
nt	Nukleotid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
p	pico- (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pfu	Plaque formende Einheiten (<i>plaque forming units</i>)
pH	$-\log[\text{H}_3\text{O}^+]$ (<i>pondus hydrogenii</i>)
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PKA	siehe cAK
PKG	siehe cGK
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGS	<i>regulator of G-protein signalling</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROCK	Rho-Kinase
Rp-8-Br-PET-cGMPS	β -Phenyl-1,N ² -Etheno-8-Bromo-cGMPS (Rp-Isomer)
Rp-8-pCPT-cGMPS	8(-Chlorophenylthio)-cGMPS (Rp-Isomer)
Rp-cGMPS	zusammenfassend für Rp-PET und Rp-pCPT
RP-HPLC	<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
Rp-pCPT	Rp-8-pCPT-cGMPS
Rp-PET	Rp-8-Br-PET-cGMPS
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur (25°C)
s	Sekunde
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Sf9	Insektenzelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i>
SI	Internationales Einheitensystem (von frz.: <i>Système international d'unités</i>)
SM22 α	glattmuskelspezifisches Protein (<i>smooth muscle 22-α</i>)
SPPS	<i>solid-phase peptide synthesis</i>
T4	Bakteriophage T4
T7	Bakteriophage T7
Tat	CPP aus dem Tat-Protein von HIV
TB	Toluidinblau
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS(-T)	Tris-gepufferte Saline (mit Tween)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u	SI-Masseeinheit (entspricht $1/12$ der Masse des Kohlenstoffisotops ¹² C)
U	Einheit (<i>Unit</i>)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>)

Abkürzungsverzeichnis

VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen (<i>vascular smooth muscle cell</i>)
W	Watt
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Aufbau und Aktivierung der cGKI.....	2
Abb. 2. Der cGMP/cGK Signalweg.....	3
Abb. 3. Modell der isoformspezifischen Mechanismen zur Relaxation der glatten Muskelzelle durch cGKI α bzw. cGKI β	5
Abb. 4. Strukturformeln der cGMP-Analoga.....	8
Abb. 5. Einfluss von Rp-PET auf das cGKI-vermittelte Wachstum in VSMCs.....	57
Abb. 6. Effekte von Rp-PET auf die cGKI-vermittelte VASP-Phosphorylierung	58
Abb. 7. Einfluss von Rp-PET auf die cGMP-stimulierte Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts).....	60
Abb. 8. Effekt von Rp-PET auf die basale Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts)	61
Abb. 9. Massenspektren (ESI-MS) von Rp-PET (links) und einem Gemisch aus (70:30; v/v) Rp-PET und PET (rechts).....	62
Abb. 10. FRET-Messung mit einem cGMP-Indikator, der die zwei cGMP-Bindungsstellen der cGKI, eingeschlossen zwischen YFP und CFP, trägt.....	63
Abb. 11. Einfluss von Rp-pCPT auf die cGMP-stimulierte Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts).....	64
Abb. 12. Effekt von Rp-pCPT auf die basale Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts)	65
Abb. 13. Massenspektren (ESI-MS) von Rp-pCPT (links) und von einem Gemisch aus (30:70; v/v) Rp-pCPT und pCPT (rechts).....	66
Abb. 14. Vorgehensweise bei der Konstruktion von pHT- α -N und pHT- β -N (oben) und der Donorplasmide pFastBacHT- α -N und pFastBacHT- β -N zur Herstellung rekombinanter Baculoviren (unten).....	67
Abb. 15. Die Plasmide pHT- α -N und pHT- β -N	68
Abb. 16. Ni ²⁺ -pull down nach Coexpression der HT-N-Termini mit den <i>full length</i> -Kinasen in Sf9-Zellen	69
Abb. 17. IPTG-Induktion der Expression von HT- α -N und HT- β -N in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	70
Abb. 18. Reinigung der rekombinanten Proteine HT- α -N (A) und HT- β -N (B) aus <i>E. coli</i> über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie im <i>batch</i> -Verfahren	71
Abb. 19. Säulenreinigung von HT- β -N aus 4 l Bakterienkultur durch Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie (HisTrap FF crude 2x 1 ml, ÄKTA)	72
Abb. 20. Analyse der Fraktionen aus der Ni ²⁺ /His-Affinitätschromatographie (ÄKTA) des rekombinanten HT- β -N	73
Abb. 21. Kationenaustauschchromatographie (HiTrap SP HP, 1ml) von Pool I des über Affinitätschromatographie gereinigten HT- β -N	74
Abb. 22. Kationenaustauschchromatographie (HiTrap SP HP, 1ml) von Pool II des über Affinitätschromatographie gereinigten HT- β -N	75
Abb. 23. Gelfiltration (Superdex 200 10/300 GL) der durch die Kationenaustauschchromatographie von Pool II aufgetrennten Fraktionen „9“ (oben) und „17“ (unten).....	76
Abb. 24. Endpräparation von HT- β -N.....	77
Abb. 25. Einfluss von HT- β -N auf die Kinaseaktivität der cGKI α (links) und der cGKI β (rechts).....	78
Abb. 26. Einfluss von HT- β -N auf das cGKI-vermittelte Wachstum von WT-VSMCs.....	78
Abb. 27. Einfluss von HT- β -N auf das cGKI-vermittelte Wachstum von α - und β - <i>rescue</i> -VSMCs	79
Abb. 28. Einfluss von tat β 24, tat β 39 und tat auf das cGKI-vermittelte Wachstum von WT-VSMCs	81

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Ausgewählte cGMP-Analoga mit ihren K_a - bzw. K_i -Werten und der relativen Lipophilität.....	7
Tab. 2. Einige häufig eingesetzte zellpenetrierende Peptide.....	10
Tab. 3. Verwendete cGKI-Mutanten.....	19
Tab. 4. PCR zur Genotypisierung der Mäuse.....	20
Tab. 5. Eigenschaften der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme.....	25
Tab. 6. Puffer für die Affinitätsreinigung His ₆ /Ni ²⁺ im <i>batch</i> -Verfahren.....	42
Tab. 7. Parameter für die His ₆ /Ni ²⁺ -Affinitätsreinigung (ÄKTA).....	43
Tab. 8. Parameter für die Kationenaustauschchromatographie (ÄKTA).....	46
Tab. 9. Proteinauftragsmengen für das SDS-Gel je nach Anwendung (Coomassie-Färbung oder Western Blot).....	49
Tab. 10. Zusammensetzung der Gele für Glycin-SDS-PAGE.....	49
Tab. 11. Zusammensetzung der Gele für Tricin-SDS-PAGE.....	50
Tab. 12. Parameter für die analytische Gelfiltration (ÄKTA).....	52
Tab. 13. Bilanzierung der Testreinigung von HT- α -N und HT- β -N über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie im <i>batch</i> -Verfahren (je 250 ml Kultur).....	72
Tab. 14. Bilanzierung der Säulenreinigung von HT- β -N (4 l Kultur) über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	73
Tab. 15. Für die Klonierung verwendete Plasmide.....	97
Tab. 16. Verwendete Primer.....	98
Tab. 17. Verwendete Baculoviren.....	98
Tab. 18. Verwendete primäre Antikörper.....	98
Tab. 19. Verwendete sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt).....	99
Tab. 20. Verwendete Restriktionsenzyme.....	100
Tab. 21. Verwendete Chemikalien, die nicht von <i>Carl Roth</i> bezogen wurden.....	101
Tab. 22. Wichtige Verbrauchsmaterialien.....	101
Tab. 23. Verwendete Gerätschaften.....	102

A. Einleitung

A.1. Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI)

A.1.1. Biochemische Eigenschaften und biologische Relevanz der cGKI

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs) sind durch den sekundären Botenstoff cGMP aktivierbare Ser-/Thr-Proteinkinasen. In Säugern unterscheidet man die cytosolische cGKI und die membranständige cGKII, die von zwei verschiedenen Genorten codiert werden. Die cGKI kommt in zwei Isoformen vor, cGKI α und cGKI β , die durch zwei verschiedene Varianten des Exons 1 hervorgebracht werden und sich in den ersten etwa 100 Aminosäuren unterscheiden (Francis and Corbin, 1999). Beide Isoformen liegen cytosolisch als Homodimere vor. cGKI kommt in hohen Konzentrationen in den Glattmuskelzellen (α und β), in den Thrombocyten (hauptsächlich β), im Cerebellum (α), in den Dorsalganglien (α) und im Hippocampus (β) vor (Hofmann et al., 2000; Keilbach et al., 1992). In den genannten Geweben bzw. Organen reguliert die Kinase diverse physiologische Funktionen wie den Blutgefäßtonus, die Thrombocytenaggregation, die Darmperistaltik und steuert auch komplexe Prozesse wie Lernen und Gedächtnis (Hofmann, 2005).

Die cGKI besteht aus 3 funktionellen Domänen: der N-terminalen, der regulatorischen und der katalytischen Domäne (Francis and Corbin, 1999; Pfeifer et al., 1999) (**Abb. 1A**). Am N-Terminus befindet sich ein Leucin-Zipper-Motiv, das für die Homodimerisierung, die Interaktion mit anderen Proteinen und für die subzelluläre Lokalisation zuständig ist, gefolgt von einer autoinhibitorischen Region, die in Abwesenheit von cGMP das aktive Zentrum des Enzyms blockiert (Hofmann et al., 2006). Die Unterschiede am N-Terminus zwischen den beiden Isoformen resultieren in unterschiedlichen Aktivierungskonstanten K_a für cGMP [0,1 μ M für cGKI α bzw. 1 μ M für cGKI β , (Ruth et al., 1991)], sowie in einer unterschiedlichen Substratspezifität (Hofmann et al., 2006). Eine flexible Region trennt die N-terminale von der regulatorischen Domäne. Letztere besteht aus zwei benachbarten cGMP-Bindungsstellen: einer hochaffinen und einer niederaffinen im Fall von cGKI α und zwei niederaffinen im Fall von cGKI β (Ruth et al., 1991). Die katalytische Domäne enthält eine ATP- und eine Substratbindungstasche. Im inaktiven Zustand des Enzyms wird die katalytische Domäne durch die autoinhibitorische Region der N-terminalen Domäne blockiert. Letztere wird nach der Bindung von cGMP an die regulatorische Domäne autophosphoryliert und eine Konformationsänderung des gesamten Moleküls wird ausgelöst, wodurch das aktive Zentrum freigelegt wird (**Abb. 1B**). Dieses Modell wurde durch *small-angle x-ray scattering*-Experimente unterstützt, durch die eine Elongation des Enzyms nach cGMP-Bindung detektiert wurde (Wall et al., 2003). Zusätzliche Beweise liefert die Kinetik einer cGKI-*Clip-*

Einleitung

Mutante (65 kDa), der der N-Terminus fehlt. Diese ist konstitutiv aktiv und die Bindung von cGMP bewirkt keine Erhöhung der Kinaseaktivität (Heil et al., 1987). Dieses klassische Modell der cGKI-Aktivierung wurde kürzlich um einen weiteren Mechanismus erweitert. Es konnte gezeigt werden, dass über Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten innerhalb des Leucin-Zippers (Cys42) das cGKI α -Dimer kovalent verbunden und aktiviert werden kann (Burgoyne et al., 2007). Diese oxidative Aktivierung erfolgt nur in der cGKI α , da cGKI β keine Cysteine in dieser Region aufweist.

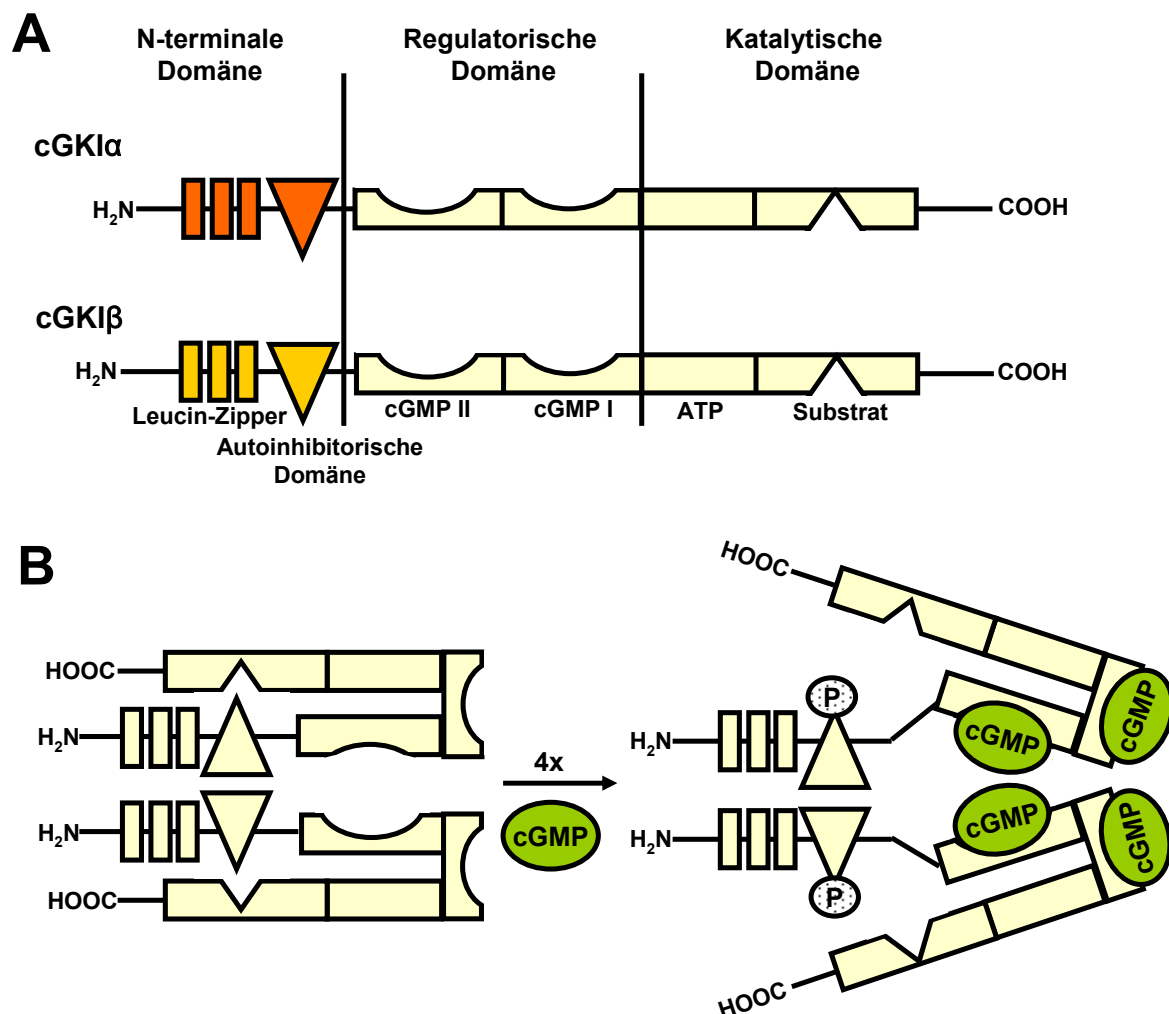


Abb. 1. Aufbau und Aktivierung der cGKI. **A.** Die cGKI besteht aus drei Domänen – der N-terminalen, der regulatorischen und der katalytischen Domäne. Die zwei Isoformen unterscheiden sich lediglich in deren N-terminalen Domäne, die bei cGKI α aus 88 Aminosäuren, bei cGKI β aus 104 Aminosäuren besteht. Daraus resultiert das unterschiedliche Molekulargewicht der Isoformen (cGKI α – 76 kDa, cGKI β – 78 kDa). **B.** Beide cGKI-Isoformen liegen als Homodimere vor. Nach dem heutigen Modell bewirkt die Bindung von 4 Molekülen cGMP pro Dimer die Autophosphorylierung der autoinhibitorischen Region und die Konformationsänderung des Proteins in eine elongierte aktive Form.

Die cGKI spielt neben bestimmten Phosphodiesterasen (PDEs), die auch für die Regulation des cGMP-Spiegels verantwortlich sind (Kass et al., 2007; Sonnenburg

Einleitung

and Beavo, 1994), und cyclisch-Nukleotid-gesteuerten Kationenkanälen [CNGs, (Biel et al., 1999)] eine zentrale Rolle in der intrazellulären Verarbeitung von cGMP-Signalen. cGMP wird aus GTP durch Guanylylcyclasen (GC) gebildet. Man unterscheidet die lösliche GC (sGC) (Koesling and Friebe, 1999), die durch das z. B. im Endothel gebildete Gasradikal NO aktiviert wird, und die membranständige, durch natriuretische Peptide (NPs) aktivierbare, partikuläre GC (pGC) (Kuhn, 2003). Die Weiterleitung des Signals wird durch PDEs (z. B. PDE5) terminiert, die cGMP zu GMP abbaut. Der Signalweg ist in **Abb. 2** schematisch dargestellt (Kemp-Harper and Feil, 2008).

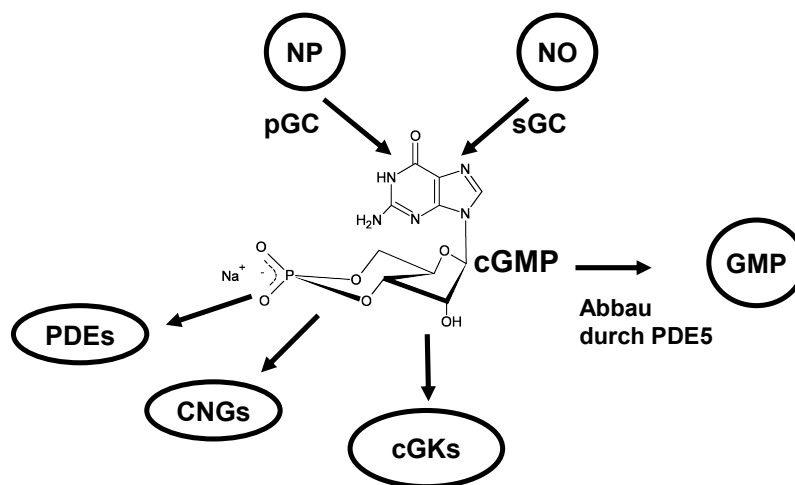


Abb. 2. Der cGMP/cGK Signalweg. Der sekundäre Botenstoff cGMP wird aus GTP entweder von der partikulären Guanylylcyclase (pGC) nach Aktivierung durch die natriuretischen Peptide (NP) oder von der löslichen Guanylylcyclase (sGC) nach Aktivierung durch Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. Die drei Hauptzielmoleküle, deren Aktivität durch cGMP moduliert wird, sind die Phosphodiesterasen (PDEs), die cyclisch-Nukleotid-gesteuerten Kationenkanäle (CNGs) und cGKs. Zur Terminierung des Signals wird cGMP z. B. durch PDE5, die selbst auch durch cGMP aktiviert wird, zu GMP abgebaut.

A.1.2. Mausmodelle zur *in vivo* Analyse der cGKI

Die Hausmaus (*Mus musculus*) ist ein beliebtes Modell zur Untersuchung der *in vivo* Funktion von Proteinen und deren Rolle bei der Entstehung menschlicher Erkrankungen. In den letzten 20 Jahren ist es möglich geworden, Manipulationen des Mausgenoms vorzunehmen, um bestimmte Gene auszuschalten oder zu überexprimieren, um die Funktionen bestimmter Proteine aufzudecken (Capecchi, 2005).

Im komplexen Netzwerk der cGMP-Signalweiterleitung war die Herstellung von cGKI-Knockout-Mäusen (Pfeifer et al., 1998; Wegener et al., 2002) unentbehrlich, um die cGKI-vermittelten von den cGKI-unabhängigen Effekten abzugrenzen. Zum Beispiel können Zellen aus Mausgewebe von cGKI-exprimierenden und cGKI-Knockout-

Mäusen isoliert und verglichen werden, um die Rolle der cGKI für bestimmte Prozesse in Zellkulturexperimenten (Weinmeister et al., 2008) zu klären. Ein Nachteil der konventionellen cGKI-Knockout-Mäuse, der allerdings auch die Wichtigkeit der cGKI widerspiegelt, ist, dass diese nur eine kurze Lebenserwartung haben (3 bis 6 Wochen) und sich für Langzeitexperimente nicht eignen. Dieses Problem kann durch die Technik der konditionalen Mausmutagenese (Feil, 2007) umgangen werden, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

Ein weiteres cGKI-Mausmodell sind die sog. cGKI α - und β -*rescue*-Mäuse, die nur im glatten Muskel eine der zwei Isoformen exprimieren und in restlichen Geweben cGKI-defizient sind (Weber et al., 2007). Diese wurden erzeugt, indem man cDNA von cGKI α oder β in ein glattmuskelspezifisch exprimiertes Gen (SM22 α) der Maus eingebracht (Knock-in Technik) und anschließend diese Tiere auf einem globalen cGKI-Knockout-Hintergrund gekreuzt hat. Demzufolge wird die entsprechende Isoform unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors exprimiert, während die endogene cGKI (vom cGKI-Locus) fehlt. Die cGKI-*rescue* Mäuse haben eine annähernd normale Lebenserwartung und eignen sich als Knockout-Modell für alle Nicht-Glattmuskel-Gewebetypen (Foller et al., 2008). Auf der anderen Seite kann man die isoformspezifischen Funktionen der cGKI in der glatten Muskulatur untersuchen. Allerdings soll darauf hingewiesen werden, dass die im SM22 α integrierte cGKI im Vergleich zum WT überexprimiert wird und zwar in den α -*rescue* Mäusen stärker als in den β -*rescues* (Weber et al., 2007).

A.1.3. Rolle der cGKI in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der glatten Gefäßmuskulatur

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf den NO/cGMP/cGKI-vermittelten Effekten im kardiovaskulären System. In den Blutgefäßen wird NO als Antwort auf externe Signale (z. B. Acetylcholin oder den Scherstress, den der Blutfluss auf die Gefäßwand ausübt) in den Endothelzellen durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet und diffundiert in die darunter liegende Glattmuskelzellschicht. Der daraus resultierende cGMP-Konzentrationsanstieg, der zur Aktivierung der cGKI führt, sorgt dann für eine Relaxation der glatten Muskulatur (Munzel et al., 2003). Auf diesem Effekt beruht die positive Wirkung von NO-freisetzenden Medikamenten wie Nitroglycerin (Ignarro et al., 2002), die zur Linderung der Symptome von akuten Herz-Kreislaufkrankungen wie Angina pectoris eingesetzt werden.

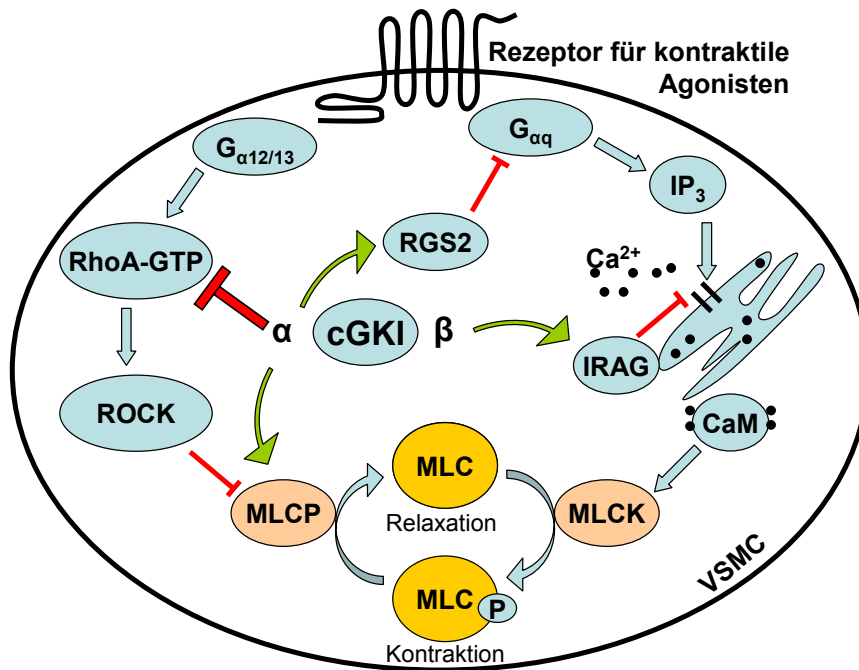


Abb. 3. Modell der isoformspezifischen Mechanismen zur Relaxation der glatten Muskelzelle durch cGKI α bzw. cGKI β . Der Phosphorylierungsstatus der leichten Kette von Myosin (*myosin light chain*, MLC) bestimmt den Tonus der VSMC. Die phosphorylierte Form begünstigt die Kontraktion, die dephosphorylierte Form die Relaxation. cGKI wirkt den kontraktile Stimuli entgegen, indem sie auf verschiedenen Wegen zur Aktivierung der Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (*myosin-light-chain phosphatase*, MLCP) oder Hemmung der Myosin-leichte-Kette-Kinase (*myosin-light-chain kinase*, MLCK) führt. Für eine ausführlichere Beschreibung der gezeigten Signalkaskaden s. Text. [Adaptiert von (Surks, 2007)].

Die Regulation des Blutgefäßtonus ist eng verbunden mit dem Phosphorylierungsstatus der regulatorischen leichten Kette von Myosin (*myosin light chain*, MLC) in den glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs). Die phosphorylierte MLC aktiviert die ATPase-Aktivität der schweren Ketten des Myosins und veranlasst das Entlanggleiten der Myosinfilamente an den Aktinfilamenten, was eine Kontraktion des glatten Muskels zur Folge hat. Dementsprechend führt die Phosphorylierung der regulatorischen MLC durch die Myosin-leichte-Kette-Kinase (*myosin-light-chain kinase*, MLCK) zu einer Gefäßverengung, die Dephosphorylierung der regulatorischen MLC durch die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (*myosin-light-chain phosphatase*, MLCP) zu einer Gefäßerweiterung. Nach Bindung von kontraktile Agonisten (z. B. Noradrenalin) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird eine Kontraktion über zwei Wege ausgelöst (**Abb. 3**). Auf der einen Seite wird durch die Aktivierung der G_{αq}-Untereinheit IP₃ (Inositol-1,4,5-Triphosphat) von der Membran freigesetzt, was wiederum zu Ca²⁺-Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und Aktivierung der MLCK durch Ca²⁺/Calmodulin (CaM) führt (rechter Signalweg in **Abb. 3**). Auf der anderen Seite wird über die G_{α12/13}-Untereinheit das kleine G-Protein RhoA aktiviert, was über Erhöhung der Aktivität der Rho-abhängigen Kinase (ROCK) zur Hemmung der MLCP führt (linker Signalweg in **Abb. 3**). cGKI induziert die Relaxation der VSMCs, indem

Einleitung

sie in beide Prozesse eingreift. cGKI β verhindert die IP₃-abhängige Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, indem sie IRAG (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate*) phosphoryliert (Schlossmann et al., 2000), cGKI α interagiert mit MLCP und aktiviert diese (Surks et al., 1999). Zusätzlich unterbricht cGKI α die Weiterleitung des Signals (**Abb. 3**) über Phosphorylierung und Inaktivierung von Rho-GTP (Sauzeau et al., 2000) und indirekt über Aktivierung von RGS2 (*regulator of G-protein signalling*), der die GTPase-Aktivität der G_{αq}-Untereinheit erhöht (Tang et al., 2003). Diese Forschungsergebnisse sind ein erster Schritt zur Aufklärung isoformspezifischer Funktionen der cGKI im glatten Muskel. Überraschenderweise, wies das Relaxationsverhalten der Glattmuskulatur von cGKI α - und cGKI β -*rescue*-Mäusen (s. auch A.1.2) keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollmäusen auf (Weber et al., 2007), was zeigt, dass keiner der beiden Wege essentiell für die Glattmuskelrelaxation ist. Der biologische Sinn der Expression beider Isoformen in den VSMCs bleibt also weiterhin unklar.

Eine weitere wichtige Rolle der cGKI, die nicht eindeutig geklärt ist, betrifft Langzeitprozesse in den VSMCs wie Zellproliferation, -migration und -dedifferenzierung, die mit der Entwicklung einer weit verbreiteten Gefäßerkrankung, der Atherosklerose, in Verbindung gebracht werden. Die Atherosklerose ist eine chronische Entzündung der Gefäßwand, die durch Ansammlung von LDL und anderen cholesterinhaltigen Makromolekülen in der subendothelialen Matrix und die anschließende Einwanderung von Makrophagen hervorgerufen wird (Ross, 1999). Die Ruptur dieser sog. Plaques führt zu Herzinfarkt und Schlaganfall, die zusammen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt ausmachen. Der Entzündungsprozess geht im späteren Stadium mit der phänotypischen Modulation der VSMCs in eine pathologische, dedifferenzierte Form und deren Migration in die Plaques einher (Ross, 1999). Es wurde lange angenommen, dass die NO/cGMP/cGKI Signalkaskade eine antiproliferative Wirkung auf diese Prozesse hat (Lincoln et al., 2001). Neuere Erkenntnisse lassen allerdings vermuten, dass die antiproliferative Wirkung höchstwahrscheinlich über cGKI-unabhängige Wege zustande kommt (Feil et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass die Adhäsion (das „Wachstum“) von VSMCs aus WT-Tieren in Primärzellkultur durch Zugabe von 8-Br-cGMP beschleunigt wird, während 8-Br-cGMP auf Zellen aus cGKI-Knockout-Tieren keine proliferationsfördernde Wirkung hat. Folglich muss die cGKI das Wachstum der glatten Muskelzellen eher anregen als bremsen (Feil et al., 2005). *In vivo* Studien mit ApoE-defizienten Mäusen, die ein etabliertes Mausmodell für die Atheroskleroseentwicklung sind (Zhang et al., 1992), unterstützen die Vermutung, dass cGKI einen proatherogenen Effekt hat, da die Kontrollmäuse signifikant größere atherosklerotische Plaques aufwiesen als die cGKI-defizienten Wurfgeschwister

(Wolfsgruber et al., 2003). Die Rolle der einzelnen Isoformen bei Gefäßerkrankungen ist dagegen weitgehend unbekannt.

Diese Erkenntnisse legen nahe, dass cGKI-Inhibitoren einen neuen Therapieansatz bei der Behandlung der Atherosklerose darstellen können. Zusätzlich werden potente isoformspezifische Inhibitoren gebraucht, um die Funktion der zwei Isoformen im glatten Muskel zu klären, deren isoformspezifisches proatherogenes Potential zu untersuchen und diesem möglicherweise gezielt entgegenzuwirken.

A.2. Pharmakologische Inhibitoren der cGKI

A.2.1. Vorhandene Inhibitoren

Derzeit werden zwei Klassen von cGKI-Modulatoren zur Untersuchung der cGKI benutzt. Die erste Klasse besteht aus Peptiden, die über Variation der Konsensussubstratsequenz (RRXS/TX bzw. RKXS/TX) und umgebender Aminosäuren in kombinatorischen Peptidbibliotheken entwickelt wurden (Dostmann et al., 2000). Die Peptide wurden mit der sog. Tat-Sequenz versehen, um Membrangängigkeit zu erzielen (s. A.3.). Die bekanntesten Inhibitoren sind DT-2 und DT-3, die im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht untersucht wurden. Die zweite Klasse umfasst ein breites Spektrum an cGMP-Analoga, deren Modifikationen am Guaninheterocyclus und am Phosphatrest eine höhere Membrangängigkeit bzw. eine erhöhte Stabilität gegenüber PDEs gewährleisten (Poppe et al., 2008; Schwede et al., 2000). Unter den cGMP-Analoga gibt es sowohl Aktivator als auch Inhibitoren (**Tab. 1**).

Tab. 1. Ausgewählte cGMP-Analoga mit ihren K_a - bzw. K_i -Werten und der relativen Lipophilität. Adaptiert nach (Poppe et al., 2008; Schwede et al., 2000).

Aktivatoren	cGKI α K_a [μ M]	cGKI β K_a [μ M]	Relative Lipophilität
cGMP	0,1	0,9	1
8-Br-cGMP	0,01	1	2,5
8-pCPT-cGMP	0,04	0,9	55
8-Br-PET-cGMP	0,01	0,01	115
Sp-8-pCPT-cGMPS	18	n.d.	n.d.
Sp-8-Br-PET-cGMPS	2,6	n.d.	n.d.
Inhibitoren	cGKI α K_i [μ M]	cGKI β K_i [μ M]	Relative Lipophilität
Rp-8-pCPT-cGMPS	0,5	0,45	68
Rp-8-Br-PET-cGMPS	0,04	0,03	115

8-Br-cGMP ist ein in Zellkulturstudien häufig benutzter Aktivator der cGKI. 8-pCPT-cGMP (pCPT) und 8-Br-PET-cGMP (PET) (**Abb. 4**) sind potente Aktivator (Sekhar

Einleitung

et al., 1992) mit einer viel ausgeprägteren Lipophilie im Vergleich zu 8-Br-cGMP. Die Substitution eines freien Sauerstoffs der Phosphatgruppe (Butt et al., 1990) von pCPT und PET durch Schwefel in der äquatorialen Ebene bezüglich des Riboserings liefert Inhibitoren der cGK [Rp-8-pCPT-cGMPS (Butt et al., 1994) bzw. Rp-8-Br-PET-cGMPS (Butt et al., 1995), kurz Rp-PET bzw. Rp-pCPT, zusammenfassend Rp-cGMPS], die gleiche Substitution in der axialen Ebene ergibt Aktivatoren (Sp-8-pCPT-cGMPS bzw. Sp-8-Br-PET-cGMPS, kurz Sp-cGMPS) (**Abb. 4**).

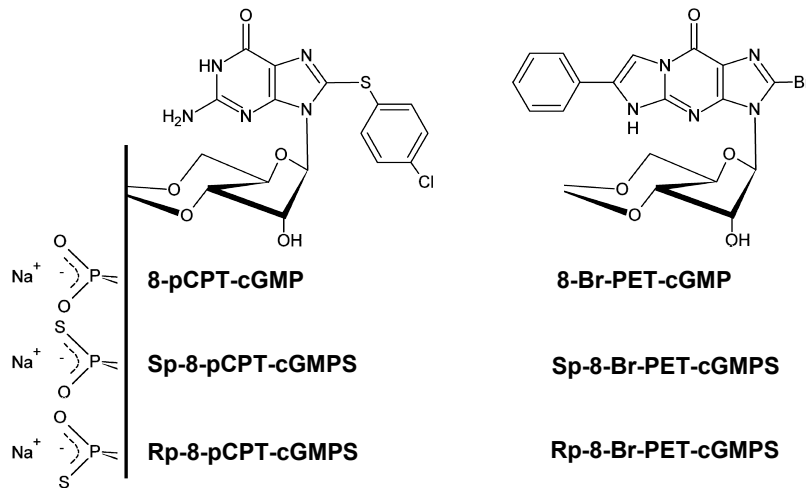


Abb. 4. Strukturformeln der cGMP-Analoga. pCPT und PET sind membrangängige cGMP-Analoga, die cGKI aktivieren. Durch Austausch eines freien Sauerstoffs der Phosphatgruppe durch Schwefel werden die Analoga unanfälliger gegen Abbau durch PDEs. Je nachdem ob der Schwefel axial (S-Konformation) oder äquatorial (R-Konformation) zum Ribosering steht, sind die cGMP-Analoga Aktivatoren (Sp-cGMPS) oder Inhibitoren (Rp-cGMPS) der cGKI.

Die Rp-cGMPS-Analoga wurden *in vitro* und in humanen Thrombocyten (Butt et al., 1994; Butt et al., 1995) getestet, aber bisher nicht in einem Zellkultursystem mit cGKI-defizienten Zellen zur Überprüfung der Spezifität. Oft erweisen sich Substanzen, die in ersten Experimenten vielversprechende pharmakologische Inhibitoren zu sein scheinen, bei einer genaueren Validierung als weniger spezifisch. Die umfassende Untersuchung des früher häufig benutzten „cGKI-Inhibitors“ KT5823 hat ergeben, dass dieser cGKI kaum hemmt, dagegen aber eine Reihe anderer Kinasen (Bain et al., 2003; Burkhardt et al., 2000). Wenn Substanzen, deren Wirkung und Spezifität nicht ausreichend untersucht worden sind, zur Hemmung der cGKI in intakten Zellen eingesetzt werden, kann dies zu Fehlinterpretation der Ergebnisse und letztlich zu falschen Modellen führen. Die ausführliche Validierung der zwei Rp-cGMPS Analoga in dieser Arbeit wurde durch die Tatsache veranlasst, dass diese das cGKI-vermittelte Wachstum der VSMCs in Zellkulturexperimenten (Weinmeister, 2006) nicht zu hemmen vermochten.

A.2.2. Neue Ansätze

Die gegenwärtig vorhandenen Inhibitoren der cGKI sind auf das aktive Zentrum oder auf die regulatorische Domäne ausgerichtet. Dadurch wird eine Erniedrigung der Kinaseaktivität, also des Substratumsatzes, angestrebt. Da die Substratbindungstaschen vieler Kinasen eine hohe Homologie aufweisen und es mindestens noch zwei Proteinklassen gibt, die auch cGMP-Bindungsstellen besitzen (PDEs, CNGs), ist die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Effekte bei den genannten Strategien sehr hoch. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch Hemmung der regulatorischen oder katalytischen Domäne automatisch beide Isoformen der cGKI betroffen sind, da dieser Bereich bei beiden identisch ist. Zur Aufklärung der isoformspezifischen Funktion der cGKI in der glatten Gefäßmuskulatur sind aber potente isoformspezifische Inhibitoren nötig. Nachdem berichtet wurde, dass cGKI proatherogenes Potential besitzt, sollte als nächstes überprüft werden, welcher der zwei Isoformen dieser Effekt zuzuordnen ist. Die einzige Region, die isoformspezifisch manipuliert werden kann, ist der N-terminale Bereich (**Abb. 1A**). Eine verlockende Angriffsstelle für das Design neuer Inhibitoren ist der Leucin-Zipper. Dieser ist für die spezifische Homodimerisierung der Isoformen zuständig, d. h. es können keine Heterodimere aus einer cGKI α und einer cGKI β Untereinheit gebildet werden (M. Hillenbrand, persönliche Mitteilung). Zusätzlich bestimmt der Leucin-Zipper die subzelluläre Lokalisation der Kinase (Casteel et al., 2008; Feil et al., 2002) und die Bindung an Interaktionspartner und Substrate (Ammendola et al., 2001; Casteel et al., 2005; Surks and Mendelsohn, 2003). Durch die Zugabe des rekombinant hergestellten α - oder β -N-Terminus oder nur der Leucin-Zipper-Region (als synthetische Peptide) könnte nach einem dominant-negativen Prinzip die Funktion der Kinase isoformspezifisch herunterreguliert werden, ohne dass unbedingt die Kinaseaktivität beeinträchtigt werden muss (Browning et al., 2001). Um diese neuen „Werkzeuge“ in Zellen und später auch in Tieren verwenden zu können, sollten sie Biomembranen durchdringen können. Zu diesem Zweck kann die Tat-Sequenz (s. A.3), die schon in Zusammenhang mit DT-2 erwähnt wurde (A.2.1.), rekombinant oder synthetisch an die gewünschte Protein- bzw. Peptidsequenz angehängt werden.

A.3. Die Proteintransduktion

Bis vor kurzem wurde die externe Zugabe von Polypeptiden auf Zellen für unmöglich gehalten, da diese die Biomembranen nicht ohne weiteres passieren können. Diese Annahme wurde durch die Entdeckung von kurzen zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) aufgehoben, die Nukleotide, Peptide, Proteine, Lipide und diverse synthetische Moleküle über Biomembranen transportieren können. Die CPPs sind

Einleitung

kurze synthetische Peptide oder Sequenzen aus natürlich vorkommenden Proteinen verschiedener Spezies, von denen die gängigsten in **Tab. 2** zusammengefasst sind. Die in der vorliegenden Arbeit benutzte CPP-Sequenz schließt 12 Aminosäuren des Tat-Fragments (48-59) ein, das vom Tat-Protein des HIV stammt und sehr stark positiv geladen ist (GRKKRRQRRRPP). Die erfolgreiche Beförderung von Tat-gekoppelten Proteinen in Primärzellkultur (Peitz et al., 2002) oder gar in der Maus (Fawell et al., 1994) wurde bereits beschrieben. Die Möglichkeit Makromoleküle über biologische Membranen zu transportieren eröffnet somit u. a. neue Perspektiven bei der Herstellung von Therapeutika.

Der Mechanismus, über den die Peptide mit derer Fracht in die Zelle gelangen, ist noch umstritten. Ursprünglich wurde vermutet, dass die Peptide energieunabhängig direkt die Membrandoppelschicht durchqueren und dass die Proteintransduktion der verschiedenen CPPs möglicherweise verschiedenen Mechanismen unterliegt (Schwarze et al., 2000). Viele Messungen der Internalisierungskinetik wurden jedoch durch Artefakte verfälscht, die von der starken Bindung von CPPs an die Zelloberfläche herrühren (Richard et al., 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Tat-vermittelte Proteintransduktion auf eine Lipidraft-abhängige Makropinocytose zurückzuführen ist und dass das Tat-gekoppelte Frachtprotein zunächst in Makropinosomen eingeschlossen ist (Wadia et al., 2004). Letztere fusionieren im Gegensatz zu den frühen Endosomen nicht mit den Lysosomen und sind im Vergleich zu anderen Vesikeln „undichter“. Das Verlassen der Makropinosomen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteintransduktion und nicht vollständig geklärt. Chloroquin und andere vesikelzerstörende Substanzen beschleunigen die Freisetzung der zu transduzierenden Proteine aus den Makropinosomen.

Tab. 2. Einige häufig eingesetzte zellpenetrierende Peptide. Adaptiert nach (Lindgren et al., 2000).

Name	Sequenz	Herkunft
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	Aus dem Homöoprotein Antennapedia (Drosophila)
Tat-Fragment (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	Aus dem transkriptionsaktivierenden Faktor Tat (HIV)
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Synthetisches Peptid
Amphiphilisches Modelpeptid	KLALKLALKALKAAALKLA	Synthetisches Peptid

A.4. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die zurzeit als potente cGKI-Inhibitoren benutzten cGMP-Analoga (Rp-pCPT und Rp-PET) in Zellkulturexperimenten mit primären VSMCs und *in vitro* näher untersucht und ihre Wirkung validiert werden.

Zusätzlich sollten erste Schritte zur Etablierung isoformspezifischer Inhibitoren der cGKI gemacht werden. Dazu sollten die N-terminalen Domänen von cGKI α und β rekombinant exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden. Anschließend sollte *in vitro* und in Zellkulturexperimenten ihre Wirkung auf gereinigte cGKI bzw. ihre Wirkung auf bekannte cGKI-vermittelte Prozesse mit Augenmerk auf ihre Spezifität und Effizienz untersucht werden.

B. Material und Methoden

B.1. Materialien

B.1.1. Materialien, Chemikalien und Geräte

Alle Chemikalien, wenn nicht anders vermerkt, wurden von der Fa. *Carl Roth* bezogen. Bei der Lagerung aller Chemikalien und Lösungen wurden die Herstellerangaben berücksichtigt. Sie erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei RT. Eine Auflistung aller verwendeten Geräte, Materialien und Fertiglösungen, sowie die nicht über *Carl Roth* bezogenen Chemikalien, findet sich im Anhang (F.5, F.7). Lösungen wurden in deionisiertem, filtriertem Wasser („MilliQ“) hergestellt, sofern nichts anderes angegeben ist. Prozentangaben beziehen sich bei Feststoffen auf deren Gewichtsanteil (w/v), bei Flüssigkeiten auf deren Volumenanteil (v/v). Der angegebene pH-Wert von selbsthergestellten Lösungen wurde mit 1 N NaOH oder 1 N HCl eingestellt, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben.

B.1.2. Allgemeine Lösungen und Puffer

SDS-Stammlösung		
SDS	10%	10 g
H ₂ O		ad. 100 ml
DTT-Stammlösung		
DTT	1 M	1,5 g
H ₂ O		ad. 10 ml
→ lagern bei -20°C		
PMSF	0,1 M	0,17 g
100% Ethanol		ad. 10 ml
→ lagern bei -20°C		
Leupeptin	1 mg/ml	5 mg
100% Ethanol		ad. 5 ml
→ lagern bei -20°C		
PBS , pH 7,4		
NaCl	135 mM	4 g
KCl	3 mM	100 mg
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	8 mM	710 mg
KH ₂ PO ₄	2 mM	120 mg
H ₂ O		ad. 500 ml
→ autoklavieren		
EDTA, pH 8,0		
EDTA x 2H ₂ O	0,5 M	186,1 g
H ₂ O		800 ml
→ pH 8,0 einstellen mit NaOH (Plättchen)		≈ 20 g
→ EDTA löst sich erst bei pH 8,0		
H ₂ O		ad. 1 l
→ autoklavieren		

Material und Methoden

Molekularbiologische Methoden

10x TE-Puffer, pH 8,0

Tris-HCl, pH 8,0 (1 M)	0,1 M	50 ml
EDTA, pH 8,0 (0,5 M)	10 mM	10 ml
H ₂ O		ad. 500 ml (+ 440 ml)
→ autoklavieren		

10x RT-Puffer

KCl (1 M)	500 mM	5 ml
Tris-HCl, pH 8,0 (1 M)	100 mM	1 ml
MgCl ₂ (1 M)	15 mM	150 µl
dNTPs (100 mM)	je 2 mM	200 µl
H ₂ O autoklaviert		ad. 10 ml (+ 3,65 ml)
→ lagern bei -20°C		

Primer (s. F.2)

Primer x (100 pmol/µl)	25 pmol/µl	25 µl
H ₂ O autoklaviert		ad. 100 µl (+ 75 µl)
→ lagern bei -20°C		

Puffer S1, pH 8,0

Tris-HCl, pH 8,0 (1 M)	50 mM	50 ml
EDTA, pH 8,0 (0,5 M)	10 mM	20 ml
H ₂ O		ad. 1 l

Puffer S2

NaOH (1 M)	200mM	200 ml
SDS (10%)	1%	100 ml
H ₂ O		ad. 1 l

Puffer S3, pH 5,1

K-Acetat	2,8 M	274,8 g
H ₂ O		ad. 1 l
→ pH mit 1M KOH einstellen		

Puffer N2, pH 6,3

Tris	100 mM	12,1 g
Ethanol	15%	150 ml
KCl	900 mM	67,1 g
Triton X-100	0,15%	1,5 ml
H ₂ O		ad. 1 l
→ pH mit H ₃ PO ₄ einstellen		

Puffer N3, pH 6,3

Tris	100 mM	12,1 g
Ethanol	15%	150 ml
KCl	1,5 M	111,8 g
→ pH mit H ₃ PO ₄ einstellen		

Puffer N5, pH 8,5

Tris	100 mM	12,1 g
Ethanol	15%	150 ml
KCl	1 M	74,6 g
→ pH mit H ₃ PO ₄ einstellen		

10x TBE-Puffer

Tris	0,5 M	108 g
Borsäure	0,5 M	55 g
EDTA, pH 8,0 (0,5 M)	10 mM	20 ml

Material und Methoden

H ₂ O		ad. 1 l
Na-Acetat, pH 5,5		
NaAc	3 M	24,6 g
H ₂ O		ad. 100 ml
70% Ethanol		
Ethanol p.a.		70 ml
H ₂ O		ad. 100 ml (+ 30 ml)
1 oder 2% Agarose-Gele		
Agarose (<i>Biozym</i>)	1 bzw. 2%	1g bzw. 2 g
Ethidiumbromid (1%)	0,0005%	5 µl
1 TBE-Puffer		ad. 100 ml
6x Ladepuffer für DNA		
Bromphenolblau	0,25%	25 mg
Xylencyanol	0,25%	25 mg
Glycerol	30%	3 ml
H ₂ O		ad. 10 ml (+7 ml)
→ lagern bei 4°C		
DNA-Längenstandard (1 kb ladder)		
1 kb ladder (1 µg/µl)	29 ng/µl	250 µl
1x Ladepuffer		ad. 8500 µl (+8250 µl)
→ lagern bei 4°C		
 <u>Zellkultur</u>		
Serumfreies DMEM		
DMEM (<i>Gibco</i>)		500 ml
Pen/Step (10 000 U bzw. 10 000 µg/ml, <i>Gibco</i>)	100 U bzw. 100 µg/ml	5 ml
→ lagern bei 4°C		
DMEM/FCS		
Serumfreies DMEM		505 ml
hitzeinaktiviertes FCS (<i>Gibco</i>)	10%	50 ml
→ lagern bei 4°C		
Ca²⁺-freies Medium, pH 7,4		
Na-L-Glutamat Monohydrat (<i>Merck</i>)	85 mM	15,91 g
NaCl	60 mM	3,5 g
HEPES	10 mM	2,38 g
KCl	5,6 mM	0,42 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM	0,20 g
H ₂ O		ad. 1 l
→ autoklavieren, lagern bei 4°C		
BSA	100 mg/ml	500 mg
Ca ²⁺ -freies Medium		ad. 5 ml
→ Lagerung bei -20°C		
DTT	100 mg/ml	500 mg
Ca ²⁺ -freies Medium		ad. 5 ml
→ Lagerung bei -20°C		
Cell fix		
Formaldehyd (37%)	2%	27 ml
Glutaraldehyd (25%)	0,2%	4 ml
PBS		ad. 500 ml (+469 ml)

Material und Methoden

Toluidinblau-Färbelösung

Toluidinblau (<i>Sigma</i>)	0,5%	250 mg
Cell fix		ad. 50 ml
→ lagern bei 4°C		

Insektenmedium

Medium Grace's Insect Medium supplemented (1x), liquid (<i>Gibco</i>)		500 ml
Pen/Step (10 000 U bzw. 10 000 µg/ml, <i>Gibco</i>)	100 U bzw. 100 µg/ml	5 ml
hitzeinaktiviertes FCS, (<i>Gibco</i>)	10%	50 ml
Für Suspensionskulturen		
Pluronic F-68 (10%, <i>Gibco</i>)	0,05%	2,5 ml
→ lagern bei 4°C		

Bakterienkultur

LB - Flüssigmedium

LB-Pulver (Lennox)	2%	20 g
(enthält 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl)		
H ₂ O		ad. 1 l
→ autoklavieren, lagern bei 4°C		
evtl. +Kan, Amp		1 ml

LB-Festmedium

LB-Agar (Lennox)	3,5%	35 g
(enthält 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar)		
H ₂ O		ad. 1 l
→ autoklavieren		
evtl. +Kan, Amp		1 ml
→ In Petrischalen gießen, lagern bei 4°C		

Kanamycin (Kan)

	50 mg/ml	500 mg
H ₂ O		ad. 10 ml
→ lagern bei -20°C		

Ampicillin (Amp)

	100 mg/ml	1 g
H ₂ O		ad. 10 ml
→ lagern bei -20°C		

IPTG-Induktionslösung

IPTG	1 M	2,38 g
H ₂ O		ad. 10 ml
→ lagern bei -20°C		

Proteinbiochemische Methoden

Phosphatpuffer, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	7,8 g
NaCl	300 mM	17,54 g
H ₂ O		ad. 1 l

Phosphatpuffer A (Waschpuffer), pH 7,4

Imidazol	20 mM	0,68 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	3,9 g
NaCl	300 mM	8,77 g
H ₂ O		ad. 500 ml

Material und Methoden

Phosphatpuffer B (Elutionspuffer), pH 7,4

Imidazol	250 mM	8,5 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	3,9 g
NaCl	300 mM	8,77 g
H ₂ O		ad. 500 ml

Phosphatpuffer C, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	3,9 g
NaCl	1 M	29,2 g
H ₂ O		ad. 500 ml

Phosphatpuffer D

NaN ₃	0,05%	25 mg
Phosphatpuffer		ad. 50 ml

Phosphatpuffer E, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	3,9 g
NaCl	100 mM	2,92 g
H ₂ O		ad. 500 ml

Bradford

Coomassie Brilliant Blue G250	114 mM	100 mg
EtOH	5%	50 ml
H ₂ O		ad. 900
85% H ₃ PO ₄	8,5%	100 ml
ÜN rühren, so oft filtern (Faltenfilter), bis die OD ₅₉₅ konstant bleibt (0,35-0,4)		
→ lagern im Dunkeln		

4x SDS-Proteinprobenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8 (1 M)	200 mM	2 ml
Glycerol	40%	4 ml
SDS	8%	0,8 g
DTT	400 mM	0,62g
Bromphenolblau (1%)	0,01%	100 µl
H ₂ O		ad. 10 ml
→ lagern bei -20°C		

Bromphenolblau

	1%	50 mg
H ₂ O		ad. 5 ml

4x Tris/SDS (pH 8,8)

Tris	1,5 M	18,2 g
SDS	0,4%	0,4 g
H ₂ O		ad. 100 ml
→ lagern bei 4°C		

4x Tris/SDS (pH 6,8)

Tris	0,5 M	3,02 g
SDS	0,4%	0,2 g
H ₂ O		ad. 50 ml
→ lagern bei 4°C		

10x SDS-Laufpuffer

Tris	250 mM	15,1 g
Glycin	2 M	72,0 g
SDS	1%	5,0 g
H ₂ O		ad. 500 ml

10x Anoden-Laufpuffer für Tricin-Gele, pH 8,9

Tris	2 M	121,1 g
H ₂ O		ad. 500 ml

Material und Methoden

10x Kathoden-Laufpuffer für Tricin-Gele pH 8,25 (nicht einstellen!)

Tris	1 M	30,3 g
Tricin	1 M	44,8 g
SDS	1%	2,5 g
H ₂ O		ad. 250 ml

Gelpuffer für Tricin-Gele, pH 8,45

Tris	3 M	36,3 g
SDS	0,3%	0,3 g
H ₂ O		ad. 100 ml
→ lagern bei 4°C		

24,25% Acrylamid/0,75% Bisacrylamid

40% Acrylamidlösung	24,25%	40 ml
Bisacrylamid	0,75%	0,495 g
H ₂ O		ad. 66 ml
→ lagern bei 4°C		

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R250		2,5 g
→ Erst Methanol und H ₂ O mischen		
Methanol		500 ml
H ₂ O		400 ml
Essigsäure		100 ml

Coomassie-Entfärber

Techn. Methanol	10%	100 ml
Isopropanol	10%	100 ml
Essigsäure	10%	100 ml
H ₂ O		ad. 1 l (+ 700 ml)

Anodenlösung I, pH 10,4

Tris	300 mM	36,3 g
Techn. Methanol	20%	200 ml
H ₂ O		ad. 1000 ml

Anodenlösung II, pH 10,4

Tris	30 mM	3,03 g
Techn. Methanol	20%	200 ml
H ₂ O		ad. 1000 ml

Kathodenlösung, pH 7,6

Tris	30 mM	3,03 g
Techn. Methanol	20%	200 ml
ε-Aminohexansäure	40 mM	5,2 g
H ₂ O		ad. 1000 ml

10xTBS (pH 8,0)

Tris	100 mM	12,11 g
NaCl	1,5 M	87,66 g
H ₂ O		ad. 1000 ml

1xTBS-T

10x TBS		100 ml
Tween	0,1%	1 ml
H ₂ O		ad. 1000 ml

Material und Methoden

Luminol

Luminol (<i>Sigma</i>)	0,3%	600 mg
Tris/HCl, pH 8,5	100 mM	ad. 200 ml
→ lagern bei 4°C im Dunkeln		

Enhancer

p-Hydroxycumarinsäure (<i>Sigma</i>)	0,11%	110 mg
DMSO		ad. 100 ml

Kinase-Assay

5xMES, pH 6,9

MES	250 mM	4,88 g
EGTA	2 mM	0,08 g
Mg-Acetat x 4H ₂ O	5 mM	0,1 g
NaCl	50 mM	0,3 g
H ₂ O		ad. 100 ml
→ lagern bei -20°C		

BSA

H ₂ O	1%	0,1 g
→ lagern bei -20°C		

DTT (1M)

H ₂ O	100 mM	200 µl
→ lagern bei -20°C		

Substratpeptid

GRTGRRNSI-NH ₂	0,4 mM	10 mg
H ₂ O		ad. 25 ml
→ lagern bei -20°C		

ATP

H ₂ O	20 mM	5,5 mg
→ lagern bei -20°C		

B.1.3. Plasmide, Oligonukleotide und Baculoviren

Die wichtigsten für die Klonierung eingesetzten Plasmide, die als Aliquots (1 µg/µl) bei -20°C aufbewahrt wurden, sind im Anhang (F.2, **Tab. 15**) aufgeführt.

Die sowohl für die Genotypisierung-PCR, als auch für die Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Fa. *MWG Biotech* nach der Phosphoramidit-Methode (Caruthers et al., 1983) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer der Reinheitsstufe HPSF wurden in H₂O zu 100 pmol/µl gelöst. Alle in der Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang (F.2, **Tab. 16**) zusammengefasst.

Für die standardmäßige Expression der cGKI-Isoformen wurden Sf9-Zellen mit den unter F.2 (**Tab. 17**) aufgeführten Baculoviren infiziert.

B.1.4. Antikörper

Die Stammlösungen der eingesetzten primären Antikörper (F.3, **Tab. 18**) wurden bei 4°C oder bei -20°C gelagert. Für die Western Blot-Analyse wurden sie in 50 ml-Plastikröhrchen mit 10 ml TBS-T, 5% BSA und 0,05% NaN₃ verdünnt und mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt. Die sekundären Antikörper (F.3, **Tab. 19**) wurden direkt vor der Inkubation in 1% Milchpulver in TBS-T verdünnt und nur einmal verwendet.

B.2. Verwendete Organismen und Zellsysteme

B.2.1. Mausezucht – Linien, Haltung und Genotypisierung

Der für die Isolierung von VSMCs benutzte Mausstamm war Sv129 (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried). Es wurden verschiedene cGKI-Mausmutanten verwendet (**Tab. 3**). Als „WT“-VSMCs werden alle cGKI-WT-exprimierenden Zellen (sowohl +/+ als auch +/L1) bezeichnet.

Tab. 3. Verwendete cGKI-Mutanten.

Linie	Genotyp	cGKI-Expression	Bezeichnung	Referenz
L1	L1/L1	Globale Nullmutante	Knockout	(Wegener et al., 2002)
	+/L1	Wildtypverteilung	Kontrolle	(Wegener et al., 2002)
SMI α x cGKI	+/- L1/L1	cGKI α vom SM22 α -Genlocus, endogene cGKI – globale Nullmutante	Glattmuskel- α - <i>rescue</i>	(Weber et al., 2007)
	+/- +/L1	cGKI α vom SM22 α -Genlocus, endogene cGKI – Wildtypverteilung	Glattmuskel- α -Überexprimierer	(Weber et al., 2007)
	+/+ +/L1	Wildtypverteilung	Kontrolle	s. +/L1
SMI β x cGKI	+/- L1/L1	cGKI β vom SM22 α -Genlocus, endogene cGKI – globale Nullmutante	Glattmuskel- β - <i>rescue</i>	(Weber et al., 2007)
	+/- +/L1	cGKI β vom SM22 α -Genlocus, endogene cGKI – Wildtypverteilung	Glattmuskel- β -Überexprimierer	(Weber et al., 2007)
	+/+ +/L1	Wildtypverteilung	Kontrolle	s. +/L1

Die Mäuse wurden im Tierstall des Interfakultären Instituts für Biochemie den Anforderungen entsprechend gehalten. Es wurden bis zu 3 adulte Tiere in einem Typ II Makrolon Käfig und bis zu 8 adulte Tiere in einem Typ III Makrolon Käfig untergebracht und mit Trinkwasser und Futter (Altromin 1314) *ad libidum* versorgt. Zur Zucht wurden zwei Weibchen im gebärfähigen Alter (8-45 Wochen) mit einem Männchen (7-80 Wochen) zusammengesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von 3 Wochen durch PCR-Analyse der DNA aus einer Ohrbiopsie genotypisiert, im Alter

Material und Methoden

von 4 Wochen von den Müttern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Die Ohrbiopsie wurde lysiert, um Maus-DNA zu gewinnen, die anschließend zur Genotypisierung der Tiere über PCR eingesetzt wurde.

1. Reaktionsgefäße mit Mausgewebe 1 min bei 20 000 x g zentrifugieren.
2. Entweder Mausgewebe bei -20°C lagern oder gleich folgenden Ansatz pro Biopsie als Mastermix zusammenpipettieren (DNA-Lysepuffer):
 - ❖ 10x Taq-Puffer (-MgCl₂; *Peqlab*) 5 µl
 - ❖ MgCl₂ (25 mM; *Peqlab*) 1,5 mM 3 µl
 - ❖ Proteinase K (50 mg/ml) 1mg/ml 1 µl
 - ❖ H₂O autoklaviert ad. 50 µl (+ 41 µl)
3. 50 µl Lysepuffer zu jeder Biopsie pipettieren und ÜN (mind. 4 h) bei 55 °C inkubieren.
4. Reaktionsgefäße mit lysiertem Mausgewebe 2 min bei 20 000 x g zentrifugieren, Überstand vorsichtig abnehmen und in autoklavierte PCR-Reaktionsgefäße überführen.
5. Die PCR-Reaktionsgefäße auf 95°C für 15 min erhitzen, um die Proteinase K zu inaktivieren.
6. Die gewonnene genomische DNA bei -20°C aufbewahren oder gleich 2 µl davon für die PCR (s. u.) einsetzen.

Für die Genotypisierung der Mäuse wird eine Variante der PCR benutzt, bei der mit Hilfe von 3 (statt 2) gleichzeitig eingesetzten Primern, sowohl das Wildtyp- als auch das genetisch veränderte Allel detektiert werden kann. Dies schließt die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse aus, da auch wenn beide Allele die Wildtypsequenz aufweisen, ein PCR-Produkt zu erwarten ist. Näheres über das allgemeine Prinzip der PCR und der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA ist unter B.3.1 bzw. B.3.1.1 der molekularbiologischen Methoden zu finden.

Tab. 4. PCR zur Genotypisierung der Mäuse. Primer, PCR-Programm und Länge der erwarteten Fragmente.

PCR	Primer	PCR-Programm	Fragmente
cGKI (L1)	RF53 (cGKI WT vorwärts) RF118 (cGKI ko rückwärts) RF125 (cGKI WT rückwärts)	95°C 5 min 95°C 10 s 50°C 30 s 72°C 30 s 72°C 5 min	35x WT: 284 bp L1: 250 bp
SMI α	RF67 (SM22 α WT vorwärts) RF90 (SM22 α WT rückwärts) SW12 (cGKI α ki rückwärts)	95°C 5 min 95°C 10 s 61°C 30 s 72°C 30 s 72°C 5 min	35x WT: 276 bp SMI α : 183 bp
SMI β	RF67 (SM22 α WT vorwärts) RF90 (SM22 α WT rückwärts) SW8 (cGKI β ki rückwärts)	95°C 5 min 95°C 10 s 61°C 30 s 72°C 30 s 72°C 5 min	35x WT: 276 bp SMI β : 195 bp

Material und Methoden

1. 2 µl der genomischen Maus-DNA in PCR-Reaktionsgefäße vorlegen.
2. PCR-Maschine auf 95°C vorheizen lassen.
3. Folgenden Ansatz pro PCR-Probe als Mastermix zusammenpipettieren:

❖ 10xRT-Puffer		2,5 µl
❖ Primer A ¹ (25 pmol/µl)	0,3 pmol/µl	0,3 µl ²
❖ Primer B (25 pmol/µl)	0,3 pmol/µl	0,3 µl
❖ Primer C (25 pmol/µl)	0,3 pmol/µl	0,3 µl
❖ H ₂ O autoklaviert		ad. 22,8 µl (+19,4 µl)
❖ Taq-Polymerase (5 u/µl, <i>Peqlab</i>) ¹ u		0,2 µl
4. 23 µl des Master-Mixes zu der vorgelegten DNA geben.
5. PCR-Ansätze in die PCR-Maschine stellen und nach Ablauf des Programms mit 6x Ladepuffer versetzen, auf 2%-ige Agarosegele (*Biozym*) auftragen und über Gelelektrophorese (≈ 30 min bei 150 V; s. B.3.1.1) auftrennen. DNA-Banden unter dem UV-Illuminator visualisieren und dokumentieren. Die Längen der erwarteten Fragmente sind in **Tab. 4** zusammengefasst.

B.2.2. Zellkultur von VSMCs der Maus

Um die Funktion der cGKI bei proliferativen Prozessen der glatten Gefäßmuskulatur zu untersuchen, eignen sich primär isolierte VSMCs aus Mausearten, da diese den Verhältnissen *in vivo* relativ nahe kommen. Ein zusätzlicher Vorteil ist die Möglichkeit, Zellen aus verschiedenen cGKI-Mausmutanten (cGKI-Knockout, cGKI-Glattmuskel-*rescue*) zu isolieren, um diese mit den Kontrollzellen zu vergleichen. Die Verwendung von passagierten Maus-VSMCs ist zu vermeiden, da diese Zellen anders, gar gegensätzlich auf cGMP-Behandlung reagieren als frisch isolierte (Weinmeister et al., 2008). Alle Wachstumsexperimente im Rahmen dieser Arbeit wurden mit frisch isolierten VSMCs aus Mausearten durchgeführt. DMEM, FCS, Pen/Strep und Trypanblau für die Zellkultur wurden von *Gibco* bezogen.

B.2.2.1. Isolierung und Aussäen von VSMCs aus Mausearten

Isolierung von VSMCs

1. Mäuse mit CO₂ betäuben, Aorten explantieren und in eine Petrischale mit PBS legen.
2. Aorten von dem umschließenden Bindegewebe unter Binokular freipräparieren.
3. Folgende Lösungen je nach Anzahl der Aorten (1 ml für 1-6 Aorten; 1,5 ml für 7-11 Aorten; 2 ml für 12-15 Aorten) unter Sterilbank herstellen:

¹ Die je nach Mauslinie verwendete Primerkombination (A+B+C) ist in **Tab. 4** zu finden.

² Eine Ausnahme macht der Primer RF118, von dem 0,2 µl (Endkonzentration 0,2 pmol/ µl) eingesetzt werden.

Material und Methoden

Enzymlösung A

❖ Papain (7 mg/ml, <i>Sigma</i>)	0,7 mg/ml	100 µl
❖ DTT (100 mg/ml)	1 mg/ml	10 µl
❖ BSA (100 mg/ml)	1 mg/ml	10 µl
❖ Ca ²⁺ -freies Medium		ad. 1 ml (+880 µl)

➔ Sterilfiltrieren durch Filter mit Porendurchmesser von 0,2 µm

Enzymlösung B

❖ Hyaluronidase (10 mg/ml, <i>Sigma</i>)	1 mg/ml	100 µl
❖ Kollagenase (10 mg/ml, <i>Sigma</i>)	1 mg/ml	100 µl
❖ BSA (100 mg/ml)	1 mg/ml	10 µl
❖ Ca ²⁺ -freies Medium		ad. 1 ml (+790 µl)

➔ Serilfiltrieren durch Filter mit Porendurchmesser von 0,2 µm

➔ bei 4°C aufbewahren

4. Aorten in ein Reaktionsgefäß mit Enzymlösung A überführen.
5. 45 min bei 37°C (Wasserbad) verdauen, dabei alle 10 min invertieren.
6. Reaktionsgefäße mit den Aorten bei 250 x g 2 min zentrifugieren, währenddessen Enzymlösung B auf 37°C vorwärmen.
7. Überstand verwerfen und Enzymlösung B auf die Aorten pipettieren.
8. 12-15 min bei 37°C (Wasserbad) verdauen, ab der 5. Minute alle 2 min mit der 1000er Pipette resuspendieren. Die Flüssigkeit wird trüb und die Aortenreste verschwinden. (Währenddessen 10 ml DMEM+10% FCS in ein 15 ml Röhrchen vorlegen).
9. Zellsuspension in die 10 ml DMEM +10% FCS überführen und bei 200 x g abzentrifugieren.
10. Zellpellet in 1-3 ml DMEM+10% FCS resuspendieren (so dass die Zellsuspension ca. 1×10^6 Zellen/ml aufweist. Als Richtwert werden pro Aorta $2-3 \times 10^5$ Zellen gewonnen).
11. Nach mehrmaligem Resuspendieren 45 µl entnehmen und mit 5 µl Trypanblau versetzen (zur Färbung der toten Zellen). Ca. 5 µl für die Zellzahlbestimmung auf die Neubauer-Zählkammer geben.
12. Vier Kleinquadrate (je aus 16 Kleinstquadraten bestehend) mit $V = 0,1 \mu\text{l}$ auszählen, Mittelwert bilden und die Zellausbeute bestimmen. Zellen = Zellzahl (Mittelwert) $\times 10^4 \times$ Gesamtvolumen in ml.
13. Zellen mit DMEM+10% FCS auf 250 000 Zellen/ml einstellen.

Aussäen von VSMCs für Wachstumsexperimente

1. Pro 96-Lochplatte (flacher Boden) werden 25 000 Zellen/Loch (in Endvolumen 200 µl) ausgesät. Mindestens 4 Löcher (am besten 8) pro Bedingung einplanen.
2. Substanzen (8-Br-cGMP, Rp-PET, *Biolog* oder HT-Iβ-N) in DMEM+10% FCS+Pen/Strep verdünnen. Die Konzentration der Substanzen soll das Doppelte der für den Versuch nötigen Endkonzentration betragen, da beim Aussäen diese 1:2 durch die Zugabe der Zellsuspension

Material und Methoden

verdünnt werden, z. B. soll für eine Endkonzentration von 0,1 mM 8-Br-cGMP die Konzentration im Reaktionsgefäß 0,2 mM sein.

3. 100 µl DMEM+10% FCS+Pen/Strep (± Substanzen) pro 96-Loch pipettieren. Erste Reihe frei lassen (als Leerwert bei der photometrischen Auswertung des Wachstums, s. u.).
4. 100 µl der Zellsuspension mit einer 8-Kanal-Pipette auf die 96-Lochplatte verteilen.
5. Zellen im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (6% CO₂) 72 h anwachsen lassen.

Aussäen von VSMCs für VASP-Phosphorylierung

1. Pro 6-Lochplatte werden 125 000 Zellen/Loch (in Endvolumen 3 ml) ausgesät. Pro Bedingung sollten am besten Doppelwerte angesetzt werden.
2. Pro Loch 2,5 ml DMEM+10% FCS+Pen/Strep vorlegen und 0,5 ml Zellsuspension zugeben.
3. VSMCs bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (6% CO₂) 7 Tage inkubieren (am Tag 3 ein Mediumwechsel durchführen), bis die Zellen eine Konfluenz von 80 - 90% erreichen.
4. Zellen serumfrei stellen (DMEM) und bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (6% CO₂) weitere 2 Tage inkubieren.

B.2.2.2. Induktion der VASP-Phosphorylierung

1. Substanzen (Rp-PET, *Biolog* oder HT-Iβ-N) in serumfreiem DMEM+Pen/Strep auf die Endkonzentration verdünnen.
2. Medium absaugen und das mit Substanzen versetzte serumfreie DMEM+Pen/Strep auf die Zellen geben.
3. 30 min im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (6% CO₂) inkubieren.
4. In die entsprechenden Löcher die berechnete 8-Br-cGMP Menge cGMP zugeben, so dass die Endkonzentration (0,1 oder 1 mM) erreicht wird.
5. 30 min im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (6% CO₂) inkubieren.

6. Währenddessen SDS-Lysepuffer vorbereiten:

❖ 1M Tris/HCl pH 8,3	21 mM	210 µl
❖ SDS, 10%	0,67%	670 µl
❖ β-Mercaptoethanol (Abzug!)	1,7%	170 µl
❖ PMSF (100 mM)	0,2 mM	20 µl
❖ H ₂ O		ad. 10 ml

7. Puffer immer frisch herstellen, PMSF kurz vor Zugabe erwärmen, Rest als Kontrollwert für die Proteinbestimmung aufbewahren.
8. Zellen zweimal mit PBS waschen und 500 µl Lysepuffer pro Loch verteilen. Zelllysat resuspendieren und in Reaktionsgefäße überführen.
9. 10 min bei 95°C denaturieren. Kurz abzentrifugieren. Anschließend eine Proteinbestimmung (B.5.5) durchführen (optional), um die Ladung anzugleichen, und Proben durch Proteinfällung

(B.5.6) dreifach konzentrieren (optional). Im Normalfall (wenn die Zellen in allen Löchern gleich gewachsen sind) werden die Proben direkt mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt (Probenvolumen/3 = nötiges Volumen) und für die SDS-PAGE (B.5.7) verwendet.

B.2.2.3. Bestimmung der Anzahl adhärenter VSMCs (Wachstumsexperimente)

Zur Quantifizierung der Anzahl adhärenter Zellen in 96-Lochplatten werden zwei Methoden angewendet, die auf einer photometrisch messbaren Färbung des Überstands basieren. Diese steht in linearem Zusammenhang zu der Zelldichte, so dass die gemessenen OD-Werte als Maß für die relative Zellzahl herangezogen werden können.

MTS-Assay

Der MTS-Assay von *Promega* beruht auf der Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen, ist also eine indirekte Bestimmung der Zelldichte. Das MTS-Tetrazolium Reagenz (Owen's Reagenz) wird von den Zellen zu einem farbigen Formazanprodukt reduziert, das bei OD₄₉₂ photometrisch bestimmt werden kann.

1. Zellen nach 72 h zweimal mit je 150 µl vorgewärmtem serumfreien DMEM waschen (8-Kanal-Pipette) und Mediumreste durch Abtupfen der 96-Lochplatte auf einem Papiertuch entfernen.
2. 100 µl serumfreies DMEM in jedes Loch pipettieren und 20 µl vorgewärmtes MTS-Reagenz (*Promega*) zugeben. Eine Reihe mit Leerwerten nicht vergessen.
3. 96-Lochplatte 30 min im Brutschrank inkubieren, OD₄₉₂ messen. Bei Bedarf (zu niedrige Absorption) weitere 30 min im Brutschrank inkubieren und noch mal messen.

Toluidinblau-Assay

Der Toluidinblau-Assay ist eine einfache Zellfärbung und stellt eine direktere Methode zur Bestimmung der Zelldichte dar. Zur Quantifizierung der von den Zellen aufgenommenen Farbstoffmenge wird die Zellmembran durch SDS permeabilisiert und die in den Überstand freigesetzte Farbe wird photometrisch bei OD₆₂₀ bestimmt. Der Assay kann direkt nach dem MTS-Assay angeschlossen werden.

1. Zellen nach der MTS-Messung zweimal mit je 150 µl PBS waschen.
2. 0,5% Toluidinblau (*Sigma*) (TB) in Cell-fix 10 min bei 1600 x g zentrifugieren zur Sedimentation des ungelösten Farbstoffs (übersättigte Lösung).
3. 150 µl TB auf die Zellen geben und 10 min bei RT inkubieren (fixieren und färben).
4. Löcher 5-6-mal gründlich mit je 150 µl PBS waschen, bis keine Farbreste mehr sichtbar sind.
5. 96-Lochplatte unter Mikroskop kontrollieren. Es sollte eine intensive Indigofärbung der Zellen beobachtet werden.

Material und Methoden

- Wenn die Färbung zu schwach ist, wird diese später unter der Detektionsgrenze der photometrischen Bestimmung liegen.
- 6. PBS-Reste durch Abtupfen der 96-Lochplatte auf einem Papiertuch gründlich entfernen und 100 µl 1% SDS pro Loch zusetzen.
 - Flüssigkeit nicht bis zum zweiten Druckpunkt der Pipette auslassen, sonst erfolgt Schaumbildung.
- 7. 5 min bei RT inkubieren und OD₆₂₀ photometrisch bestimmen.

B.2.3. Bakterien – Stämme, Nährmedien und Kultivierung

Für die Konstruktion rekombinanter Plasmid-DNA, sowie für die nachfolgende Proteinexpression, stehen diverse prokaryontische Organismen als etablierte, leicht kultivierbare Zellsysteme zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Bakterienstämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet (**Tab. 5**).

Tab. 5. Eigenschaften der verwendeten *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Verwendung	Eigenschaften	Referenz
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)	Konstruktion von Plasmiden	Defekt in Endonuklease, Rekombination und Restriktion; Blau-Weiß-Selektion über α-Komplementation möglich; Tetracyclin-Resistenz	(Bullock et al., 1987)
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS(rB-mB ⁻) gal λ(DE3)	Protein-expression	T7-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des Lac-Operators, IPTG-induzierbare Proteinexpression von T7-Promotor tragenden Plasmiden möglich	(Studier et al., 1990)

Die Bakterien wurden in flüssigem bzw. auf festem LB-Medium kultiviert, das nach Herstellerangaben aus Fertigmischungen (*Roth*) angesetzt und autoklaviert wurde. Zu den Flüssigmedien wurden zur Selektion der plasmidtragenden Bakterien Antibiotika, zur Induktion der Expression – IPTG zugesetzt. Bei Festmedien wurden die Antibiotika nach Abkühlen des autoklavierten Mediums auf ≈ 50°C zugegeben, mit anschließendem Gießen in Petrischalen.

Bei Kultivierung auf LB-Agar wurden die Petrischalen bei 37°C auf dem Kopf inkubiert. Bei Wachstum in Flüssigkultur entweder in einem 15 ml Plastikröhrchen oder in einem Erlenmeyerkolben, dessen Fassungsvermögen dem vierfachen des eingesetzten Mediumvolumens entspricht, wurde bei 225 rpm bzw. 180 rpm geschüttelt.

B.2.4. Insektenzellen – Linien, Nährmedien und Kultivierung

Die Insektenzellen werden als eukaryontisches Expressionssystem für Proteine eingesetzt, die in den Bakterien abgebaut, posttranslational nicht richtig modifiziert oder gefaltet werden. So konnte die cGKI nur in Insektenzellen in einer funktionell aktiven Form hergestellt werden (Feil et al., 1993). Verwendet wurden Zellen der Linie Sf9 (ATCC: CRL-1711), die ursprünglich aus dem Larvenovarialgewebe des Schmetterlings *Spodoptera frugiperda* (engl. „fall armyworm“) stammen (Vaughn et al., 1977). Diese wurden zur Expression rekombinanter Proteine mit Baculoviren infiziert (B.4.2).

Die Zellen wurden als Monolayer- oder Suspensionskultur bei 27°C ohne CO₂-Begasung in Grace's Insect Medium (Grace, 1962) mit FCS und Pen/Strep (bei Suspensionskulturen + Pluronic-68) gehalten (alle von *Gibco* bezogen). Unter diesen Bedingungen besitzen die Zellen eine Verdopplungszeit von ≈ 36 h. Für das Wachstum im Monolayer wurden die Zellen in Plastik-Kulturflaschen unterschiedlicher Größe kultiviert. Dabei wurde bei einer Konfluenz von $\approx 90\%$ das alte Medium durch neues ersetzt und die Zellen durch kurzes, aber hartes Abschlagen vom Flaschenboden abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde 1:4 bis 1:5 verdünnt und je nach Bedarf an Zellen in neue Flaschen ausgesät. Nach 3 bis 5 Tagen war der Zellrasen wieder 90% konfluent und die Zellen mussten wie oben beschrieben passagiert werden.

Für Coexpressionen (Interaktionsassay) wurden die Zellen als Monolayer infiziert. Zur Produktion von Protein (cGKI oder N-Termini) im großen Maßstab wurden, ausgehend von Monolayer-Zellen, Suspensionskulturen in 2 l Erlenmeyer-Kolben mit Kulturvolumina von 100 ml bis 700 ml je Kolben angelegt. Dabei wurden Monolayer-Zellen mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml (100 ml) in einem Erlenmeyer-Kolben ausgesät. Nach Erreichen einer Zelldichte von 2×10^6 bis 3×10^6 Zellen/ml (3-4 Tage) wurde auf die Ausgangszelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Für eine Infektion wurden die Zellen mindestens durch zweimaliges Passagieren in Suspension an diese Form der Kultivierung adaptiert. Die Kolben wurden mit Alufolie und zusätzlich Parafilm verschlossen, um Kontaminationen durch Luftkeime zu verhindern. Das Wachstum erfolgte auf einem Schüttler bei 27°C und 100 rpm. Zur detaillierteren Abhandlung der Kultivierung von Sf9-Zellen s. (Hillenbrand, 2007) bzw. (Feil, 1994).

B.3. Molekularbiologische Methoden

B.3.1. Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA

Zur Erzeugung rekombinanter Plasmid-DNA stehen verschiedene molekularbiologische Techniken zur Verfügung. Im Allgemeinen wird ein bestimmtes

DNA-Fragment aus genomischer oder Plasmid-DNA über PCR amplifiziert oder mittels Restriktionsenzyme herausgeschnitten, um in einen neuen Vektor (Plasmid) eingebaut zu werden. Dieser wird dann in *E. coli* in größeren Mengen hergestellt. Durch mehrere solche Schritte können verschiedenste Sequenzen neukombiniert werden, was für die Expression neuer rekombinanter Proteine eingesetzt werden kann.

B.3.1.1. Gelelektrophorese und photometrische Quantifizierung der DNA

Durch Anlegen elektrischer Spannung kann die gleichmäßig negativ geladene DNA im engmaschigen Netz einer Gelmatrix (Agarose, Polyacrylamid) nach Größe und Konformation aufgetrennt werden. Dabei ist bei linearisierten Fragmenten die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Dagegen ergibt die ringförmige DNA (durch das Vorkommen von überspiralierter, konkatomerer und offencirculärer Form) ein Bandenmuster, das keineswegs auf die Länge schließen lässt. Die DNA kann durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Elektrophorese in horizontalen Kammern mit Agarosegelen, in denen Ethidiumbromid enthalten war, durchgeführt. Die Proben wurden zuvor zur Erhöhung der Dichte stets mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Fragmentlänge linearer DNA wurde anhand eines DNA-Längenstandards (*Invitrogen*, s. F.7) abgeschätzt. Es wurden analytische Gele zur Überprüfung der Fragmentlänge bzw. zur Abschätzung der DNA-Menge (s. u.) und präparative Gele zur Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet.

Gelelektrophorese

1. Für Fragmente >1 kb 1% Agarose (*Biozym*), für Fragmente <1 kb 2% Agarose (*Biozym*) abwiegen, in 1x TBE aufkochen, 10 min (Magnetrührer) abkühlen lassen und 5 µl einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Agaroselösung zusetzen.
2. Gele in die vorbereiteten Schiffchen gießen (≈ 35 ml pro Schiffchen) und je nach Zweck Kämme einsetzen.
 - a. Für analytische Gele Kämme mit Taschenbreite 4 mm und $V \approx 15 \mu\text{l}$
 - b. Für präparative Gele Kämme mit Taschenbreite 22 mm und $V \approx 50 \mu\text{l}$
3. Nach Polymerisierung (≈ 45 min) Kämme abziehen, Gelschiffchen in die Elektrophoresekammer mit 1x TBE legen (mind. 1x pro Woche Laufpuffer wechseln; bei präp. Läufen immer direkt davor).
4. Proben mit 6x Ladepuffer versetzen (Probenvolumen/5 = nötiges Volumen).
5. Proben auf das Gel laden.
 - a. Für analytische Zwecke 12 µl von dem 1 kb-Längenstandard und von den Proben laden.

Material und Methoden

- b. Für präparative Zwecke 20 µl von dem 1 kb-Längenstandard und bis zu 50 µl von den Proben (max. 7 µg) laden. Wenn größeres Volumen vorhanden, auf mehrere Taschen verteilen.
6. ≈ 30-45 min (Größe der aufzutrennenden DNA berücksichtigen!) bei 150 V laufen lassen (7,9 V/cm).
7. Unter UV-Licht kontrollieren.
 - a. Für analytische Zwecke bei 100% Intensität des UV-Lichtes (312 nm) fotografieren.
 - b. Für präparative Zwecke bei 70% Intensität des UV-Lichtes (312 nm) die Bande möglichst schnell (Ausbildung von Thymin-Dimeren!) mit Skalpell ausschneiden und in ein Reaktionsgefäß überführen.

Quantifizierung der DNA-Menge

1. Ausgehend von der Intensität einer Bande auf dem Gel kann grob auf die aufgetragene DNA-Menge geschlossen werden. Dazu die Gesamtmenge des Längenstandards ausrechnen (29 ng/µl) und abschätzen welchem Fragment des Längenstandards die „Helligkeit“ der zu bestimmenden Bande am nächsten ist. Dann über die Länge dieses Fragments seine Menge ausrechnen. Diese entspricht ungefähr der Menge der zu bestimmenden Bande.
2. Photometrisch kann die Menge genauer bestimmt werden. Für diese werden größere Mengen an DNA gebraucht, weswegen sich die Methode lediglich für Quantifizierung gereinigter Plasmide eignet.
3. Die Plasmid-DNA 1:100 – 1:200 (je nach erwarteter Ausbeute) in 1 ml H₂O verdünnen und in eine Quarzküvette geben.
4. DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm photometrisch vermessen. 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ weist auf die Reinheit der DNA hin. Dieser sollte >1,7 sein.

B.3.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wird für die Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente benutzt (Saiki et al., 1985). Dabei dient genomische oder Plasmid-DNA als Matrize. Zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) fungieren als Anfangsstücke für die enzymatische Synthese des gewünschten Fragmentes. Durch eine mehrmals wiederholte Abfolge von Schritten (Denaturieren bei 94°C, Annealing bei 50-65°C, je nach Primersequenz, Elongation bei 72°C) wird das von den Primern flankierte DNA-Stück durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) synthetisiert.

Im Fall der Genotypisierungs-PCR (B.1.1) dient das amplifizierte Fragment lediglich zur Information, ob ein bestimmter DNA-Locus in der Wildtyp- oder der genetisch modifizierten Form vorliegt. Im folgenden Protokoll wird die PCR zur Erzeugung neuer rekombinanter DNA eingeführt. Da mit dem erzeugten PCR Fragment, im Gegensatz zur Genotypisierungs-PCR, weitergearbeitet werden soll, sollte dieses fehlerfrei amplifiziert werden. Deswegen wird eine hitzestabile Polymerase mit 3'→5'-

Material und Methoden

Exonuklease-Aktivität eingesetzt (z. B. Deep Vent_RTM DNA-Polymerase, *NEB*). Durch Anhängen einer zusätzlichen Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme bei der Primersynthese kann das Produkt einfach in einen Vektor eingebaut werden.

1. Folgenden Ansätze zusammenpipettieren:

➤ Mix 1 (2x):

❖ DNA (5 ng/μl)	(0,1 ng/μl)	2 μl
❖ Primer A ³ (25 pmol/μl)	(0,25 pmol/μl)	1 μl
❖ Primer B (25 pmol/μl)	(0,25 pmol/μl)	1 μl
❖ dNTPs (10 mM)	(0,2 mM)	2 μl
❖ H ₂ O		ad. 50 μl (+ 44 μl)

➤ Mix 2 (2x):

❖ Deep Vent _R TM (2 U/μl, <i>NEB</i>)	(0,02 U/μl)	1 μl
❖ 10x ThermoPol Puffer (<i>NEB</i>)		10 μl
❖ H ₂ O		ad. 50 μl (+ 39 μl)

2. Mix 1 und Mix 2 mischen und bei folgendem Programm laufen lassen:

95°C 2 min	}	30x
95°C 30 s		
50°C 30 s		
72°C 90 s		

3. Zur Kontrolle der PCR 10 μl des Ansatzes auf ein analytisches Gel auftragen (B.3.1.1).

4. Zur Reinigung den gesamten präparativen Ansatz auf ein präparatives Gel auftragen (B.3.1.1).

B.3.1.3. Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonucleasen

Die Restriktionsendonucleasen sind DNA-spaltende Enzyme des Restriktions-Modifikations-Systems der Bakterien, die in der Natur zur Abwehr der Bakterien gegen fremde Phagen-DNA dienen. Für die in vitro Spaltung von DNA in der Molekularbiologie werden ausschließlich Restriktionsenzyme Typ II eingesetzt, die energieunabhängig an bestimmten palindromischen Sequenzen schneiden. Man unterscheidet solche, die überhängende Enden (*sticky ends*, mit 5' oder 3'-Überhang) und solche, die glatte Enden (*blunt ends*) hinterlassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur 5'-überhängende Enden produzierende Restriktionsenzyme von der Fa. *NEB* verwendet (F.4.2). Nach der Spaltung kann zwischen den entstandenen Enden mit Hilfe von Ligasen (B.3.1.5) eine neue Phosphodiesterbindung ausgebildet werden. Es kann erforderlich sein, mit zwei

³ NV1 und NV2 für Iα, NV3 und NV4 für Iβ, s. Tab. 16

Material und Methoden

verschiedenen Enzymen zu schneiden, allerdings, um den Verdau mit beiden gleichzeitig durchführen zu können, müssen diese in deren Bedingungen (Puffer) kompatibel sein (s. *NEB*-Katalog).

1. Für analytische Zwecke:
 - a. zwei Reaktionsgefäße (Negativkontrolle und Restriktionsansatz) mit je 2 µl DNA (100-500 ng/µl) vorlegen
 - b. folgende Ansätze als Mastermix zusammenpipettieren:
 - Für den Restriktionsmastermix:

❖ 10x Reaktionspuffer (<i>NEB</i>)	2 µl
❖ Restriktionsendonuclease A (5 U, <i>NEB</i>)	x µl
❖ optional Restriktionsendonuclease B (5 U, <i>NEB</i>)	y µl
❖ H ₂ O	ad. 18 µl
 - Für die Negativkontrolle:

❖ 10x Reaktionspuffer (<i>NEB</i>)	2 µl
❖ H ₂ O	ad. 18 µl
 - c. 18 µl des jeweiligen Ansatzes zu der vorgelegten DNA pipettieren.
2. Für präparative Zwecke:
 - a. Folgenden Ansatz zusammenpipettieren:

❖ DNA (1 µg/µl)	10 µl
❖ 10x Reaktionspuffer (<i>NEB</i>)	5 µl
❖ Restriktionsendonuclease A (10 U, <i>NEB</i>)	x µl
❖ optional Restriktionsendonuclease B (10 U, <i>NEB</i>)	y µl
❖ H ₂ O	ad. 50 µl
 - ➔ als Negativkontrolle 5 µl vor der Enzymzugabe entnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
3. Ansätze 1 h bis ÜN bei 37°C inkubieren
4. Zur Kontrolle der Restriktion ≈ 100 ng des Ansatzes auf ein analytisches Gel auftragen (B.3.1.1).
5. Zur Reinigung gesamten präparativen Ansatz auf ein präparatives Gel auftragen (B.3.1.1).

B.3.1.4. Reinigung der DNA über Elektroelution und anschließende Ethanolfällung

Nach der Auftrennung des gewünschten Fragments über präparative Gelelektrophorese und dem Herausschneiden des entsprechenden Gelstückes, muss das Fragment in Lösung gebracht werden. Eine einfache und sehr effiziente Methode, die diesen Zweck erfüllt, ist die Elektroelution. Bei dieser wird das Gelstück in einem mit 1x TBE gefüllten Dialyseschlauch positioniert, die DNA wird über

Anlegen eines elektrischen Feldes aus der Gelmatrix gelöst und wandert in den umliegenden Puffer. Anschließend wird eine Ethanol-fällung durchgeführt, um die DNA zu konzentrieren und von Salzen zu befreien.

Elektroelution

1. Ausgekochten⁴ Dialyseschlauch (≈ 6 - 10 cm) aus Aufbewahrungslösung (10 mM EDTA, pH 8,0) nehmen, in ein Becherglas mit H₂O überführen und die Innenseite des Schlauches mehrmals mit Wasser durchspülen. Den Schlauch auf einer Seite mit zwei Klammern verschließen.
2. Ausgeschnittenes Agarosestück in den Dialyseschlauch einbringen und gerade soviel 1x TBE-Puffer in den Schlauch füllen, dass dieser über zwei weitere Klammern luftblasenfrei verschlossen werden kann.
3. Verschlusenen Schlauch in eine horizontale Elektrophoresekammer legen und mit 1x TBE überschichten.
4. DNA für 1 h bei 150 V aus dem Gelstück elektroelutieren. Den Erfolg über eine UV-Lampe überprüfen (312 nm, Intensität: 70%). Ist der Lauf beendet, für 30 s umpolen, um die DNA vom Schlauch abzulösen.
5. Nach erfolgtem Lauf Schlauch aus Elektrophoresekammer nehmen, auf einer Seite öffnen und Gelstück ohne Verlust des DNA-haltigen Puffers entnehmen.
6. Den DNA-haltigen Puffer vorsichtig aus dem Schlauch entnehmen und in ein Reaktionsgefäß überführen.
7. 2 min bei 2600 x g abzentrifugieren, um evtl. vorhandene Agarosestückchen zu pelletieren.
8. Überstand abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen und eine Ethanol-fällung durchführen (s. nachfolgend).

Ethanol-fällung

Die Angaben beziehen sich auf kleine DNA-Mengen, die über PCR, nach Restriktion oder Ligation erhalten werden. Die Angaben für die Fällung von Plasmid-DNA nach Mini- oder Maxi-plasmidpräparation sind unter B.3.1.7 zu finden.

1. 1/9 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5 Volumen 100% Ethanol (absolut, -20°C) zu der DNA-Lösung zugeben.
→ Bei der Fällung von Ligationsansätze (B.3.1.5) zusätzlich 1 µl tRNA (1 µg/µl) zur Erhöhung der Nucleinsäurekonzentration zugeben.
2. Mindestens 1 h bei -80°C inkubieren.
3. Ausgefällte DNA 15 min bei 4°C und 5000 x g, oder wenn möglich 18 000 x g (Tischzentrifuge) pelletieren.
4. Überstand vorsichtig abkippen, gleiches Volumen an 70% Ethanol (-20°C) zum Waschen des Pellets zusetzen und wie unter Punkt 3 beschrieben abzentrifugieren.
5. Pellet bei 37°C trocknen.

⁴ Zweimal in jeweils frischem 10 mM EDTA, pH 8,0 autoklavieren.

→ Es darf kein Ethanolrückstand vorhanden sein!

6. Pellet (nicht sichtbar) in 20 µl H₂O aufnehmen.

B.3.1.5. Ligation

Für die ATP-abhängige Verknüpfung freier DNA-Enden, steht die T4-DNA-Ligase zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden der Vektor und das einzubauende DNA-Fragment an beiden Enden mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten, so dass nach der Ligation nur eine mögliche Ausrichtung der Integration möglich war. Dies machte zusätzliche Dephosphorylierungsschritte, um die Religation des Vektors zu vermeiden, überflüssig. Die Konzentrationen von Vektor und einzuklonierendem DNA-Fragment wurden über ein Agarosegel bestimmt. Im Ligationsansatz sollte das molare Verhältnis von Vektor/DNA-Fragment ungefähr 1:4 betragen.

1. Ligationsansatz für überhängende Enden wie folgt zusammenpipettieren (als Kontrolle immer auch Religation des Vektors ansetzen):

❖ Vektor-DNA	100 - 300 fmol	x µl
❖ DNA-Fragment	200 - 1500 fmol	y µl
❖ 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (<i>NEB</i>)		2 µl
❖ H ₂ O		ad. 19 µl

→ 5 min 50°C; abkühlen lassen

❖ T4-DNA-Ligase (400 U/µl, <i>NEB</i>)	20 U/µl	1 µl
---	---------	------

2. 1 h bis 16 h bei 16°C oder RT inkubieren.
3. Ligationsansatz fällen (B.3.1.4)

B.3.1.6. Transformation von Bakterien (Elektroporation)

Bakterien können unter bestimmten Bedingungen freie DNA aufnehmen (Transformation). Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um die neu konstruierten Plasmide in Bakterien einzuschleusen. Die effektivste Transformationsmethode mit einer Ausbeute von bis zu 10⁹ Transformanten pro µg Plasmid ist die Elektroporation (Dower et al., 1988). Bei dieser werden die Zellen kurz einem starken elektrischen Feld ausgesetzt, was zu einer kurzzeitigen Bildung von Poren in der Zellwand führt. Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Aufnahme von Plasmid-DNA ist die Abwesenheit von stromleitenden Ionen (Salze) in allen Lösungen und in der Bakterienpräparation selbst.

Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Material und Methoden

Da LB-Medium ohne Antibiotika zur Anzucht der Bakterien verwendet wird, muss möglichst steril gearbeitet werden. Nach der ersten Zentrifugation sollten die Lösungen und die Bakterien bei 4°C gehalten werden.

1. Eine einzelne Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) animpfen und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubieren.
2. Am nächsten Tag abends 500 µl dieser Kultur (lagern bis zum Animpfen bei 4°C) in 50 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) animpfen und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubieren.
3. Am nächsten Morgen 4x 500 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) mit je 10 ml der Übernachtskultur animpfen und bei 37°C und 180 rpm solange inkubieren bis eine OD₆₅₀ von 0,5 – 0,7 erreicht ist (≈ 4 h). Als Leerwert LB-Medium vermessen. OD₆₅₀ nach 2 h alle 45 min kontrollieren.
4. Zellen durch Zentrifugation 10 min bei 5000 x g und 4°C ernten (Beckman J2-HS; Rotor: JA-10).
➔ Nicht mehr als 400 ml pro Beckman-Zentrifugenbecher einfüllen!
5. Zellen 2x mit je 1 l eiskaltem Wasser, anschließend 3x mit je ≈ 100 ml eiskaltem 10% Glycerol salzfrei waschen; Zentrifugation wie unter 5. beschrieben. Vorsicht: je salzarmer die Zellen, desto weniger fest das Pellet.
6. Pellet in 4 ml eiskaltem 10% Glycerol (2 ml je Liter Kultur) resuspendieren und Zellsuspension zu je 200 µl aliquotieren. Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.
7. Zelldichte bestimmen durch ausplattieren der Zellen auf Agarplatten ohne Antibiotika (sollte ≈ 10¹² Zellen/ml betragen).
8. Elektrokompentenz der Präparation testen durch Elektroporation mit pUC18 (s. u.). Optimal soll die Transformationseffizienz um 10⁸ Kolonien/ µg pUC18 sein.

Elektroporation von Bakterien

1. Jeweils 3 LB_{Antibiotikum}-Platten und 1 ml LB (ohne Antibiotikum!) in 15 ml Falcon pro Elektroporationsansatz vorbereiten.
2. Pro Ansatz 100 µl elektrokompetente *E. coli* auf Eis ≈ 10 min auftauen.
3. 50-100 ng DNA (1 µg/µl 1:100 verdünnen und daraus 5-10 µl einsetzen) bei XL1-Blue, 1 µg (1 µg/µl 1:10 verdünnen und daraus 10 µl einsetzen) bei BL21(DE3) zugeben und gut mit der Bakteriensuspension mischen. Bei der Elektroporation eines Ligationsansatzes in XL1-Blue 10 µl der nach der Fällung in 20 µl aufgenommenen ligierten DNA (B.3.1.5) einsetzen.
➔ die DNA-Plasmidpräparation darf auf keinen Fall in Puffer aufgenommen sein (Salz!).
4. In jeweils eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführen, 5 min auf Eis inkubieren.
5. Küvette von außen abtrocknen, in die Elektroporationsapparatur einsetzen und bei folgenden Bedingungen elektroporieren.

❖ Spannung:	2,5 kV
❖ Kapazität:	25 µF
❖ Widerstand:	200 Ω

Material und Methoden

6. Die angezeigte Zeitkonstante sollte $\approx 4,5$ ms sein.
7. Zellen unverzüglich in 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum!) überführen und bei 225 rpm und 37°C 1 Stunde schütteln.
8. Von jedem Ansatz bei der Elektroporation
 - a. von Plasmid-DNA je 100 μl folgender Verdünnungen auf $\text{LB}_{\text{Antibiotikum}}$ -Platten ausplattieren: unverdünnt, 10^{-2} und 10^{-4} . Die Verdünnungsstufe auf der Platte entspricht dann 10^{-1} , 10^{-3} und 10^{-5} , da bei dem Einsatz von 100 μl (Gesamtvolumen 1 ml) eine 1:10 Verdünnung erfolgt.
 - b. von Ligationsansätzen 300 μl und 100 μl der unverdünnten Bakterien suspension und 100 μl einer 10^{-1} Verdünnung auf $\text{LB}_{\text{Antibiotikum}}$ -Platten ausplattieren. Die Verdünnungsstufe auf der Platte entspricht $1/3$, 10^{-1} bzw. 10^{-2} .
9. Platten umgedreht ÜN bei 37°C inkubieren und Kolonien auszählen (dafür die Verdünnung wählen, die zwischen 100-500 Kolonien aufweist). Anschließend Bakterienkultur animpfen für die Plasmidpräparation, s. unten.
10. Platten können bis zu 1 Monat bei 4°C aufbewahrt werden (evtl. mit Parafilm abdichten).

B.3.1.7. DNA-Präparation und Sequenzierung

Die transformierten Bakterien werden anschließend von der Platte in Flüssigkultur überführt, um unter Selektionsdruck (Antibiotikum) vermehrt zu werden. Zur Analyse mehrerer Kolonien auf der Suche nach positiven Bakterienklonen eignet sich eine Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Minipräparation) über alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979) mit anschließender Restriktionsanalyse (B.3.1.3). Zur Herstellung größerer Plasmidmengen sollen 1-2 Transformanten in größerem Maßstab angeimpft und damit eine Maxipräparation durchgeführt werden.

Minipräparation

1. Einzelne Bakterienkolonien (10-12) werden in 15 ml Plastikröhrchen mit 5 ml Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert.
2. 1 ml der gewachsenen Bakterienkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und 3 min mit $2600 \times g$ zentrifugieren. Den Rest der Bakterien zum Animpfen der Maxipräparation (s. u.) bei 4°C aufbewahren (evtl. auch für Glycerolstock und Verdünnungsausstrich). Überstand verwerfen, das Bakterienpellet in 100 μl Puffer S1 aufnehmen und gut resuspendieren. 200 μl Puffer S2 zugeben und 4-6-mal invertieren (kein Vortexer).
3. 150 μl vorgekühlten (4°C) Puffer S3 zugeben, zügig mischen (kein Vortexer) und 3 min mit $18\ 000 \times g$ zentrifugieren.
4. Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 100% Ethanol (absolut, -20°C) pipettieren, um die Plasmid-DNA zu fällen, kurz vortexen und 3 min bei 4°C und $18\ 000 \times g$ zentrifugieren.
5. Überstand abkippen und Pellet (meistens ein winziger weißer Punkt) mit 1 ml 70% Ethanol waschen, 3 min bei $18\ 000 \times g$ zentrifugieren.

Material und Methoden

- Überstand vorsichtig abkippen und Pellet trocknen (ca. 5-10 min im umgedrehten Röhrchen auf Filterpapier stehen lassen). Alternativ kann das Pellet 5 min in der Speed-Vac getrocknet werden.
 - Es darf kein Ethanolrückstand mehr vorhanden sein!
- Pellet in 25 µl H₂O + 100 µg/ml RNase A (*Macherey-Nagel*, Stammlösung: 10 mg/ml) aufnehmen und gut lösen (vortexen, abzentrifugieren).
- 5 µl der Minipräparation für die Restriktionsanalyse einsetzen (B.3.1.3).

Maxipräparation

- Abends einen positiven Bakterienklon auswählen.
 - Wenn das zu amplifizierende Plasmid über ein Ampicillinresistenzgen selektiert wird, entsprechende Mini-Kultur (≈ 4 ml) vor dem Animpfen 2 min bei 2600 x g abzentrifugieren und Bakterienpellet in frisches LB-Medium mit Antibiotikum aufnehmen. Auf diese Weise wird die ins Medium sezernierte β-Lactamase entfernt.
- 250 ml Medium mit Antibiotikum mit der Mini-Kultur animpfen und ÜN bei 37°C und 180 rpm schütteln.
- Am nächsten Morgen 250 ml ÜN-Bakterienkultur 5-10 min bei 4°C und 5000 x g (Beckman J2-HS; Rotor: JA-10) zentrifugieren.
- Überstand abkippen. Das Bakterienpellet in 8 ml Puffer S1 aufnehmen, gut resuspendieren und in 50 ml Plastikröhrchen überführen.
- 8 ml Puffer S2 zugeben und kurz mischen (kein Vortexer).
- 8 ml vorgekühlten (4°C) Puffer S3 zugeben, zügig mischen (kein Vortexer) und 5 min auf Eis inkubieren.
- NucleoBond-Säulen (Midi 100, *Macherey-Nagel*) mit 5 ml Puffer N2 äquilibrieren (durchlaufen lassen).
- Einen NucleoBond-Filter in einen Trichter legen und mit einigen Tropfen Puffer N2 befeuchten, dann das Bakterienlysat filtrieren.
- Geklärtes Lysat auf die Säule laden und durchlaufen lassen.
- Säule mit 20 ml Puffer N3 waschen.
- Plasmid-DNA mit 7 ml Puffer N5 eluieren (in 15 ml Plastikröhrchen).
- 5 ml Isopropanol zugeben, um die Plasmid-DNA zu fällen. Vorsichtig mischen und 20 min bei 4°C und 4500 x g zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abkippen und DNA-Pellet (weißlich-transparent) mit 5 ml 70% Ethanol waschen, kurz vortexen und 5 min bei 4°C und 4500 x g zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abkippen und DNA-Pellet trocknen (ca. 5-10 min im umgedrehten Röhrchen auf Filterpapier stehen lassen).
 - Es darf kein Ethanolrückstand mehr vorhanden sein!
- DNA in 200 µl H₂O aufnehmen und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- DNA-Konzentration photometrisch bestimmen (B.3.1.1). DNA-Ausbeute berechnen (µg/ml Kultur).

Material und Methoden

15. Plasmid-DNA auf 1 µg/µl einstellen (wenn möglich).
16. 200 ng Plasmid-DNA für die Restriktionsanalyse einsetzen (B.3.1.3.)

Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der DNA wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München durchgeführt. Dabei wurden DNA-Fragmente mittels „Terminator Cycle Sequencing“ Kit enzymatisch hergestellt und deren Länge durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynucleotide (ddNTPs) terminiert. Dadurch entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die jeweils mit einem von vier Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, je nachdem welches der vier ddNTPs zum Kettenabbruch geführt hat. Die fluoreszenzmarkierten Fragmente werden mithilfe eines Sequenzierautomaten durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt, von einem Laser detektiert und in Sequenzabfolge umgerechnet. Es konnten Sequenzen bis 700 bp bestimmt werden.

1. 1 µl DNA von der Mini- oder Maxipräparation (max. 0,5 µg) in PCR-Reaktionsgefäße vorlegen.
 2. Folgenden Reaktionsansatz als Mastermix zusammenpipettieren:

❖ „Terminator Ready Reaction Mix“ (<i>Perkin Elmer</i>)		4 µl
❖ Primer (0,8 pmol/µl)	3,2 pmol	4 µl
❖ H ₂ O		ad 19 µl (+ 11 µl)
 3. Mastermix auf die DNA geben, mit 40 µl Mineralöl überschichten und in die PCR-Maschine stellen.
 4. Folgendes Programm laufen lassen:

95°C 2 min	} 25x
95°C 30 s	
50°C 40 s	
60°C 4 min	
72°C 5 min	

➔ Maximale Temperaturänderung 1°C/s
 5. Nach der Synthese auf Eis stellen.
 6. Spin Columns Centri Sep (*Perkin Elmer*) mit 800 µl H₂O füllen und durch Klopfen alle Luftblase aus dem Säulenmaterial entfernen. 2 h bei RT stehen lassen.
 7. H₂O abtropfen lassen und 90 s bei 525 x g und RT zentrifugieren.

➔ ab jetzt zügig arbeiten, da die Säulen keineswegs austrocknen dürfen.
 8. Sequenzieransatz vorsichtig unter der Mineralölschicht abnehmen und auf die Säule pipettieren.
 9. Säulen in Reaktionsgefäße stellen und 90 s bei 525 x g und RT zentrifugieren.
-

10. Säulen verwerfen und Eluat 15-30 min in der Speed vac trocknen.
11. Getrocknetes Pellet in 20 µl „Template Suppression Reagent“ aufnehmen und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit einem Gummideckel überführen.
12. 3 min bei 95°C denaturieren.
13. Proben in das Sequenziergerät stellen oder bei -20°C lagern.

B.3.2. Erzeugung rekombinanter Baculoviren

Für die Expression rekombinanter Proteine im eukaryontischen Sf9-Zellsystem müssen zunächst Baculoviren erzeugt werden, die die für das gewünschte Protein codierende DNA tragen. Für diesen Zweck stellt das Bac-to-Bac-System (*Invitrogen*) eine schnelle und effiziente Methode dar, bei der die rekombinante DNA zunächst in das virale Genom, das sog. Bacmid, inkloniert wird und damit unter der Kontrolle des starken Polyhedrinpromotors steht. Das Bacmid trägt für die Replikation in *E. coli* wichtige DNA-Abschnitte (mini-F Replicon), die eine Vermehrung in *E. coli* ermöglichen. Anschließend kann das rekombinante Bacmid über Lipofektion in Sf9 Zellen eingebracht werden. Da es das komplette virale Genom mit Ausnahme des Polyhedringens trägt, läuft das normale genetische Programm nach Infektion einer Zelle ab und führt zur Produktion einer Vielzahl rekombinanter Baculoviren.

Die Erzeugung rekombinanter Baculoviren wurde mit der freundlichen Hilfe von Matthias Hillenbrand durchgeführt. Genaueres zur Amplifikation der Bacmid-DNA in *E. coli*, ihrer Charakterisierung (PCR), zur Transfektion der Sf9-Zellen und der Amplifikation der Viruspräparation ist der Diplomarbeit von M. Hillenbrand (Hillenbrand, 2007) zu entnehmen.

B.4. Expression rekombinanter Proteine

B.4.1. Proteinexpression in Bakterien

Die Herstellung rekombinanter Proteine setzt das Einbringen der Fremd-DNA in ein bakterielles Expressionsplasmid, das einen in Prokaryonten aktiven Promotor trägt, voraus. Besonders geeignet für die effiziente Proteinüberexpression in Bakterien sind Bakteriophagenpromotoren, wie der T7-Promotor, da diese eine hohe Transkriptionsrate in Bakterien erzielen. Zusätzlich können die Eigenschaften des benutzten *E. coli*-Expressionsstammes die Expressionseffizienz beeinflussen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm BL21(DE3) trägt das Gen für die T7-Polymerase unter der Kontrolle des Lac-Operators. Dies ermöglicht die Induktion der Expression von Genen unter dem T7-Promotor durch Zugabe des Lac-Induktors IPTG (0,5 mM). Die induzierbare Expression erlaubt die Produktion großer

Material und Methoden

Proteinmengen in kurzer Zeit und ist daher auch für die Herstellung von evtl. toxischen Proteinen geeignet.

Expression:

1. Elektroporation von BL21(DE)-Zellen wie beschrieben (B.3.1.6) durchführen.
2. Für 1 l Kultur abends 4 Klone in je 6 ml LB mit Antibiotikum (15-ml Plastikröhrchen) und ÜN bei 200-225 rpm und 37°C schütteln.
3. Am nächsten Morgen je 2 Vorkulturen in einen Erlenmeyerkolben (500 ml LB mit Antibiotikum) animpfen.
 - ➔ Wenn das zu amplifizierende Plasmid über ein Ampicillinresistenzgen selektiert wird, Vorkulturen vor dem Animpfen 2 min bei 2600 x g abzentrifugieren und Bakterienpellet in frisches LB-Medium mit Antibiotikum aufnehmen. Auf diese Weise wird die ins Medium sezernierte β -Lactamase entfernt.
4. Bakterienkulturen bei 200-225 rpm und 37°C solange inkubieren bis eine OD_{650} von ca. 0,5 erreicht ist (ca. 5 h). Als Leerwert LB-Medium vermessen. OD_{650} nach 3 h alle 45 min kontrollieren.
5. Vor der Induktion Aliquots für eine SDS-PAGE-Analyse entnehmen. $1/OD_{650}$ ml in Reaktionsgefäße überführen, 5 min bei 5000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen, Bakterienpellet in Restmedium ($\approx 200 \mu\text{l}$) resuspendieren, 4x SDS-Probenpuffer zugeben, 15 min bei 95°C denaturieren, 1 min bei 18 000 g abzentrifugieren.
6. Expression durch 0,5 mM IPTG induzieren. Dazu 250 μl 1M IPTG auf 500 ml Kultur zusetzen.
7. Bakterienkulturen weitere 2h bei 200-225 rpm und 37°C inkubieren.
8. Aliquots für eine SDS-PAGE-Analyse entnehmen. $1/OD_{650}$ ml in Reaktionsgefäße überführen, 5 min bei 5000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen, Bakterienpellet in Restmedium ($\approx 200 \mu\text{l}$) resuspendieren, 4x SDS-Probenpuffer zugeben, 15 min bei 95°C denaturieren, 1 min bei 18 000 g abzentrifugieren.
9. Zellen durch Zentrifugation bei 10 min bei 5000 x g und 4°C ernten (Beckman J2-HS; Rotor: JA-10).
 - ➔ Nicht mehr als 400 ml pro Beckman-Zentrifugenbecher füllen!
10. Pellet zweimal mit 100 ml eiskaltem PBS pro 1 l Kultur waschen.
11. Zellen in geringem Volumen eiskaltem Phosphatpuffer mit 2% Proteaseinhibitoren-Cocktail (*Sigma*) resuspendieren (≈ 2 ml pro 500 ml Kultur).
12. Zellsuspension sofort bei -20°C einfrieren und bis zum Aufschluss für mind. 1 h lagern.

Zellaufschluss

1. Pellet auf Eis auftauen.
2. Zellsuspension auf 6 ml pro 1 l Kulturvolumen mit eiskaltem Phosphatpuffer (1% Proteaseinhibitoren-Cocktail *Sigma P8849*) auffüllen. Aliquot (100 μl) entnehmen für die spätere SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.
3. Nach dem Auftauen Zellen mit 1 mg/ml Lysozym (1/50 einer 50 mg/ml Stammlösung) und 1/1000 Benzonase (*Novagen*) versetzen. 10 min bei RT inkubieren.

Material und Methoden

4. Mit einem Ultraschallgerät (AG Stehle) lysieren. Dabei 3x 1 min mit 40% Amplitude (80 W) und 0,5 s ON/OFF-Intervall auf Eiswasser pulsen. Aliquot (100 µl) entnehmen für die spätere SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.
5. Zelllysate 20 min bei 4°C und 12 000 x g zentrifugieren (Beckman J2-HS, Rotor: JA-10, 50 ml-Plastikröhrchen in Beckman-Einsätzen).
6. Zellextrakt (lösliche Fraktion) in ein neues Gefäß überführen und auf Eis stellen bis zur Affinitätschromatographie (B.5.1). Aliquot (100 µl) entnehmen für die spätere SDS-PAGE und Western Blot-Analyse (B.5.7).
7. Pellet in 6 ml Phosphatpuffer pro 1 l Kultur aufnehmen und für die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Affinitätschromatographie aufheben.

B.4.2. Proteinexpression in Insektenzellen

Die Amplifikation der rekombinanten Baculoviren in Sf9-Zellen führt zu der Lyse der Zellen und der Akkumulation einer großen Zahl von Viren im Medium (B.3.2). Dieser Zellüberstand kann nach Bestimmung des Titers [pfu/ml] (pfu: *plaque forming units*) als Inoculum benutzt werden (s. Formel). Bei der Infektion von Monolayer- und Suspensionskulturen zwecks Proteinexpression des rekombinanten unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors stehenden Gens sollte die MOI (*multiplicity of infection*) zwischen 1 und 5 liegen, um die Infektion möglichst jeder Zelle sicherzustellen. Monolayerkulturen dienen der Produktion von kleinen Mengen (µg) rekombinanten Proteins, Suspensionskulturen liefern große Mengen (mg). Die Zellen wurden im Allgemeinen 3 Tage p.i. geerntet und aufgearbeitet.

$$\text{Inoculum (ml)} = \frac{\text{MOI (pfu/Zelle)} \times \text{Zellzahl}}{\text{Titer der Präparation (pfu/ml)}}$$

B.4.2.1. Proteinexpression in Monolayerkulturen

Expression

1. Monolayer-Zellen (Vitalität > 90%) mit einer Dichte von 2x10⁵ Zellen/cm² in einer frischen Kulturflasche aussäen. Zellen für mind. 1 h anwachsen lassen.
2. Zellen durch Zusatz des Inoculums mit einer MOI von 1 bis 5 infizieren. Für die Berechnung des dafür nötigen Volumens [ml] s. Formel. Bei Coinfektionen beachten, dass die Gesamt-MOI aller verwendeten Viren zusammen nicht über 5 liegt. Als Negativ-Kontrolle eine Flasche mit Medium infizieren.
3. 72 h p.i. Zellen durch Abspülen bzw. leichtes Abschlagen vom Boden der Kulturflasche ablösen und durch Zentrifugieren (5 min bei 4°C und 1000 x g) pelletieren. Überstand verwerfen.
4. PBS (0,5 Kulturvolumen) mit 1x Proteaseinhibitoren-Cocktail versetzen:

❖ DTT (1 M)	0,1 mM	10 µl
❖ EDTA, pH 8,0 (0,5 M)	0,1 mM	2 µl
❖ Leupeptin (1 mg/ml)	1 µg/ml	10 µl

Material und Methoden

❖ PMSF (0,1 M)	0,1 mM	10 µl
❖ PBS		ad. 10 ml

5. Zellen zweimal mit eiskalten PBS (0,5 Kulturvolumen) mit 1x Proteaseinhibitoren-Cocktail waschen.
6. Zellen in geringem Volumen eiskaltem Phosphatpuffer 1% Proteaseinhibitoren-Cocktail (*Sigma*) resuspendieren ($\approx 40 \mu\text{l}$ pro ml Kultur).
7. Zellsuspension sofort bei -80°C einfrieren und bis zum Aufschluss (s. u.) für mind. 1 h lagern.

Aufschluss

1. Gefrorene Zellsuspension bei RT auftauen lassen.
2. Während des Auftauens Zellen mit zwei Spatelspitzen ($\approx 0,5 \text{ g}$) Keramik-Beads (Lysing matrix D, *MP Biomedicals*) versetzen und durch heftiges Vortexen (20-30 s) aufschließen.
3. Zelllysat 5 min bei 4°C und $18\,000 \times g$ zentrifugieren.
4. Geklärten Überstand entnehmen und für den Nachweis rekombinanter Proteine über Western Blot (B.5.7) oder Interaktionsanalyse (B.5.2) verwenden. Das Pellet bis zur Klärung der Löslichkeit des exprimierten Proteins aufbewahren.

B.4.2.2. Proteinexpression in Suspensionskulturen

Expression

1. Zellen wie in B.2.4 beschrieben in Suspensionskultur nehmen. Um später mg-Mengen zu erhalten, sollten 1 bis 1,4 l Suspensionskultur pro Infektion vorliegen.
2. Exponentiell wachsende Zellen mit einer Zelldichte von 1 bis 2×10^6 Zellen/ml (Vitalität $> 90\%$) durch Zugabe von Viruslösung mit einer MOI von 1 bis 5 infizieren (s. Formel auf S. 39). Kultur für 30 min ruhig stehen lassen und danach wie gehabt bei 27°C und 100 rpm inkubieren. Täglich Zelldichte bestimmen. Bei einer Infektion sollte das Wachstum stagnieren.
3. 72 h p.i. Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 4°C und $1000 \times g$) ernten. Zuvor Aliquot entnehmen und Zelldichte bestimmen.
4. PBS (0,5 Kulturvolumen) mit 1x versetzen (s. S. 39, das gebrauchte Volumen ist hier im Literbereich).
5. Zellen zweimal mit eiskalten PBS (0,5 Kulturvolumen) +1x Proteaseinhibitoren-Cocktail waschen.
6. Zellen in geringem Volumen eiskaltem Phosphatpuffer + 1% Proteaseinhibitoren-Cocktail (*Sigma*) resuspendieren ($\approx 5 \text{ ml}$ pro 500 ml Kultur).
7. Aliquot entnehmen (100 µl) für einen Expressionstest über Western Blot (B.5.7).
8. Restliche Zellsuspension sofort bei -80°C einfrieren und bis zum Aufschluss für mind. 1 h lagern.

Aufschluss

1. Nach dem Auftauen Zellen mit einem Ultraschalgerät (AG Stehle) lysieren. Dabei 1 min mit 40% (80 W) Amplitude und 0,5 s ON/OFF-Intervall auf Eis pulsen. Der Lyseerfolg mikroskopisch überprüfen und ggf. ein weiteres Mal für 1 min mit gleichen Einstellungen pulsen.
2. Vom erhaltenen Zellysat ein Aliquot (100 µl) entnehmen für die spätere Bilanzierung und SDS-PAGE-Analyse. Das restliche Lysat 15 min bei 4°C und 12 000 x g zentrifugieren (Beckman J2-HS; Rotor: JA-20).
3. Den Überstand in ein neues Gefäß überführen, auch hier ein Aliquot (100 µl) entnehmen und den restlichen geklärten Überstand anschließend einer Affinitätschromatographie (B.5.1) unterziehen.
4. Das Pellet in 5 ml Phosphatpuffer pro 500 ml Kultur aufnehmen, und für die SDS-Analyse der Affinitätschromatographie aufheben.

B.5. Proteinbiochemische Methoden

B.5.1. Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine Auftrennungsmethode für Proteine, die auf die Interaktion von bestimmten Proteinen mit immobilisierten Liganden wie anderen Proteinen, kleinen Molekülen oder Ionen beruht. Durch das Anbringen der Liganden an eine Träger-Matrix kann das entsprechende Protein aus einem Zellextrakt spezifisch gereinigt werden, da es im Gegensatz zu den anderen Proteinen an der Matrix zurückgehalten wird. Anschließend kann die Bindung an den immobilisierten Liganden durch Zugabe von freiem Liganden oder Substanzen, die selber an den Liganden binden, aufgehoben und das so gereinigte Protein wieder in die mobile Phase überführt werden (Elution).

Eine gängige Methode ist die Affinitätschromatographie über rekombinant an das Protein angehängte 5 bzw. 6 aufeinanderfolgende Histidine, die an Träger-Matrizes gekoppelte Ni²⁺-Ionen komplexieren (Crowe et al., 1994; Hochuli et al., 1987). Das His₅₋₆-markierte Protein kann mit Imidazol eluiert werden.

Um die Reinigungsbedingungen zu etablieren und kleine Mengen an Protein zu reinigen, wurde ein *batch*-Verfahren mit Ni²⁺-NTA-Agarose von *Quiagen* durchgeführt. Für Proteinreinigung in großem Maßstab wurden HisTrap FF crude-Säulen (1 ml) in Verbindung mit einer Reinigungsanlage „ÄKTA purifier 10“ (beides *GE Healthcare*) verwendet. Die verwendeten Puffer wurden frisch hergestellt und filtriert (0,45 µm), sowie bei der ÄKTA-Reinigung auch entgast.

Batch-Reinigung

1. 2 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (50% Suspension in 30% Ethanol, *Quiagen*) pro 1 l Kultur 2 min bei 500 x g abzentrifugieren und mit 4 ml Phosphatpuffer waschen.

Material und Methoden

2. Ni²⁺-NTA-Agarose in wenig Phosphatpuffer aufnehmen und dem Proteinextrakt (B.4) zusetzen.
3. 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler (2 rpm) inkubieren.
4. 10 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugieren. Überstand (entspricht dem Durchlauf der Säulenreinigung) abnehmen und bis Abschließen der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse bei 4°C aufheben.
5. Ni²⁺-NTA-Agarose (mit gebundenem His₆-markiertem Protein) mit 3x 6 ml Waschpuffer (enthält 20 mM Imidazol) waschen. Nach der Zugabe des Waschpuffers jedes Mal resuspendieren und 5 min stehen lassen. Dann 10 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugieren. Waschfraktionen bis Abschließen der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse bei 4°C aufheben.
6. His₆-markiertes Protein mit 3x 1,5 ml pro 1 l Kultur mit Elutionspuffer (Phosphatpuffer B mit 250 mM Imidazol) eluieren. Dazu gut resuspendieren und 10 min stehen lassen. Dann 10 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugieren. Ein Aliquot (50 µl) für die Bilanzierung der Reinigung und die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse abnehmen.
7. Um das Imidazol zu entfernen, eine Dialyse anschließen (B.5.2). Soll zusätzlich das Protein über Ionenaustauschchromatographie (B.5.4) gereinigt werden, bei der Dialyse auch Salzkonzentration entsprechend reduzieren (Beobachten! Beim Entsalzen kann das Protein ausfallen).
8. Reinigung bilanzieren und alle Aliquots der Fraktionen mit 4x SDS-Probenpuffer versetzen und 10 min bei 95°C denaturieren. Mit diesen sollte eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung) und Western Blot-Analyse durchgeführt werden (B.5.7).

Tab. 6. Puffer für die Affinitätsreinigung His₆/Ni²⁺ im batch-Verfahren.

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung
Äquilibrierung	Phosphatpuffer
Waschen	Phosphatpuffer A
Elution	Phosphatpuffer B
Regeneration	Phosphatpuffer C
Lagerung	50% Ethanol bei 4°C

ÄKTA-Säulenreinigung

1. Auftragsschleife Superloop 50 (Füllvolumen 50 ml) mit Phosphatpuffer füllen und einbauen. Gefilterte und entgaste Puffer anhängen und den Puffer mit einer Luer-Lock-Spritze in die Pumpen ziehen. Pumpen und System gut waschen, um evtl. vorhandene Luft zu entfernen. HisTrap-Säule(n) (je 1 ml, GE Healthcare) luftblasenfrei einbauen.
2. Deckel von genügend 1,5 ml Reaktionsgefäßen entfernen und diese in den Fraktionssammler positionieren.
3. Programm mit den Einstellungen und Puffern in **Tab. 7** laufen lassen. Während des Äquilibrierens geklärteter Bakterien- (B.4) oder Sf9- (B.4.2) Zellextrakt über eine 50 ml-Luer-Lock-Spritze in die Auftragsschleife füllen.
4. Durchlauf und Waschfraktion manuell sammeln.

5. Zum Eluieren in den Fraktionssammler einhängen.

Tab. 7. Parameter für die His₆/Ni²⁺-Affinitätsreinigung (ÄKTA). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	Volumen
Äquilibrierung	10 bis 20 Säulenvolumen Phosphatpuffer	5 CV [*]
Ladung	Geklärtes Zellextrakt	0-50 ml
Waschen	Phosphatpuffer A	30 CV ^{**}
Elution	Phosphatpuffer B	15 CV ^{**}
Regeneration	Phosphatpuffer C	10 CV
Lagerung	20% Ethanol	-

* CV - Säulenvolumen

** bzw. bis die OD auf die Basislinie zurückfällt

B.5.2. Interaktionsanalyse

Eine Abwandlung der Affinitätschromatographie (B.5.1) kann zum Nachweis von Interaktionen zwischen zwei oder mehreren Proteinen verwendet werden. Eines der Proteine wird klassisch an eine entsprechende Affinitätsmatrix gebunden. Falls andere Proteine mit diesem einen Komplex bilden, werden sie indirekt an der stationären Phase zurückgehalten. Nach der Elution befinden sich folglich alle Interaktionspartner im Eluat und können über SDS-PAGE und Western Blot identifiziert werden. Eine wichtige Kontrolle bei dieser Art von Experimenten ist der Nachweis, dass die Interaktionspartner selbst nicht an die Affinitätsmatrix binden.

Interaktionsanalysen können im Zellextrakt oder mit den gereinigten Proteinen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die potentiellen Interaktionspartner in Sf9-Zellen rekombinant coexprimiert und die Interaktionsanalyse wurde mit dem Zellextrakt durchgeführt.

1. 200 µl Ni²⁺-NTA-Agarose (50% Suspension in Ethanol) pro Ansatz mit der doppelten Menge Waschpuffer waschen. Für 2 min bei 1500 x g zentrifugieren und Überstand verwerfen.
2. Agarose in 10 ml Phosphatpuffer resuspendieren, wie gehabt abzentrifugieren und Überstand erneut verwerfen.
3. Agarose in 500 µl Phosphatpuffer pro Ansatz resuspendieren und auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilen. 2 min bei 1500 x g zentrifugieren und Überstand verwerfen.
4. 500 µl geklärtes Zelllysat (B.4.2.1, 50 µl Aliquot) in Reaktionsgefäß mit vorbereiteter Ni²⁺-NTA-Agarose überführen und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler (2 rpm) inkubieren.
5. Pellet 1x mit 2 ml Phosphatpuffer waschen. In 500 µl Phosphatpuffer aufnehmen (50 µl Aliquot).
6. Geklärtes Lysat mit Ni²⁺-NTA-Agarose 2 min bei 1500 x g zentrifugieren, Überstand abnehmen (50 µl Aliquot).

Material und Methoden

7. Agarose mit 3x 12 ml Waschpuffer waschen (Überstände aufheben).
8. Agarose mit 500 µl Waschpuffer waschen (50 µl Aliquot). Waschfraktion über Bradford (B.5.5) auf Proteingehalt überprüfen. Falls noch eine starke Blaufärbung zu sehen ist, erneut mit 12 ml Waschpuffer waschen.
9. Elution mit 500 µl Elutionspuffer (100 µl Aliquot).
10. Zu allen Proben werden unverzüglich 17 µl 4x PP (Eluat: 34 µl) zugesetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht.

B.5.3. Dialyse

Die Dialyse dient dem Entfernen kleiner Moleküle oder Ionen aus Proteinlösungen. Dieser Methode liegt die Diffusion durch eine semipermeable Membran mit einer definierten Ausschlussgröße (cut-off) zugrunde. So hält die Membran alle Moleküle, die größer als die Ausschlussgrenze sind zurück, während die kleineren, dem Konzentrationsgefälle folgend, durch die Poren passieren können. Die Methode eignet sich zum Entsalzen, Umpuffern, Entfernen störender niedermolekularer Substanzen oder Aufkonzentrieren einer Proteinlösung. Für letzteres wird die Tatsache ausgenutzt, dass obwohl die Membran Ionen durchlässt, das durch Osmose getriebene Wasser viel schneller in Richtung hoher Salzkonzentration strömt.

1. Ausgekochten⁵ Dialyseschlauch (Länge ca. 25 cm für 10 ml Proteinlösung) aus Aufbewahrungslösung (10 mM EDTA, pH 8,0) entnehmen, in ein Becherglas mit H₂O überführen und die Innenseite des Schlauches mehrmals mit Wasser, dann mit dem Puffer, in dem die Dialyse durchgeführt werden soll, durchspülen. Den Schlauch auf einer Seite mit zwei Klammern verschließen. Es kann zusätzlich ein Knoten gemacht werden.
2. Schlauch bis zu ca. der Hälfte mit Proteinlösung füllen, Luft oberhalb der Lösung bis $\frac{1}{4}$ unter dem Schlauchende auspressen und an der Stelle durch weitere zwei Klammern verschließen.
3. Dialyseschlauch in einen 2-5 l Puffer (2000x das Volumen der Proteinlösung, in dem Fall wurde Phosphatpuffer bzw. Phosphatpuffer E⁶ benutzt) aufrecht tauchen und oberes Ende des Schlauches über einen Styropor-Schwimmer an die Oberfläche fixieren. Die Konstruktion soll das freie Drehen des Schlauches in der Lösung durch einen Magnetrührer erlauben, um die Effizienz der Dialyse zu erhöhen.
4. 1 h bei Raumtemperatur dialysieren. Nach 15 min kontrollieren.
5. Schlauch in frische 2-5 l Puffer (Phosphatpuffer bzw. Phosphatpuffer E) mit 20% Glycerol überführen und weitere 4 h bei Raumtemperatur dialysieren. Nach 15 min kontrollieren.
6. Proteinlösung aus dem Schlauch herauspipettieren und in Reaktionsgefäß bzw. Plastikröhrchen überführen. Mit 1/10 Volumen (Puffer + 20% Glycerol) nachspülen.

⁵ Zweimal in jeweils frischem 10 mM EDTA, pH 8,0 autoklavieren.

⁶ Bei einer hoch konzentrierten Proteinlösung ($\approx 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) kann das Protein bei einer niedrigen Salzkonzentration (100 mM) ausfallen (vgl. C.3.2). In diesem Fall Phosphatpuffer E (300 mM NaCl) statt den Phosphatpuffer (100 mM) verwenden.

7. Lösung einer Proteinbestimmung unterziehen und mit der Konzentration der Ausgangslösung vergleichen, um evtl. Verluste zu ermitteln.

B.5.4. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer effektiven Oberflächenladung. Da die meisten Proteine einen isoelektrischen Punkt im Bereich von 5,5 – 7,5 besitzen, sind die meisten Proteine unter physiologischen Bedingungen negativ geladen und binden somit an Anionenaustauschersäulen (funktionelle Gruppen z.B. Diethylaminoethyl, DEAE; quartäre Ammoniumionen, Q). Eine kleinere Zahl weist eine starke positive Ladung auf und kann an die anionischen Gruppen (z.B. Carboxymethyl, CM; Sulfopropyl, SP) einer Kationenaustauschersäule binden. Die elektrostatischen Kräfte, die die Proteine an den funktionellen Gruppen der Säulen halten, sind unterschiedlich stark und können bei einem bestimmten Salzgehalt oder pH-Wert aufgehoben werden. So kann eine Proteinmischung durch einen Salz- oder pH-Gradienten fraktioniert werden. Einige Proteine sind in der Summe gar nicht geladen und eignen sich nicht zur Auftrennung über diese Methode. Die Methode der Ionenaustauschchromatographie eignet sich weniger für die ersten Schritte einer Reinigung, als vielmehr zur einfachen und effektiven Beseitigung noch vorhandenen Verunreinigungen einer bereits relativ homogenen Proteinpräparation.

Verwendet wurde die Kationenaustauscher-Säule „HiTrap SP HP“ (1 ml, *GE Healthcare*), die Parameter des Laufes sind in **Tab. 8** zusammengefasst.

1. Zunächst Testlauf mit einem kleinen Volumen durchführen, um die speziellen Elutionsbedingungen zu ermitteln.
2. Phosphatpuffer (100 mM NaCl) und Puffer C (1 M NaCl) vorbereiten, sterilfiltrieren (0,45 µm) und entgasen. Bei konzentrierten Proteinlösungen ($\approx 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (vgl. C.3.2) Phosphatpuffer E (300 mM NaCl) statt den Phosphatpuffer (100 mM) verwenden.
3. 2 ml in die kleine Schleife der ÄKTA laden.
4. Einen Gradienten von 0 auf 100% Phosphatpuffer C in 20 min aufbauen.
5. Fraktionen von 1 ml sammeln und die mit hoher UV-Absorption auf Proteingehalt (Bradford) und in SDS-PAGE analysieren.
6. Bedingungen vermerken und die gesamte vorhandene Proteinlösung in den *Superloop* (Volumen bis 50 ml) laden.

Tab. 8. Parameter für die Kationenaustauschchromatographie (ÄKTA). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	Volumen
Äquilibrierung	Phosphatpuffer bzw. E	10 CV*
Ladung	Proteinlösung	≤ 50 ml
Waschen	Phosphatpuffer bzw. E	15 CV
Gradient	0-100% Phosphatpuffer C	15-20 CV
Reäquilibrierung	Phosphatpuffer	5 CV
Lagerung	20% Ethanol	-

* CV - Säulenvolumen

B.5.5. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird photometrisch über einfache kolorimetrische Reaktionen durchgeführt. Über den Vergleich der Farbintensität der unbekannt Proben mit derjenigen bekannter Konzentrationen kann der gemessenen Absorption eine Konzentration zugeordnet werden (Eichreihe).

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) ist optimal zum Nachweis von Proteinkonzentrationen zwischen 20 - 100 µg/ml geeignet. Beim Bradford-Test wird die Eigenschaft des Coomassie-Brilliantblau G250 genutzt, in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm zu verschieben. Der Grund für die Verschiebung ist die Stabilisierung der unprotonierten Sulfonat-Form des Farbstoffs durch Komplexbildung mit den Seitenketten von Arg, Lys, His, Trp, Tyr und Phe des Proteins. Ein Nachteil, der sich daraus ergibt, besteht in der Abhängigkeit der Farbintensität von der Aminosäurezusammensetzung. Zusätzlich macht die Beeinflussbarkeit des Tests durch minimale (0,1%) SDS-Mengen diesen unbrauchbar bei Proteinlösungen in SDS-haltigen Puffern (z.B. nach Gewebe- oder Zellyse).

1. 30 µl der BSA-Eichreihe mit folgernden Konzentrationen als Doppelwerte in 96-Loch-Platte (flacher Boden) vorlegen: 0; 12,5; 25; 50; 100 und 200 µg/ml (als Nullwert H₂O).
2. 30 µl jeder zu bestimmenden Probe als Doppelwert in zwei verschiedenen Verdünnungen vorlegen (am besten erst 1 - 30 µl direkt zu Bradford-Reagenz zugeben und anhand der Blaufärbung die Verdünnungen festlegen).
3. je 200 µl Bradford-Reagenz zu den Proben pipettieren, 5 min bei RT inkubieren und OD₅₉₅ photometrisch bestimmen.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erlaubt den optimalen Nachweis bei Proteinkonzentrationen zwischen 1 - 400 µg/ml. Das Prinzip nach Lowry [Peterson's Modifikation, (Lowry et

al., 1951; Peterson, 1977)] basiert auf zwei Reaktionen. Zunächst erfolgt die Biuret-Reaktion, in der alkalisches Kupfer-Tartrat mit den Peptidbindungen der Proteine Komplexe bildet, gefolgt von der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , welches letztendlich Wolframat und Molybdat des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zu einem blauen Produkt reduziert.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Total Protein Kit (*Sigma*) bei OD_{650} durchgeführt. Die bei der Isolierung von Protein aus Gewebe oder adhären Zellen verwendeten Lysepuffer (s. S. 23) enthalten meist ein reduzierendes Reagenz (β -Mercaptoethanol oder DTT), was die Lowry-Farbreaktion stört. In diesem Fall soll der Proteinbestimmung eine TCA-Fällung vorausgehen, um die störenden Agenzien zu beseitigen.

1. 200 μl der BSA-Eichreihe mit folgernden Konzentrationen als Doppelwerte mit H_2O auf 1 ml auffüllen: 0; 12,5; 25; 50; 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (als Nullwert H_2O).
2. 10 μl und 50 μl Zellysat als Doppelwerte mit H_2O auf 1 ml auffüllen (10 μl und 50 μl des Lysepuffers als Referenz mitbehandeln).
3. 100 μl Deoxycholol (DOC) Lösung zufügen, gut mischen, 10 min stehen lassen.
4. Zur Fällung der Proben 100 μl Trichloressigsäure (TCA) zufügen, gut mischen (Schutzbrille!).
5. 5 min bei 18 000 x g und RT zentrifugieren, Überstand abkippen (umgedreht auf Filterpapier).
6. Farbreaktion durchführen: getrocknetes Pellet in 200 μl Lowry Reagent Solution resuspendieren.
7. 200 μl H_2O zugeben, mischen und 20 min stehen lassen.
8. 100 μl „Folin Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution“ zugeben und sofort gut mischen, 30 min stehen lassen. Je 200 μl der BSA-Reihe, der Referenzen und der Proben in 96-Lochplatte (flacher Boden) überführen und OD_{650} messen.

B.5.6. Proteinfällung

Die Möglichkeit Proteine zu präzipitieren erlaubt das schnelle Aufkonzentrieren dieser. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Fällung nach Wessel und Flüge (Wessel and Flugge, 1984) diente lediglich bei ungenügender Proteinkonzentration dem Einengen von Zellysaten für die Durchführung einer SDS-PAGE (B.5.7). Weitere funktionelle Tests können mit den auf diese Weise präzipitierten Proben nicht durchgeführt werden, da die Proteine denaturiert werden. Bei der Fällung bilden sich eine hydrophile und eine hydrophobe Phase, wobei die Proteine an die Phasengrenze gedrängt werden.

1. 150 μl Proteinlösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben (wenn das Volumen kleiner ist, auf 150 μl mit H_2O auffüllen).

2. 600 µl Methanol und 150 µl Chloroform zugeben und vortexen (Abzug!).
3. 450 µl H₂O zugeben, vortexen und 2 min bei 18 000 x g und RT zentrifugieren.
4. Obere wässrige Phase abnehmen und verwerfen (das Protein befindet sich in Interphase).
5. Zugabe von 450 µl Methanol, vortexen und 2 min bei 18 000 x g und RT zentrifugieren.
6. Überstand verwerfen und Pellet ca. 10 min trocknen lassen.
7. Pellet in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufnehmen (ergibt eine 3-fache Konzentrierung), 10 min bei 95°C erhitzen und kurz abzentrifugieren.

B.5.7. SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western Blot

Proteine werden nach Behandlung mit SDS, das sich in einem Verhältnis von 1,4 g SDS an 1 g Protein anlagert, denaturiert – insbesondere bei gleichzeitiger Reduktion durch DTT oder β-Mercaptoethanol – und erhalten ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis. So können diese durch Anlegen elektrischer Spannung im engmaschigen Netz eines Polyacrylamidgels nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Bei dieser sog. SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden die Proteine im niederprozentigen Sammelgel (4% Acrylamid/Bisacrylamid) fokussiert und im hochprozentigen Trenngel (8-13% Acrylamid/Bisacrylamid) getrennt. Je nach zu trennendem Molekulargewichtsbereich werden zwei Puffersysteme benutzt: für Proteine zwischen 30 und 250 kDa wird ein Glycin-haltiger Puffer (Laemmli, 1970) benutzt, für Proteine zwischen 6 und 30 kDa ein Tricin-haltiger Puffer (Schagger and von Jagow, 1987).

Nach Beenden des Laufes kann das Gesamtprotein durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau R250 sichtbar gemacht werden oder das Gel kann zur Detektion einer bestimmten Proteinbande im Western Blot eingesetzt werden. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit das Protein elektrophoretisch vom Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert. Die spezifischen primären Antikörper wurden durch Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper über ECL (*enhanced chemiluminescence*) detektiert. Dieselbe Membran wurde zum Nachweis mehrerer Proteinbanden auseinander geschnitten und die Streifen wurden mit verschiedenen Antikörpern behandelt.

Die Proben sollten für die SDS-PAGE mit 4x SDS-Probenpuffer (Probenvolumen/3=nötiges Volumen) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert werden. Als Größenstandard wurde SeeBlue®Plus2 (*Invitrogen*) verwendet. Die optimalen Auftragsmengen je nach Anwendung sind in **Tab. 9** zusammengefasst.

Material und Methoden

Tab. 9. Proteinauftragsmengen für das SDS-Gel je nach Anwendung (Coomassie-Färbung oder Western Blot). Das Volumen bezieht sich auf Gele mit 15 Taschen.

Anwendung	Auftrag	Zellextrakt (<i>E. coli</i> /Sf9)/ Fraktionen der Reinigung	Gereinigtes Protein	Zellextrakt**
Coomassie	5 bis 12 µl	50-100 µg / gleiche Volumenfraktionen*	2 µg	20-30 µg
Western Blot		2,5-5 µg / gleiche Volumenfraktionen* (1:20 verdünnt im Vgl. zu Coomassie)	50-100 ng	20-30 µg

* je nach Volumen der Fraktionen – im Allgemeinen bekommt man von 1 l Bakterienkultur ≈ 100-150 mg Protein

** aus Zellen oder Gewebe, in denen die zu untersuchenden Proteine in physiologischen Mengen vorkommen (nicht überexprimiert)

SDS-PAGE

1. 0,75 mm Glasplatten des Protean III Systems (Biorad) mit Ethanol reinigen, im Gießstand einspannen und Gel-Lösungen (**Tab. 10** oder **Tab. 11**) bis auf TEMED und APS, die direkt vor dem Gießen der Gele zugegeben werden, vorbereiten.
2. Trenngel (TEMED und APS zugeben) bis 1 cm unterhalb der Oberkante der kleinen Glasplatte gießen und mit 100% Ethanol überschichten. 45 min polymerisieren lassen.
3. 100% Ethanol mit Wasserstrahlpumpe abnehmen und (TEMED und APS zugeben) Sammelgel gießen und Kamm einsetzen (mit 10 Taschen für Proben mit Volumen bis 18 µl; mit 15 Taschen für Proben mit Volumen bis 12 µl). 45 min polymerisieren lassen.
4. Glasplatten mit fertig gegossenen Gelen in die Elektrophoresekammer montieren.
 - a. für Glycin-SDS-PAGE – 500 ml Glycin-SDS-Laufpuffer in die innere (≈ 150 ml) und äußere Kammer (≈ 350 ml) füllen. Elektrophorese 10 min bei 100 V, dann 50 min bei 150 V durchführen (Lauf über die Markerbanden kontrollieren).
 - b. für Tricin-SDS-PAGE ≈ 150 ml Kathoden-Laufpuffer in die innere, 300 ml Anoden-Laufpuffer in die äußere Kammer füllen. Elektrophorese 20 min bei 60 V, dann 2 h bei 110 V durchführen (Lauf über die Markerbanden kontrollieren).

Tab. 10. Zusammensetzung der Gele für Glycin-SDS-PAGE.

Reagenzien	8% Trenngel		12% Trenngel		4% Sammelgel	
	2 Gele	4 Gele	2 Gele	4 Gele	2-4 Gele	
Rotiphorese® Roth (4°C) 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	2,7 ml	5,4 ml	4 ml	8 ml	4 ml	8 ml
4xTrisCl/SDS (4°C) Für das Trenngel: pH 8,8 Für das Sammelgel: pH 6,8	2,5 ml	5 ml	2,5 ml	5 ml	2,5 ml	5 ml
H ₂ O	4,7 ml	9,4 ml	3,4 ml	6,8 ml	3,4 ml	6,8 ml
TEMED (4°C)	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl
20% Ammoniumpersulfat (APS, -20°C)	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl
Σ	10 ml	20 ml	10 ml	20 ml	10 ml	20 ml

Material und Methoden

Tab. 11. Zusammensetzung der Gele für Tricin-SDS-PAGE.

Reagenzien	13% Trenngel		4% Sammelgel	
	2 Gele	4 Gele	2 Gele	4 Gele
24,25% Acrylamid/ 0,75% Bisacrylamid (4°C)	5,3 ml	10,6 ml	0,5 ml	1 ml
Gelpuffer (4°C)	3,3 ml	6,6 ml	0,75 ml	1,55 ml
Glycerin	1,3 g	2,6 g	-	-
H ₂ O	1,3 ml	2,6 ml	1,85 ml	3,7 ml
TEMED (4°C)	10 µl	20 µl	6 µl	12 µl
20% Ammoniumpersulfat (APS, -20°C)	20 µl	40 µl	15 µl	30 µl
Σ	10 ml	20 ml	3,12 ml	6,25 ml

Coomassie-Färbung

1. Kleine Glasplatte vorsichtig abhebeln, Sammelgel entfernen, Trenngel durch vorsichtiges Anheben in eine Plastikschaale mit Färbelösung (≈ 50 ml) fallen lassen.
2. In der Mikrowelle 1 min bei 800 W aufkochen.
3. 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
4. Färbelösung abnehmen und ≈ 50 ml Entfärber auf das Gel geben.
5. In der Mikrowelle 1 min bei 800 W aufkochen.
6. 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
7. Entfärberlösung durch frische austauschen (≈ 50 ml), bei RT auf dem Schüttler entfärben bis die Hintergrundfärbung verschwindet, evtl. noch mal Entfärberlösung wechseln.

Western Blot

1. 16 Stück Whatman Papier pro Blot zurechtschneiden (Maße: 9 x 8 cm). 4 Stück in Anodenlösung I, 4 Stück – in Anodenlösung II, 8 Stück – in Kathodenlösung eintränken. PVDF-Membran zurechtschneiden, in technischem Methanol fixieren und mit Anodenlösung II befeuchten.
2. Gel aus der Elektrophoresekammer herausnehmen, kleine Glasplatte vorsichtig abhebeln, Sammelgel entfernen.
3. Blot aufbauen wie folgt:

Kathode



Kathodenplatte

8 WP in Kathodenlösung

Gel (durch Anheben mit einem befeuchteten Spatel auf die Membran überführen)

PVDF-Membran

4 WP in Anodenlösung II

4 WP in Anodenlösung I

Anodenplatte

Material und Methoden

4. 1 h mit 50 mA/Blot blotten.
5. Blot auseinanderbauen, Markerbanden auf der Membran mit Bleistift nachzeichnen, evtl. horizontal schneiden (je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins oberhalb und unterhalb einen ≈ 2 cm Streifen ausschneiden).
6. 1 h in 5% Milchpulver in TBS-T blocken.
7. 3 min in TBS-T waschen.
8. Streifen in das 50 ml-Plastikröhrchen mit dem jeweiligen verdünnten primären Antikörper (≈ 10 ml) einbringen.
9. 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubieren.
10. 3x 5 min in 1% Milchpulver in TBS-T waschen.
11. Sekundären Antikörper in 20-40 ml 1% Milchpulver in TBS-T verdünnen (meist 1:2000) und Blot 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubieren.
12. 2x 5 min mit 1% Milchpulver in TBS-T und 1x 5 min in TBS-T waschen.
13. Je nach Stärke des zu erwartenden Signals:
 - a. Schwaches Signal: ECL (*GE Healthcare*). Lösung A und B 50%:50% mischen, auf den Blot pipettieren und mit einer serologischen Pipette verteilen.
 - b. Starkes Signal: ECL (Luminol, *Sigma* und H_2O_2). Folgende Lösung zusammenpipettieren und Blot in der Lösung 1 min abgedeckt bei RT inkubieren:

❖ Luminol (0,3 %)		10 ml
❖ H_2O_2 (30%)	0,15 ‰	5 μl
❖ Enhancer (0,1%)	0,002 ‰	20 μl
14. Blot auf eine Glasplatte montieren, mit Saran-Folie überdecken und im Dunkeln (Rotlicht) entwickeln. Die Expositionszeit der Fotofilme beträgt bei ECL (*GE Healthcare*) 1-10 s, bei ECL (Luminol und H_2O_2) 20-180 s.

B.5.8. Analytische Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein Trennverfahren, bei dem Moleküle nach ihrer Größe bzw. Konformation aufgetrennt werden können (Porath and Flodin, 1959). Dabei ist die Säule mit kleinen Kügelchen (Durchmesser: 5 – 15 μm) eines porösen hochvernetzten Polymers gefüllt. Moleküle verschiedener Größe und Konformation haben eine unterschiedliche Laufzeit, da die kompakteren während des Laufes die Poren des Polymers penetrieren können und daher, im Vergleich zu größeren Molekülen, verlangsamt werden. Größere Moleküle durchlaufen die Säule demnach schneller.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Homogenität einer Proteinpräparation, wie auch die Quartärstruktur von Proteinen (monomere oder dimere Form) analysiert. Verwendet wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule (13 μm Partikelgröße, *GE*

Material und Methoden

Healthcare). Als Standard wurden Kalibrierproteine (Combithek Eichproteine I, MG 18 000-300 000, *Boehringer Mannheim GmbH*) verwendet.

1. Es sollten maximal 500 µl aufgetragen werden, besser jedoch weniger, da mit dem Auftragsvolumen das Auflösungsvermögen sinkt.
2. Proteinlösung (≈ 100 µg) 10 min bei 10 000 x g und 4°C abzentrifugieren und Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
3. Auftragsschleife (Füllvolumen 100 µl oder 500 µl), gefilterte und entgaste Puffer anhängen und den Puffer mit einer Luer-Lock-Spritze in die Pumpen ziehen. Pumpen und System gut waschen, um evtl. vorhandene Luft zu entfernen. Säule luftblasenfrei einbauen.
4. Säule mit 2 Säulenvolumina (≈ 48 ml) äquilibrieren.
5. Deckel von genügend 1,5 ml Reaktionsgefäßen entfernen und diese in den Fraktionssammler positionieren.
6. Programm mit den Einstellungen in (Tab. 12) laufen lassen. Während des Äquilibrierens Auftragsschleife laden.
7. Während des ganzen Laufs 1 ml Fraktionen sammeln. Fraktionen, bei denen eine UV-Absorption beobachtet wurde, auf SDS-PAGE analysieren.

Tab. 12. Parameter für die analytische Gelfiltration (ÄKTA). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	Volumen
Äquilibrierung	Phosphatpuffer + 5%Glycerol	2 CV*
Ladung	Proteinlösung (50-100 µg)	100-500 µl
Lauf	Phosphatpuffer + 5%Glycerol	1,5 CV
Lagerung	20% Ethanol	1,5 CV

* CV - Säulenvolumen

B.5.9. Bestimmung der Kinaseaktivität (Kinase-Assay)

Die Phosphotransferaseaktivität von Proteinkinasen kann über einen radioaktiven Test bestimmt werden (Roskoski, 1983). Bei der Phosphorylierungsreaktion wird das radioaktiv markierte Phosphat von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (*GE Healthcare*) auf ein kurzes Substratpeptid (hier: GRTGRRNSI-NH₂) übertragen. Letzteres wird durch seine Bindung an Phosphocellulosepapier von der überschüssigen „gelösten“ Radioaktivität getrennt und kann anhand der Intensität der Strahlung quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die basale und cGMP-stimulierte Aktivität der cGKI bestimmt (Feil, 1994). Die Versuche wurden im Isotopenlaboratorium der Universität Tübingen durchgeführt.

1. Jeweils 3 Reaktionsgefäße (Parallelproben) pro Bedingung vorbereiten. 20 µl vorlegen: 10 µl Substanzen (z. B. Rp-PET, Rp-pCPT, *Biolog* oder HT-lβ-N) und/oder 10 µl cGMP (10x

Material und Methoden

konzentrierte Lösungen, z. B. 10^{-3} M für Endkonzentration 10^{-4} M). Bei den entsprechenden Kontrollproben (nur Substanzen oder nur cGMP) das Volumen mit je 10 μ l H₂O ausgleichen.

2. Für 1-30 Ansätze 1 ml Verdünnungspuffer pipettieren:

❖ 5x MES	1x	200 μ l
❖ BSA (1%)	0,1%	100 μ l
❖ DTT (100 mM)	10 mM	100 μ l
❖ H ₂ O		ad. 1 ml (+600 μ l)

3. Pro Ansatz folgenden Mastermix zusammenpipettieren:

❖ 5x MES	1x	20 μ l
❖ BSA (1%)	0,1%	10 μ l
❖ DTT (100 mM)	10 mM	10 μ l
❖ GRTGRRNSI-NH ₂ ⁷ (0,4 mM)	40 μ M	10 μ l
❖ ATP ⁸ (1 mM)	0,1 mM	10 μ l
❖ H ₂ O		10 μ l

4. Pro Ansatz 10 μ l einer 1 ng/ μ l cGKI-Enzymlösung (in Verdünnungspuffer) herstellen. (Stammlösungen: für Kinase-Assay \approx 0,1 μ g/ μ l)

➔ Ab hier im Isotopenlaboratorium

5. Phosphocellulosepapierstücke (1,5 x 2,5 cm) für die Proben beschriften.

6. 85 mM Phosphorsäurelösung herstellen: 10,5 ml konzentrierte Phosphorsäure (\geq 85%) in 2 l H₂O verdünnen.

7. Nach folgender Formel die aktuelle Aktivität von [γ -³²P]ATP ausrechnen: $A_{tn} = A_{t0} \times e^{-0,05 \times n}$. Daraus ergibt sich der nötige Verdünnungsfaktor F für [γ -³²P]ATP: $F = 0,5 \times A_{tn}$ ($A_{t0} = 370$ MBq/ml, n = Tage nach dem Kalibrierungsdatum).

8. Dann x^9 μ l [γ -³²P]ATP dem Mastermix zugeben und 70 μ l in die Reaktionsgefäße mit den vorgelegten Substanzen/cGMP (20 μ l) pipettieren.

9. Enzymreaktion durch Zugabe von 10 μ l cGKI (danach kurz vortexen) starten. Für die Hintergrundaktivität 3 Proben mit H₂O statt Enzym pipettieren.

10. 5 min in 30°C (Wasserbad) inkubieren.

11. 80 μ l jedes Reaktionsansatzes auf ein Phosphocellulosepapierstück pipettieren und in 800 ml 85 mM Phosphorsäure geben.

12. Mit 2x 600 ml 85 mM Phosphorsäure waschen, trocknen (Fön) und in Szintillationsgefäße mit Ultima Gold (*Perkin Elmer*) geben.

13. 10 μ l des Mastermix direkt auf Phosphocellulosepapierstücke geben und spezifische Aktivität (Szintillationsgefäße mit Ultima Gold) vermessen. Diese sollte nach der Berechnung \approx 100 cpm/pmol ATP betragen.

14. Von allen Werten die cpm der Wasserproben abziehen (Hintergrundrauschen).

⁷ freundlicher Weise synthetisiert von Dr. Echner, IFIB, Universität Tübingen

⁸ ATP (20 mM) 1:20 in Verdünnungspuffer vorverdünnen.

⁹ Wobei x = Volumen des kalten ATP im Reaktionsmix/F ist.

15. sA (spezifische Aktivität) = cpm/1250 pmol.
16. cpm der Reaktionsansätze bestimmen und Reaktionsgeschwindigkeit [mmol/(min x mg)] nach der Formel $V = \text{cpm}/\text{sA} \times 5 \text{ min} \times 8 \text{ ng}$ berechnen.

B.5.10. FRET-Messung mit dem cGMP-Indikator cGi-500

Der cGMP-Indikator cGi-500 (Russwurm et al., 2007) trägt die zwei cGMP-Bindungsstellen der cGKI, eingeschlossen zwischen YFP (*yellow fluorescent protein*) und CFP (*cyan fluorescent protein*). Bei Anregung von CFP mit 436 nm erfolgt eine Lichtemission bei 475 nm (E_{475}). Wenn sich jedoch in unmittelbarer Nähe YFP befindet ($\leq 4,9 \text{ nm}$), wird die Energie der Anregung strahlungslos von CFP auf YFP übertragen, so dass eine Emission durch YFP bei 525 nm (E_{525}) beobachtet werden kann [FRET, *Fluorescence resonance energy transfer*, (Förster, 1948)]. Dies ist der Fall, solange kein cGMP von den Indikatoren gebunden ist. Wenn cGMP bindet, ändert sich die Konformation des Indikators und das FRET-Signal nimmt ab. Die FRET-Änderung wurde durch den Quotienten E_{475}/E_{525} quantifiziert.

Die Konstruktion des cGMP-Indikators cGi-500, seine Expression in HEK293-Zellen, sowie die FRET-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. M. Russwurm (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bochum) durchgeführt.

B.6. Bioanalytische Verfahren

B.6.1. Peptidsynthese und HPLC

Bei der Fest-Phasen-Peptidsynthese (SPPS, *solid-phase peptide synthesis*) nach Merrifield (Merrifield, 1963) werden Peptide (bis zu 10 kDa) an einer festen Phase vom C- zum N-Terminus synthetisiert. Während der Synthese wird die Aminosäuresequenz durch den Einsatz von chemisch abspaltbaren Schutzgruppen der NH_2 -Gruppe sichergestellt. So vermeidet man eine Aneinanderkopplung der gleichen Aminosäure. In der vorliegenden Arbeit wurde standardmäßig Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) als Schutzgruppe benutzt. Die Peptidsynthese wurde freundlicherweise von Dr. H. Kalbacher (IFIB, Universität Tübingen) durchgeführt.

Die Peptide müssen nach der Synthese von Nebenprodukten gereinigt werden. Hierzu wurde eine RP-HPLC (*reversed-phase high-performance-liquid-chromatography*) verwendet. In der RP-HPLC erfolgt die Trennung der Komponenten eines Substanzgemisches durch ein Phasensystem, bestehend aus der polaren mobilen Phase (in der Regel wässrige Gemische von Methanol oder Acetonitril) und der unpolaren stationären Phase (chemisch modifizierte, hydrophobe Partikel auf Kieselgelbasis, z.B. Octyl-, Octadecyl-, Phenylphasen). Stark hydrophobe

Probenmoleküle halten sich somit länger an der stationären Phase auf bzw. werden stärker retardiert als Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen.

In dieser Arbeit wurden die Peptide mit C₈-Säulen (150 x 10 mm) mit einer Kieselgröße 5 µm gereinigt. Für die semipräparative Chromatographie wurden zwei Puffersysteme benutzt: Puffer A (0,05% Trifluoressigsäure in H₂O) und Puffer B (0,05 % Trifluoressigsäure/80% Acetonitril in H₂O). Ein Gradient von 80:20 (v/v) Puffer A/Puffer B auf 20:80 (v/v) Puffer A/Puffer B wurde innerhalb 40 min aufgebaut.

B.6.2. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse ionisierter Moleküle im Hochvakuum anhand des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z). Dafür müssen die zu analysierenden Moleküle zunächst ionisiert werden. Bei der Elektrospray-Ionisierung (Fenn et al., 1989) handelt es sich um eine sanfte Methode der Ionisierung von Probenmolekülen, bei der auch empfindliche Moleküle und nicht kovalente Aggregate ionisiert werden können. Ein charakteristisches Phänomen bei der ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*) ist die Bildung von Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Puffers ([M+Na]⁺). Anschließend kann m/z der ionisierten Moleküle z. B. über eine Ionenfalle bestimmt werden. Die ESI-MS wurde freundlicherweise von Dr. A. Beck (Zentrum für Klinische Massenspektrometrie GmbH, Heilbronn) durchgeführt.

Rp-PET, PET, Rp-pCPT und pCPT (10 mM) wurden mit H₂O:acetonitril (50:50, v/v) auf 0,5 mM verdünnt. Vermessen wurde jede Substanz alleine, sowie die Mischungen aus Rp-PET/PET und Rp-pCPT/CPT („Spiken“) in einem Verhältnis von 70:30; v/v. Mit Hilfe einer Pumpe (Parmer Infusion 74900) wurden die Lösungen mit 4 µl/min in den Ionisator (Bruker-Daltonics) im negativen Ionenmodus eingespritzt. Die Massenspektren (50-1000 m/z) wurden mittels einer HCT Plus Ion-Trap (mit einer Geschwindigkeit von 8100 m/z pro Sekunde) aufgenommen. Die Einstellungen waren: Trockengas – 5 l/min, Temperatur – 300°C, Zerstäuber – 10 psi und Spannung – 4000 V.

C. Ergebnisse

C.1. Charakterisierung der Effekte von Rp-PET auf die cGKI

Von allen kommerziell erhältlichen cGKI-Inhibitoren wurde Rp-PET bisher als einer der potentesten und spezifischsten angesehen. Um seine Wirkung in intakten Zellen zu validieren, wurden cGKI-abhängige Prozesse in VSMCs untersucht, die sowohl eine direkte Folge der cGKI-Aktivität [die Phosphorylierung des cGKI-Substrates VASP, (Halbrugge et al., 1990)] als auch den komplexen Vorgang der Zelladhäsion (Wachstum) einschließen (Weinmeister et al., 2008). Zusätzlich wurden die *in vitro* Aktivitäten der gereinigten cGKI-Isoformen und eines FRET-Indikators, der die cGMP-Bindungsstellen der Kinase trägt, in Anwesenheit des Inhibitors analysiert. Die Homogenität der Substanz wurde über Massenspektrometrie verifiziert.

C.1.1. Einfluss von Rp-PET auf das cGKI-abhängige Wachstum von VSMCs

Es wurde gezeigt, dass 8-Br-cGMP das Anwachsen primärer VSMCs aus WT-Mausarten innerhalb der ersten 72 h beschleunigt, während es keinen Einfluss auf die Adhäsion von cGKI-Knockout-VSMCs hat (Weinmeister et al., 2008; Wolfsgruber et al., 2003). Nun wurde der Effekt von Rp-PET auf diesen cGMP/cGKI-vermittelten Vorgang untersucht. Dazu wurden Primärkulturen mit VSMCs aus Mausarten angelegt (B.2.2.1) und die Anzahl der angewachsenen Zellen nach 72 h bestimmt (B.2.2.3).

Die relative Anzahl adhärenter WT-Zellen unter 8-Br-cGMP-Zugabe (100 μ M) war ca. 2,5-mal höher als die Kontrolle ohne 8-Br-cGMP. Rp-PET (100 μ M) konnte das 8-Br-cGMP-induzierte Wachstum (100 μ M) nicht signifikant beeinflussen. Allerdings wiesen die nur mit Rp-PET (100 μ M) behandelten VSMCs ein signifikant erhöhtes Wachstum auf (1,6-mal höher als die unbehandelte Kontrolle), das aber schwächer war als das durch 8-Br-cGMP stimulierte Wachstum (**Abb. 5A**, links). Dieser proadhäsive Effekt kam über die Aktivierung der cGKI zustande, da Rp-PET (100 μ M) keine Wirkung auf das Anwachsverhalten von cGKI-Knockout-VSMCs hatte (**Abb. 5A**, rechts).

Das Ausbleiben einer Hemmung der cGKI-vermittelten Adhäsion konnte weder auf Abbau, noch auf mangelnde Zellmembrangängigkeit zurückzuführen sein, da in Abwesenheit von cGMP der agonistische Effekt von Rp-PET klar beobachtet werden konnte. Durch Änderung der Mengenrelation zwischen dem Aktivator und dem Inhibitor könnte die Bindung des Inhibitors bevorzugt werden. Das Verhältnis von Rp-PET zu 8-Br-cGMP wurde zugunsten des Inhibitors verschoben, so dass dieser in 4-

Ergebnisse

fachem Überschuss vorlag (200 μ M Rp-PET vs. 50 μ M 8-Br-cGMP). Unter diesen Bedingungen konnte Rp-PET die 1,8-fache Induktion des Wachstums durch 8-Br-cGMP in WT-VSMCs auf Kontrollwachstum reduzieren (**Abb. 5B**).

Diese Ergebnisse deuteten auf eine komplexere Wirkung von Rp-PET auf die cGMP/cGKI-vermittelte Adhäsion von VSMCs. Dies veranlaßte die Untersuchung der Effekte von Rp-PET auf einen anderen cGKI-abhängigen Prozess, nämlich die Phosphorylierung des Substratproteins VASP.

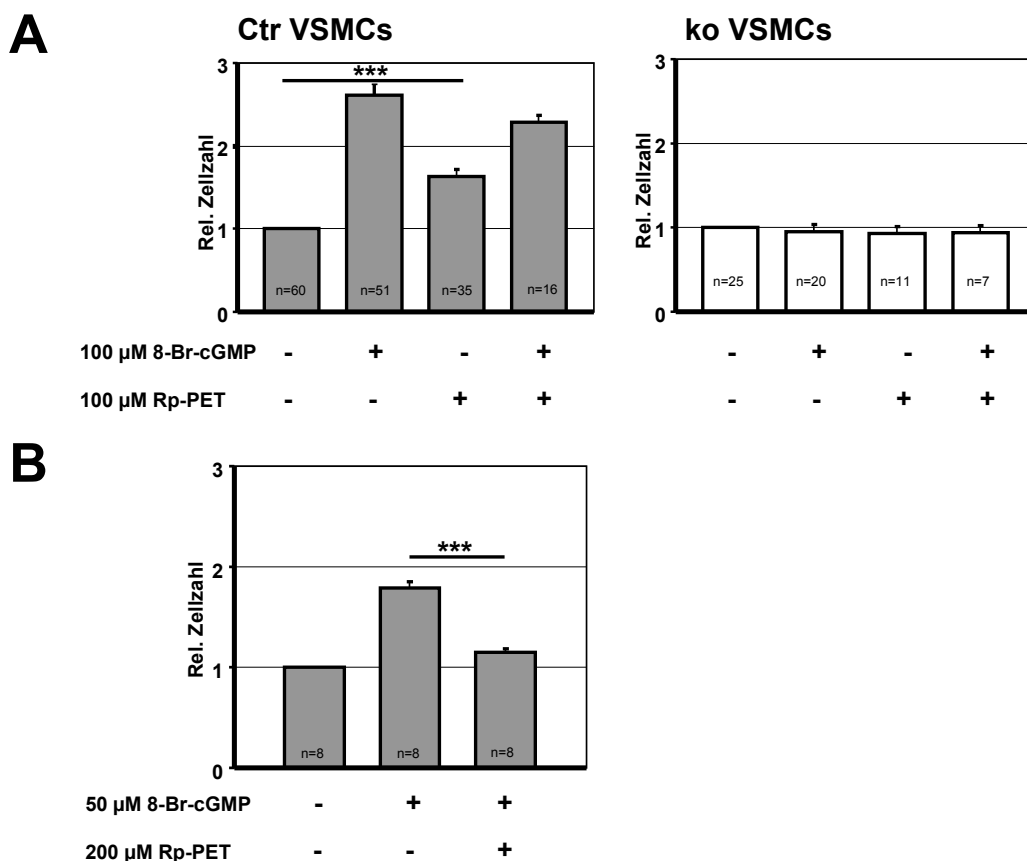


Abb. 5. Einfluss von Rp-PET auf das cGKI-vermittelte Wachstum in VSMCs. 25 000 Zellen/Loch wurden unter direkter Zugabe der Pharmaka in 96-Lochplatten ausgesät und die Anzahl der adhärennten Zellen wurde nach 72 h durch Toluidinblau- (**A**) oder MTS-Assay (**B**) bestimmt. Beide Assays liefern prinzipiell vergleichbare Ergebnisse (Weinmeister, 2006). Die Zellzahl wurde auf die Messwerte der unbehandelten Zellen normalisiert (rel. Zellzahl). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. **A.** Effekte von Rp-PET auf das Wachstum primärer VSMCs aus WT-(links, graue Säulen) und cGKI-Knockout-Mäusen (rechts, weiße Säulen). Die n-Zahl kommt durch Poolen der einzelnen Löcher (96-Lochplatte) (≥ 4) mehrerer Experimente (≥ 3) zustande (***, $p < 0,001$). **B.** Rp-PET wurde in 4-fachem Überschuss zu 8-Br-cGMP auf primäre WT-VSMCs gegeben. Die n-Zahl gibt die Anzahl der einzelnen Löcher (96-Lochplatte) an, die von einem repräsentativen Experiment stammen (***, $p < 0,001$).

C.1.2. Einfluss von Rp-PET auf die cGKI-abhängige VASP-Phosphorylierung in VSMCs

VASP ist ein cytoskelettales Protein, das an mindestens drei Stellen sowohl durch cGKI, als auch durch cAK (cAMP-abhängige Proteinkinase) phosphoryliert werden kann. Im Western Blot wird die Phosphorylierung an Ser¹⁵⁷ anhand einer Änderung des Laufverhaltens von VASP während der SDS-PAGE zu scheinbar höherem Molekulargewicht sichtbar. VSMCs wurden aus Mausarten isoliert (B.2.2.1) und wie unter B.2.2.2 beschrieben kultiviert. Die Behandlung primärer adhärenter VSMCs (9 Tage in Kultur) mit 8-Br-cGMP (100 µM, für 30 min) induzierte die Phosphorylierung von VASP an Ser¹⁵⁷.

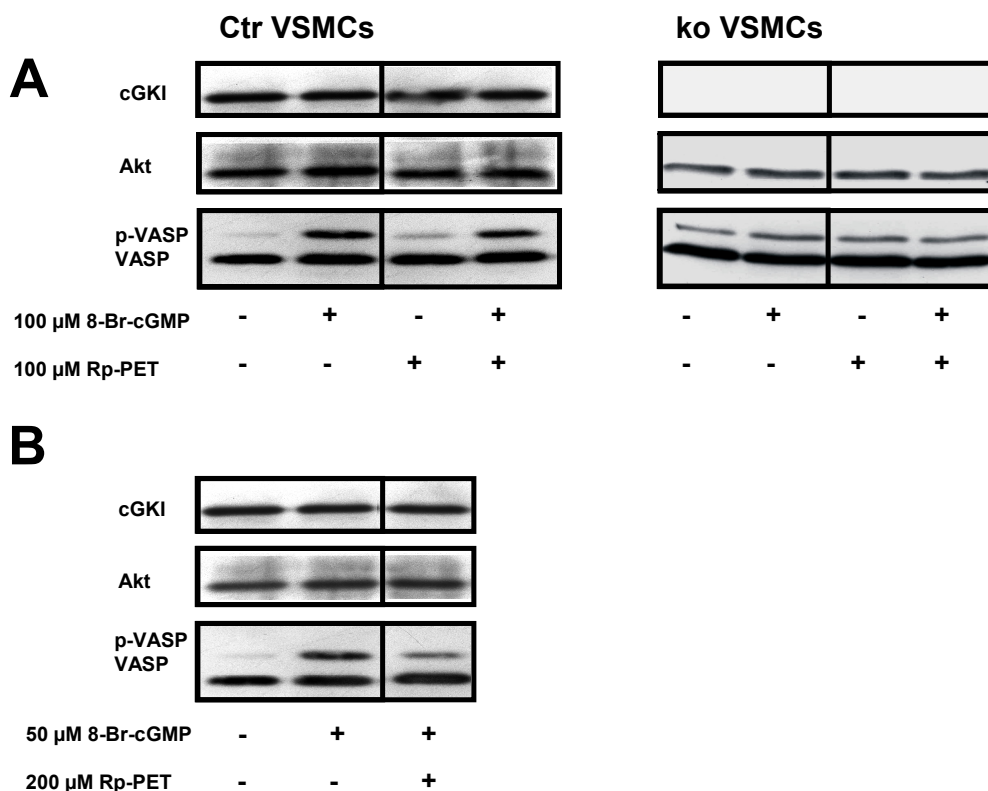


Abb. 6. Effekte von Rp-PET auf die cGKI-vermittelte VASP-Phosphorylierung. 125 000 Zellen/Loch wurden in 6-Lochplatten ausgesät und 7 Tage in Kultur gehalten bis eine Konfluenz von 80-90% erreicht wurde. Anschließend wurden die VSMCs bis zum Versuch für 48 h serumfrei gestellt. Nach 30 min Präinkubation mit Rp-PET (100 µM) wurde die VASP-Phosphorylierung durch 8-Br-cGMP (100 µM) für 30 min induziert. Die Zellen wurden mit 500 µl Lysepuffer/Loch lysiert und 10 µl Lysat wurde für die SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt. Beide Proteinspezies, VASP und p-VASP (Ser¹⁵⁷), wurden durch Antikörper gegen Gesamt-VASP (Alexis im Fall der cGKI-Knockout-VSMCs und *Cell signaling* bei den WT-VSMCs, s. **Tab. 18**) erkannt. Die Detektion der cGKI bestätigte den Genotyp der WT- und cGKI-Knockout-VSMCs, Akt diente als Ladekontrolle. **A.** VASP-Phosphorylierung in mit 8-Br-cGMP behandelten WT-VSMCs (links) und cGKI-Knockout-VSMCs (rechts) unter Zugabe von Rp-PET in äquimolarer Konzentration. **B.** VASP-Phosphorylierung in mit 8-Br-cGMP behandelten WT-VSMCs bei einer Verschiebung der Konzentrationen zugunsten des Inhibitors (4-facher Überschuss an Rp-PET).

Diese konnte durch Inkubation mit Rp-PET (100 μM) für 60 min (30 min Vorinkubation gefolgt von 30 min in Anwesenheit von 8-Br-cGMP) nicht signifikant aufgehoben werden. Die nur mit Rp-PET behandelten Zellen (60 min, 100 μM) wiesen eine leichte Induktion der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zu der Kontrolle auf (**Abb. 6A**, links). Die cGKI-Knockout-Zellen zeigten eine insgesamt höhere basale VASP-Phosphorylierung, die aber durch keines der cGMP-Analoga beeinflusst wurde (**Abb. 6A**, rechts). Unter Zugabe von 8-Br-cGMP und Rp-PET im analogen Versuchsansatz, allerdings im 4-fachen Überschuss an Inhibitor, konnte eine klare Reduktion der 8-Br-cGMP-stimulierten VASP-Phosphorylierung erreicht werden (**Abb. 6B**). Dies deutete darauf hin, dass durch eine Änderung des Verhältnisses von Aktivator zu Inhibitor eine Hemmung erzielt werden kann.

Rp-PET vermochte zwei cGKI-abhängige Prozesse in VSMCs, die Adhäsion und die VASP-Phosphorylierung, nicht effizient zu hemmen. Vielmehr aktivierte Rp-PET selbst diese Prozesse in Abwesenheit des Agonisten 8-Br-cGMP. Um dies ohne die zusätzlichen Faktoren, die in einem Zellsystem eine Rolle spielen, näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente mit gereinigter cGKI durchgeführt.

C.1.3. Einfluss von Rp-PET auf die *in vitro* Aktivität von cGKI α und cGKI β

Die Wirkung von Rp-PET auf gereinigte cGKI α und β wurde, wie unter B.5.9 angegeben, untersucht. Beide cGKI-Isoformen wurden standardmäßig in Sf9-Suspensionskultur exprimiert (B.4.2.2) und über cAMP-Affinitätschromatographie gereinigt (Feil et al., 1995). Im Kinase-Assay (B.5.9) wurde die basale und cGMP-induzierte (4 Konzentrationen) Kinaseaktivität ohne und mit verschiedenen Konzentrationen an Inhibitor (0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM und 50 μM) bestimmt (**Abb. 7A**). Die Aktivität beider cGKI-Isoformen wurde durch 10^{-4} M cGMP auf das 8- bis 10-fache der Basalaktivität erhöht, mit K_a -Werten von $\approx 0,1$ μM für cGKI α und ≈ 1 μM für cGKI β , die mit den publizierten Daten korrelieren (Ruth et al., 1991). Die für die Kinetik der cGMP-Aktivierung beider Isoformen typischen Sigmoiden wurde mit ansteigender Rp-PET-Konzentration nach rechts verschoben (Rechtsverschiebung der scheinbaren K_a -Werte), was charakteristisch für eine Hemmung mit kompetitiver Komponente ist. Allerdings war die Aktivität der cGKI α bei 50 μM Rp-PET ohne cGMP auf ca. 20% der maximal durch cGMP (10^{-4} M) erreichten Aktivität erhöht (s. **Abb. 7A**, cGKI α basal). Dagegen blieb die basale Kinaseaktivität der cGKI β bei der gleichen Rp-PET-Konzentration unverändert (**Abb. 7A**, cGKI β basal). Zusätzlich konnte Rp-PET (50 μM) in Anwesenheit von 10^{-4} M cGMP die Aktivierung der cGKI α auf nur 70% reduzieren, die von cGKI β dagegen fast auf Basalaktivität. Die K_i -Werte der Hemmung wurden über Transformation der Daten in Dixon Plots bestimmt (**Abb. 7B**). Durch die halbziproke Darstellung der Werte (1/Kinaseaktivität gegen Rp-PET-Konzentration) erhielt man für jede cGMP-Konzentration eine Gerade. Aus der x-

Ergebnisse

Koordinate des Schnittpunkts (x; y) der Geraden bzw. des Medianes der Schnittpunkte wurde der K_i -Wert abgelesen ($K_i = -x$). Für cGKI α betrug dieser 0,03 μM , für cGKI β 0,05 μM (**Abb. 7B**), was in guter Übereinstimmung mit den publizierten Werten liegt (Butt et al., 1995) (**Tab. 1**).

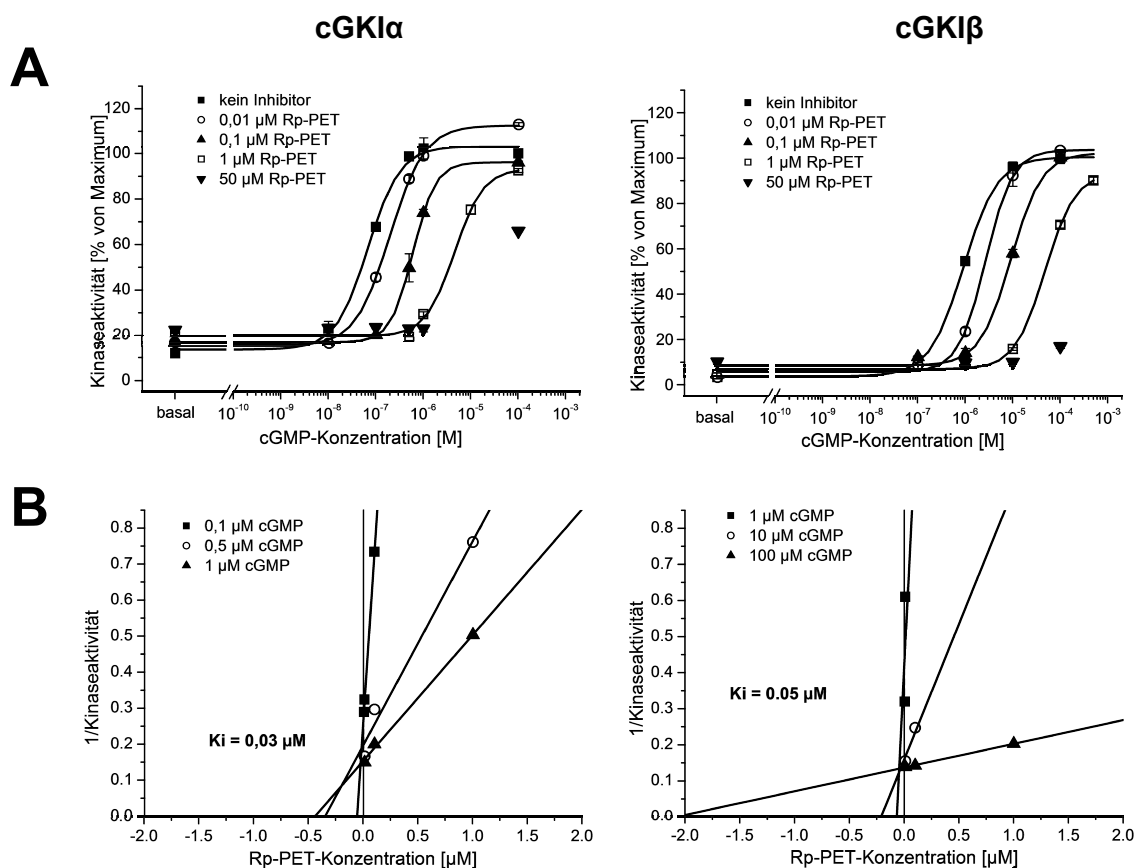


Abb. 7. Einfluss von Rp-PET auf die cGMP-stimulierte Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts). **A.** Die cGMP-Aktivierungskurven von cGKI α und cGKI β ohne (\blacksquare) und in Anwesenheit von 0,01 μM (\circ), 0,1 μM (\blacktriangle), 1 μM (\square) und 50 μM (\blacktriangledown) Rp-PET wurden ermittelt. Die Kinaseaktivität (μmol Substrat /min x mg Enzym) wurde prozentual auf die Aktivität, die mit der höchsten cGMP-Konzentration ohne Inhibitor erreicht wurde, bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$ Werte für jeden Punkt) aus einem repräsentativen Experiment. **B.** Der Kehrwert der Kinaseaktivität bei 0,1 μM (\blacksquare), 0,5 μM (\circ) und 1 μM (\blacktriangle) cGMP für cGKI α (links) bzw. 1 μM (\blacksquare), 10 μM (\circ) und 100 μM (\blacktriangle) cGMP für cGKI β (rechts) wurde gegen die Rp-PET-Konzentration [μM] aufgetragen (Dixon Plot). Aus dem Schnittpunkt (x; y) der Geraden bzw. dem Median der Schnittpunkte lässt sich die Inhibitor-Konstante ablesen ($K_i = -x$).

Um die leichte Aktivierung von cGKI α bei 50 μM Rp-PET näher zu untersuchen wurden Kinase-Assays durchgeführt, bei denen die Wirkung steigender Rp-PET-Konzentrationen in Abwesenheit von cGMP analysiert und mit der Aktivierungskurve durch cGMP verglichen wurde (**Abb. 8**). Rp-PET aktivierte die Kinaseaktivität von cGKI α auf ca. 38% der durch sättigende cGMP-Konzentration erreichten Aktivität ($K_a = 1 \mu\text{M}$). Hingegen wurde die basale Kinaseaktivität von cGKI β durch Rp-PET nicht signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigten die leichte Stimulierung von

Ergebnisse

cGKI-abhängigen Prozessen in primären VSMCs und deuteten auf eine isoformspezifische Aktivierung von gereinigter cGKI α durch Rp-PET hin.

Eine plausible Hypothese, die beide Beobachtungen erklären würde, wäre eine partielle spontane Umwandlung des Inhibitors Rp-PET in den Aktivator PET durch den Austausch des Schwefels durch Sauerstoff (**Abb. 4**) (s. auch „Technische Information über Rp-8-Br-PET-cGMPS“ von 15. Oktober 2007, Biolog; www.biolog.de). Um dies auszuschließen, wurde die Homogenität von Rp-PET durch Massenspektrometrie analysiert.

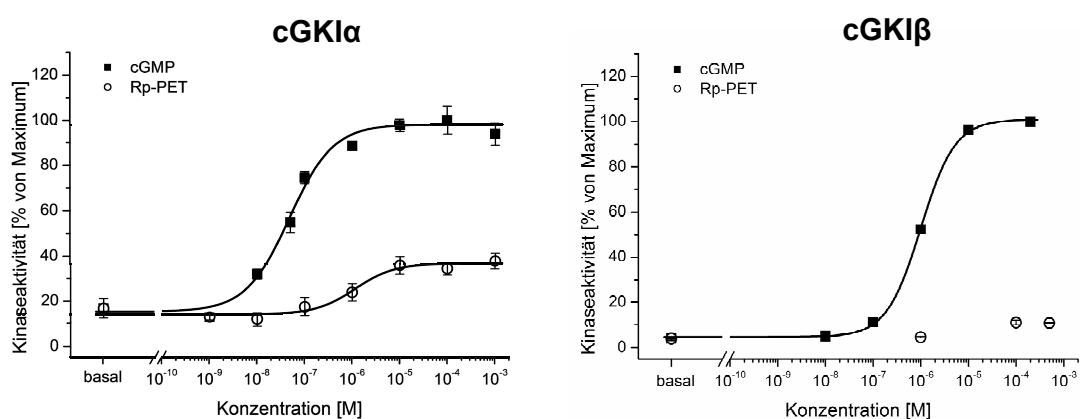


Abb. 8. Effekt von Rp-PET auf die basale Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts). Verglichen wurde die Aktivität der Isoenzyme nach Zugabe verschiedener cGMP- (■) oder Rp-PET- (○) Konzentrationen. Die Kinaseaktivität ($\mu\text{mol Substrat}/\text{min} \times \text{mg Enzym}$) wurde prozentual auf die Aktivität, die mit der höchsten cGMP-Konzentration ohne Inhibitor erreicht wurde, bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$ Werte für jeden Punkt) aus einem repräsentativen Experiment.

C.1.4. Verifizierung der Homogenität der benutzten Rp-PET Präparationen über ESI-MS

Das für die Kinase-Assays verwendete Rp-PET-Aliquot wurde massenspektrometrisch (B.6.2) untersucht (**Abb. 9**). Der Aktivator und der Inhibitor sollten aufgrund ihres Unterschiedes im Molekulargewicht von 16 Da, was der Massendifferenz zwischen Sauerstoff und Schwefel entspricht, über Massenspektrometrie leicht zu unterscheiden sein. Als Kontrolle für das Detektionsvermögen der Methode wurde ein Gemisch aus Rp-PET und PET (70:30; v/v) verwendet. Die Massenspektren der Substanzen bestanden aus Peakpopulationen mit zwei Hauptpeaks, die der natürlichen Isotopenverteilung des Broms entsprechen. Das Kontrolleexperiment bestätigte, dass Rp-PET (m/z von 538 und 540) klar von PET (m/z von 522 und 524) zu unterscheiden war (**Abb. 9**, rechts). Die Analyse des für den Kinase-Assay benutzten Rp-PET-Aliquots ergab, dass dieses homogen war und dass keine detektierbare spontane Umwandlung des

Ergebnisse

Inhibitors in die Aktivatorsubstanz erfolgt war. Folglich waren alle beobachteten Effekte lediglich auf Rp-PET zurückzuführen.

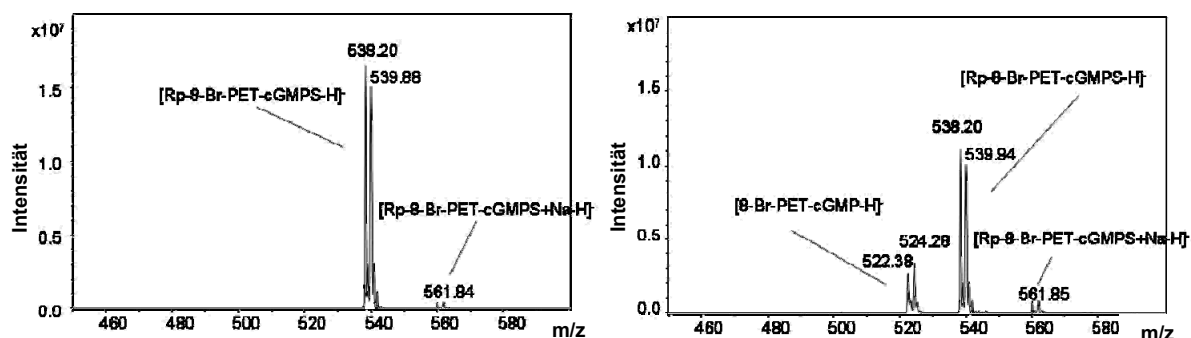


Abb. 9. Massenspektren (ESI-MS) von Rp-PET (links) und einem Gemisch aus (70:30; v/v) Rp-PET und PET (rechts). Die Stammlösungen der Substanzen (10 mM) wurden mit Acetonitril/H₂O auf 0,5 mM verdünnt und im negativen Modus vermessen. Die Hauptpeakpopulationen bestehen aus jeweils zwei Peaks, die mit ungefähr gleicher Intensität vertreten sind und durch die Isotopenverteilung des Broms (⁷⁹Br und ⁸¹Br) zustande kommen. Die Nebenpeaks sind auf eine Addukt-Bildung mit den Na⁺-Ionen (die Substanzen liegen als Salze des Natriums vor) zurückzuführen. Rp-PET (m/z von 538 und 540) und PET (m/z von 522 und 524) konnten klar unterschieden werden. Die Analyse wurde von Dr. A. Beck (Zentrum für Klinische Massenspektrometrie GmbH, Heilbronn) durchgeführt.

C.1.5. Einfluss von Rp-PET auf die Konformation des cGMP-Indikators cGi-500

Der rekombinante cGMP-Indikator cGi-500 (Russwurm et al., 2007) enthält die cGMP-Bindungsstellen von cGKI, eingeschlossen zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen (CFP und YFP). Nach Anregung von CFP erfolgt ein Energietransfer (FRET) auf YFP und eine Emission von YFP (bei 525 nm) kann detektiert werden (B.5.10). Nach Bindung von cGMP kommt es zu einem Abfall des FRET-Signals, die CFP-Eigenemission (475 nm) tritt in den Vordergrund. Die Bindung von cGMP, PET und Rp-PET wurde anhand des Quotienten 475 nm/525 nm quantifiziert. Die Agonisten cGMP und PET induzierten durch deren Bindung an den Indikator eine konzentrationsabhängige Konformationsänderung, die den Aktivierungskurven von cGKI entsprechen (**Abb. 10**). Rp-PET übte eine „aktivierende“ Wirkung auf den cGMP-Indikator aus, die allerdings schwächer als die der vollen Agonisten war. Die Daten bestätigten den partiellen Agonismus, der in den Zellkulturexperimenten und in den Kinase-Assays mit gereinigten cGKI α und β festgestellt wurde.

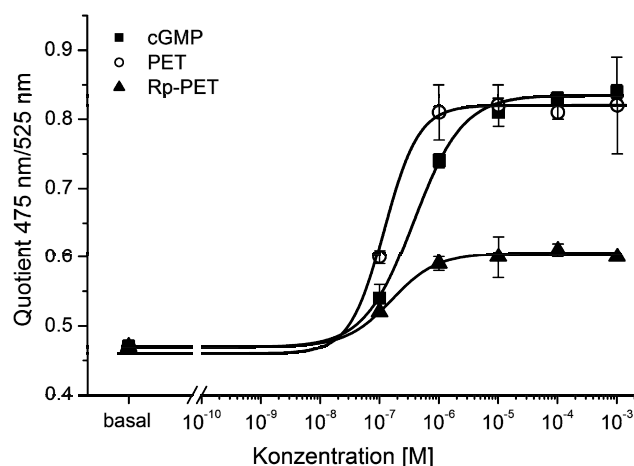


Abb. 10. FRET-Messung mit einem cGMP-Indikator, der die zwei cGMP-Bindungsstellen der cGKI, eingeschlossen zwischen YFP und CFP, trägt. Dieser wurde in HEK293-Zellen exprimiert und der geklärte Zellextrakt wurde für die Messungen eingesetzt (Russwurm et al., 2007). Die Konformationsänderung vom inaktiven (ohne Bindung von Liganden) in den Liganden-aktivierten Zustand wurde anhand des FRET-Signals bestimmt. Der Quotient 475 nm/525 nm stellt das Verhältnis zwischen der CFP-Eigenemission und der FRET-basierten YFP-Emission dar. Dementsprechend bedeutet die Zunahme des Quotienten eine Abnahme des FRET-Signals und eine Zunahme der Fraktion des ligandenbesetzten „aktivierten“ Indikators. Verfolgt wurde die FRET-Änderung nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen cGMP (■), PET (○) und Rp-PET (▲). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus $n \geq 3$ Experimenten. Die Experimente wurden von Dr. M. Russwurm (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bochum) durchgeführt.

C.2. Charakterisierung der Effekte von Rp-pCPT auf die cGKI

Rp-pCPT ist ein weiterer cGKI-Inhibitor, der ähnlich wie Rp-PET anstelle des einen freien Sauerstoffs der Phosphatgruppe einen Schwefel trägt. Nachdem in der vorliegenden Arbeit partielle agonistische Effekte von Rp-PET festgestellt wurden, wurde auch der Einfluss von Rp-pCPT auf cGKI α und β im Kinase-Assay getestet. Anschließend wurde die Homogenität der Substanz über Massenspektrometrie bestimmt.

C.2.1. Einfluss von Rp-pCPT auf die Aktivität von cGKI α und cGKI β

Der Effekt von Rp-pCPT auf gereinigte cGKI α und cGKI β wurde in Kinase-Assays (B.5.9) analysiert. Es wurde zunächst die Effizienz der Hemmung durch Rp-pCPT validiert. Dazu wurden die cGMP-Aktivierungskurven für cGKI α (**Abb. 11A**, links) und β (**Abb. 11A**, rechts) aufgenommen und die Wirkung verschiedener Rp-pCPT-Konzentrationen auf diese getestet. Mit steigender Konzentration an Rp-pCPT wurde die Aktivierungskurve nach rechts verschoben, wie auch schon für Rp-PET gezeigt (C.1.3). Allerdings wurde die maximale Kinaseaktivität beider Isoenzyme bei sättigender cGMP-Konzentration (2×10^{-4} M) durch 50 μ M Rp-pCPT nicht signifikant

Ergebnisse

beeinflusst, was klar zeigte, dass Rp-pCPT im Vergleich zu Rp-PET der schwächere Inhibitor ist. Allerdings erhöhten 50 μM Rp-pCPT ebenfalls die basale Kinaseaktivität von cGKI α auf ca. 30% der maximal durch cGMP erreichten Aktivität. Es wurde keine Aktivierung der cGKI β durch Rp-pCPT in Abwesenheit von cGMP beobachtet (**Abb. 11A**, basal). Mit Hilfe von Dixon Plots wurden die K_i -Werte bestimmt. Diese betragen 1,45 μM für cGKI α (**Abb. 11B**, links) bzw. 2,25 μM für cGKI β (**Abb. 11B**, rechts), was gut mit den publizierten K_i -Werten übereinstimmte (**Tab. 1**) (Poppe et al., 2008).

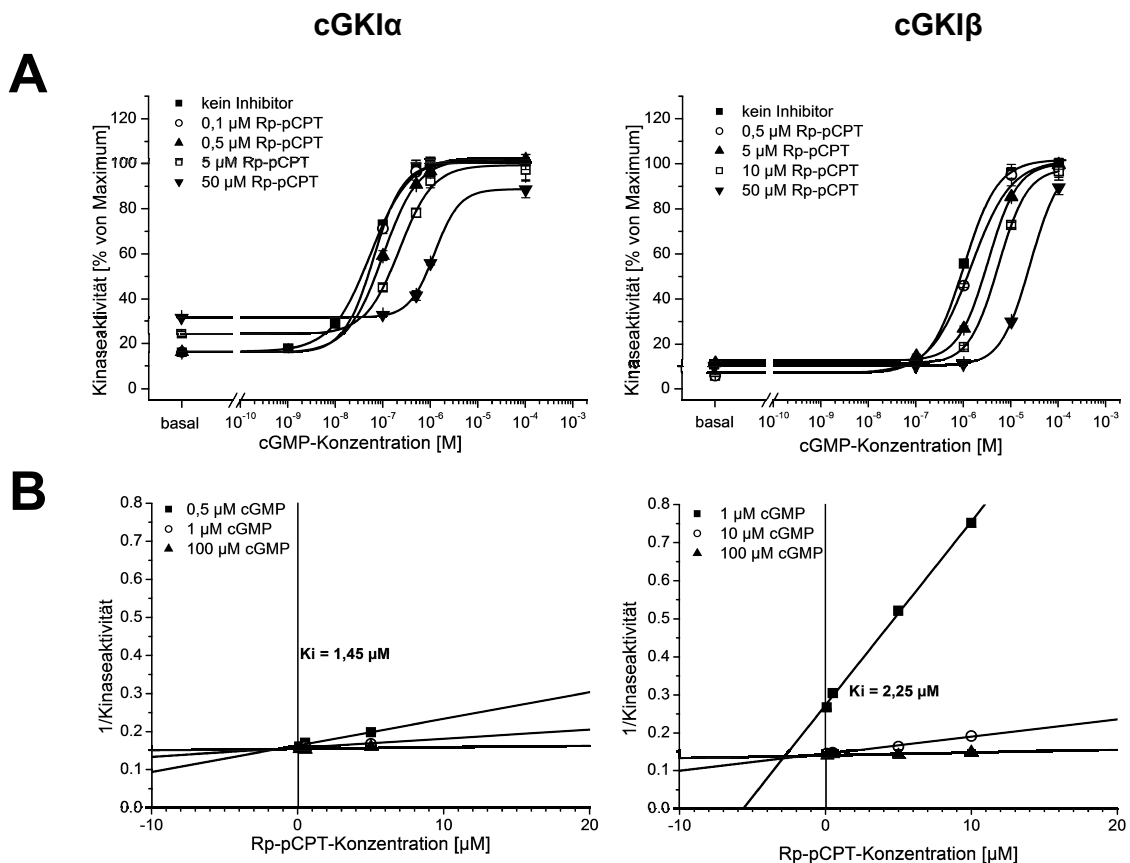


Abb. 11. Einfluss von Rp-pCPT auf die cGMP-stimulierte Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts). **A.** Die cGMP-Aktivierungskurven von cGKI α und cGKI β ohne (\blacksquare) und in Anwesenheit von 0,1 μM (\circ), 0,5 μM (\blacktriangle), 5 μM (\square) und 50 μM (\blacktriangledown) Rp-pCPT wurden ermittelt. Die Kinaseaktivität (μmol Substrat /min \times mg Enzym) wurde prozentual auf die Aktivität, die mit der höchsten cGMP-Konzentration ohne Inhibitor erreicht wurde, bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$ Werte für jeden Punkt) aus einem repräsentativen Experiment. **B.** Der Kehrwert der Kinaseaktivität bei 0,5 μM (\blacksquare), 1 μM (\circ) und 100 μM (\blacktriangle) cGMP für cGKI α (links) bzw. 1 μM (\blacksquare), 10 μM (\circ) und 100 μM (\blacktriangle) cGMP für cGKI β (rechts) wurde gegen die Rp-pCPT-Konzentration [μM] aufgetragen (Dixon Plot). Aus dem Schnittpunkt der Geraden bzw. dem Median der Schnittpunkte lässt sich die Inhibitorkonstante ablesen. ($K_i = -x$).

Obwohl Rp-pCPT in Anwesenheit sättigender cGMP-Konzentrationen beide Isoformen kaum zu hemmen vermochte, zeigte auch dieser Inhibitor einen partiellen agonistischen Effekt auf cGKI α , der ähnlich stark wie der von Rp-PET war. Um die agonistische Wirkung näher zu untersuchen, wurde die Kinaseaktivität von cGKI α

Ergebnisse

und β in Abhängigkeit von der Rp-pCPT-Konzentration in Abwesenheit von cGMP gemessen und mit der cGMP-Aktivierungskurve verglichen (**Abb. 12**). Rp-pCPT aktivierte ($K_a = 1 \mu\text{M}$) cGKI α auf 35% der durch sättigende cGMP-Konzentration erreichten Aktivität, hatte dagegen bis $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ kaum eine Auswirkung auf die basale Aktivität von cGKI β , was mit der Wirkung von Rp-PET übereinstimmte (C.1.3).

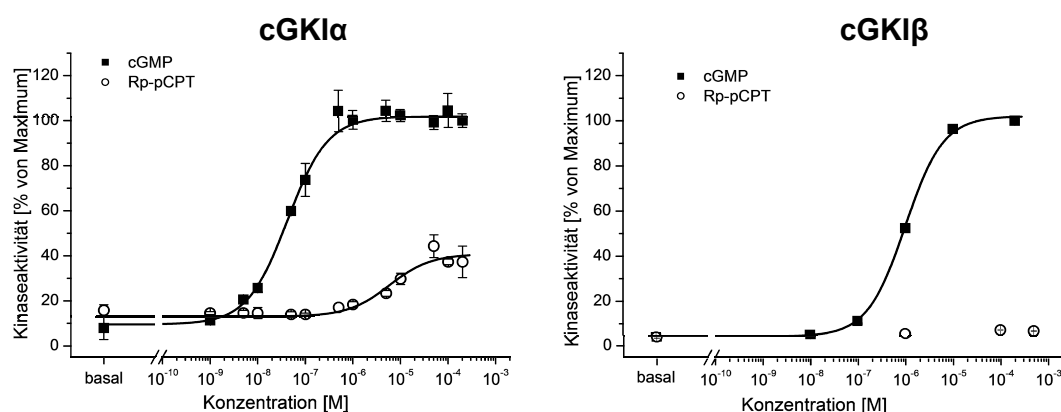


Abb. 12. Effekt von Rp-pCPT auf die basale Kinaseaktivität von cGKI α (links) und cGKI β (rechts). Verglichen wurde die Aktivität der Isoenzyme nach Zugabe verschiedener cGMP-(■) oder Rp-pCPT-(○) Konzentrationen. Die Kinaseaktivität (μmol Substrat /min \times mg Enzym) wurde prozentual auf die Aktivität, die mit der höchsten cGMP-Konzentration ohne Inhibitor erreicht wurde, bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$ Werte für jeden Punkt) aus einem repräsentativen Experiment.

C.2.2. Verifizierung der Homogenität der benutzten Rp-pCPT Präparationen über ESI-MS

Um eine Umwandlung des schwefelhaltigen Antagonisten in den sauerstoffhaltigen Agonisten auszuschließen, wurde auch das Rp-pCPT-Aliquot über Massenspektrometrie (B.6.2) untersucht (**Abb. 13**, links). Zusätzlich wurde ein Gemisch aus Rp-pCPT und pCPT (70:30; v/v) als Kontrolle massenspektrometrisch analysiert (**Abb. 13**, rechts). Die Peakpopulationen der beiden Substanzen bestanden aus zwei Peaks, von denen der eine deutlich intensiver war. Dies resultiert aus der natürlichen Isotopenverteilung von Cl, vertreten durch ^{35}Cl und ^{37}Cl in einem Verhältnis von 75%:25%. Die zwei Substanzen mit einer Massendifferenz von 16 Da waren klar zu unterscheiden (**Abb. 13**, rechts). Das für die Kinase-Assays benutzte Rp-pCPT-Aliquot war nicht durch Konversion zu pCPT verunreinigt (**Abb. 13**, links). Folglich kann die cGKI α -aktivierende Wirkung, die in C.2.1 gezeigt wurde, nur durch Rp-pCPT zustande gekommen sein.

Ergebnisse

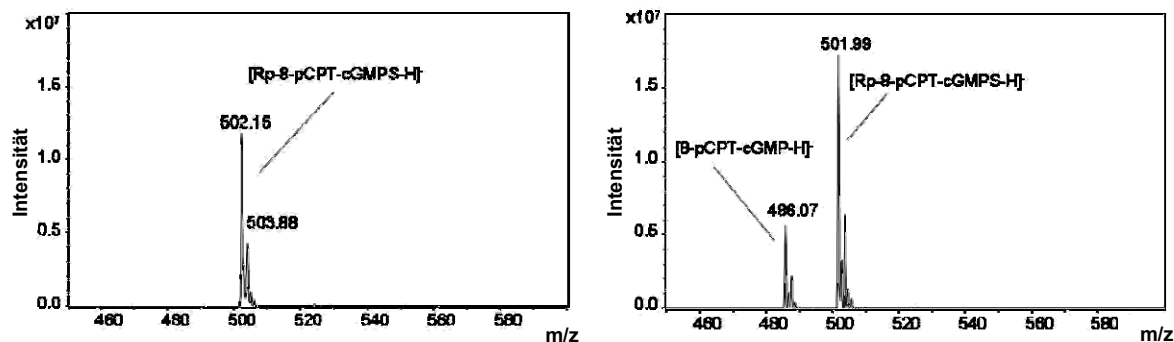


Abb. 13. Massenspektren (ESI-MS) von Rp-pCPT (links) und von einem Gemisch aus (30:70; v/v) Rp-pCPT und pCPT (rechts). Die Stammlösungen der Substanzen (10 mM) wurden mit acetonitril/H₂O auf 0,5 mM verdünnt und im negativen Modus vermessen. Die Hauptpeakpopulationen bestehen aus jeweils zwei Peaks (der eine ungefähr mit 2-3-fach höherer Intensität), die durch die Isotopenverteilung des Chlors (³⁵Cl und ³⁷Cl, verteilt im Verhältnis 75%:25%) zustande kommen. Rp-pCPT (m/z von 502 und 504) und pCPT (m/z von 486 und 488) können klar unterschieden werden. Die Analyse wurde von Dr. A. Beck (Zentrum für Klinische Massenspektrometrie GmbH, Heilbronn) durchgeführt.

C.3. Etablierung neuer isoformspezifischer Inhibitoren

Ein neuer Ansatz zur Etablierung isoformspezifischer Inhibitoren der cGKI bestand darin, den N-Terminus der jeweiligen Isoform, bestehend aus Leucin-Zipper und autoinhibitorischer Domäne (s. **Abb. 1**), als potentiell dominant-negatives Proteinfsegment einzusetzen. Da sich beide Isoformen nur in diesem Bereich unterscheiden, ist eine isoformspezifische Hemmung der Funktion der jeweiligen *full length*-Kinase in der Zelle denkbar. Eine Reinigung in großem Maßstab wurde durch das N-terminale Anhängen einer His₆-Sequenz (Crowe et al., 1994) ermöglicht. Um die Membrangängigkeit des exprimierten Proteins zu gewährleisten, wurde dem His-Tag die Tat-Proteintransduktionsdomäne (A.3) angeschlossen. Damit sollte es möglich sein, die Wirkung der N-Termini in intakten Zellen und *in vivo* zu analysieren. Für die rekombinante Expression der N-Termini der cGKI α und cGKI β in *E. coli* wurden zwei Expressionsplasmide konstruiert. Bei der Klonierung, die in B.3.1 beschrieben wurde, wurde aus dem Plasmid pTriEx-1-HTNC [His-Tat-NLS-Cre, (Peitz et al., 2002)] die Cre-Rekombinase samt der nukleären Lokalisationssequenz mittels Restriktionsenzyme ausgeschnitten und durch den N-Terminus der jeweiligen bovinen cGKI (vervielfältigt über PCR) ersetzt (**Abb. 14**, oben). Die Karten der neu konstruierten Plasmide pHis-Tat-cGKI α -N-Terminus (pHT- α -N) und pHis-Tat-cGKI β -N-Terminus (pHT- β -N) sind in **Abb. 15** gezeigt.

Da in der vorliegenden Arbeit die N-Termini mit den *full length*-Kinasen zwecks Interaktionsanalyse coexprimiert werden sollten, wurden auch zwei Baculoviren für die Expression in Sf9-Insektenzellen konstruiert. Dieser Schritt liegt u. a. darin begründet, dass sich funktionelle cGKI im Sf9-Expressionssystem, jedoch nicht in *E. coli*, gewinnen lässt.

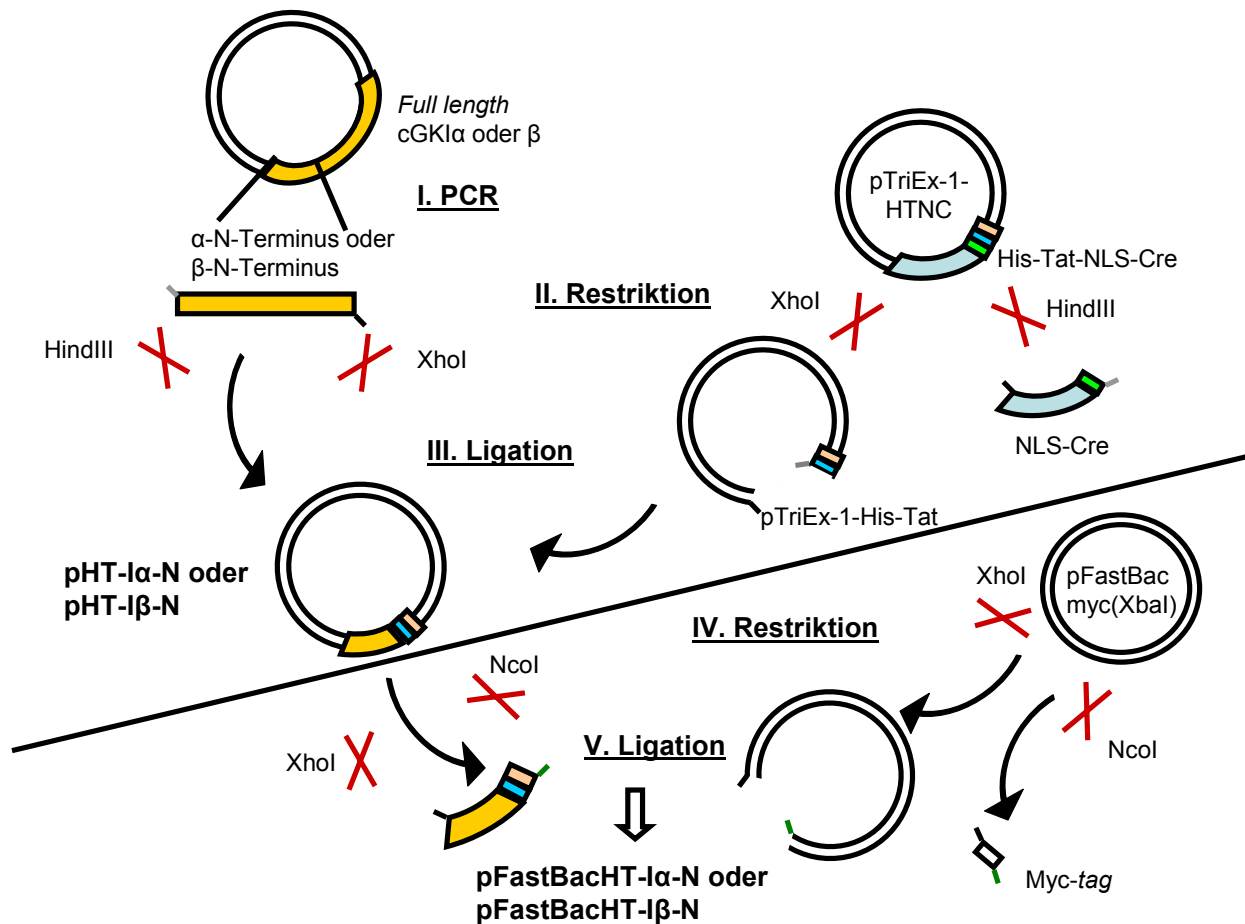


Abb. 14. Vorgehensweise bei der Konstruktion von pHT- α -N und pHT- β -N (oben) und der Donorplasmide pFastBacHT- α -N und pFastBacHT- β -N zur Herstellung rekombinanter Baculoviren (unten).

Dazu wurde die Sequenz von HT- α -N bzw. HT- β -N aus pHT- α -N bzw. pHT- β -N mittels Restriktionsenzyme ausgeschnitten und in pFastBac eingebaut (Abb. 14, unten). Mit Hilfe dieser Donorplasmide wurden die entsprechenden Baculoviren HT- α -N bzw. HT- β -N erzeugt (die genauere Vorgehensweise ist Hillenbrand, 2007 und B.3.2 zu entnehmen). Die Sequenz aller neu konstruierten Plasmide (F.1) wurde durch Sequenzieranalyse kontrolliert (B.3.1.7 und von der Fa. *MWG Biotech* durchgeführt).

Ergebnisse

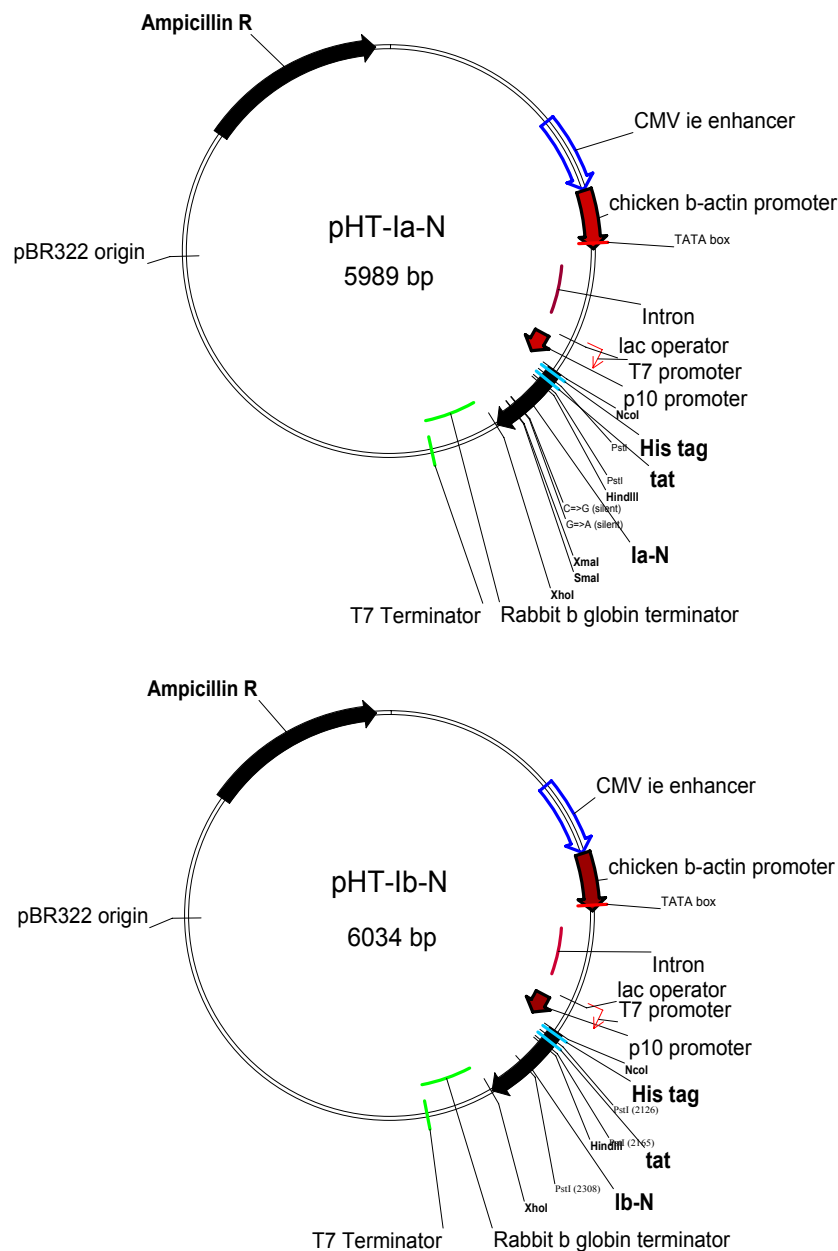


Abb. 15. Die Plasmide pHT-I α -N und pHT-I β -N. Gezeigt sind die Vektorkarten mit einigen charakteristischen Restriktionsschnittstellen. Dargestellt sind auch die für die Vermehrung der Plasmide in Prokaryonten wichtigen Regionen (Replikationsorigin und Selektionsmarker), sowie die für die Expression in Prokaryonten und Eukaryonten nötigen Elemente.

C.3.1. Coexpression von HT-I α -N bzw. HT-I β -N mit cGKI α , cGKI β oder cGKI β M mit anschließender Interaktionsanalyse

Um zu untersuchen, ob HT-I α -N und HT-I β -N die entsprechenden *full length*-Kinasen isoformspezifisch binden und ob dies über den Leucin-Zipper passiert, wurden die Proteine über Baculoviren in Sf9-Zellen (Monolayer-Kultur in 75 cm²-Kulturflaschen) wie unter B.4.2 beschrieben coexprimiert. Für jeden der zwei HT-N-Termini wurden 4 Infektionen wie folgt angesetzt: HT-N allein, HT-I-N mit cGKI α , HT-I-N mit cGKI β und HT-I-N mit cGKI β M (eine cGKI β -Mutante, der der Leucin-Zipper fehlt). Nach 72 h

Ergebnisse

wurden die Zellen aufgeschlossen und zum geklärten Zelllysate Ni^{2+} -NTA-Agarose zugegeben, um die His_6 -markierten N-Termini spezifisch zu isolieren. Wenn diese wiederum mit anderen Proteinen im Zelllysate eine Interaktion eingegangen hätten, würden diese coisoliert werden. Anschließend wurden die „gefischten“ Proteine (oder Proteinkomplexe) durch Imidazol eluiert und über Western Blot analysiert (**Abb. 16**). Dabei konnte der HT- α -N nur cGKI α binden (s. „*His pull down*“), obwohl in allen Ansätzen die Kinasen exprimiert waren (s. „*Input*“). Analog interagierte HT- β -N nur mit cGKI β , und nicht mit cGKI α oder cGKI β M, die im Zelllysate aber anwesend waren (s. „*Input*“). Dass keine Interaktion mit cGKI β M vorlag, bestätigte, dass die Bindung über den Leucin-Zipper erfolgt war. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine isoformspezifische Bindung der *full length*-Kinase über den N-terminalen Bereich prinzipiell möglich ist. Um die Wirkung der N-Termini auf die Funktion der cGKI *in vitro* und in Zellen zu untersuchen, sollten diese in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden.

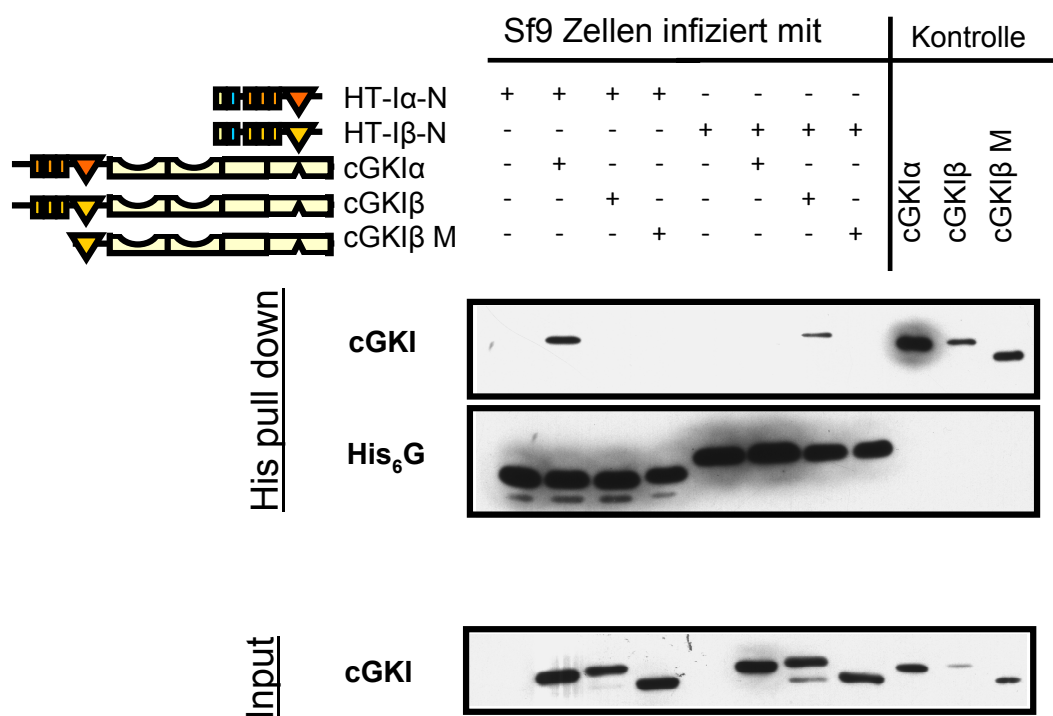


Abb. 16. Ni^{2+} -pull down nach Coexpression der HT-N-Termini mit den *full length*-Kinasen in Sf9-Zellen. Konfluente Zellen wurden nach dem angegebenen Schema mit den entsprechenden Baculoviren infiziert (jeweils eine 75 cm^2 -Kulturflasche). cGKI β M ist eine cGKI β -Mutante, der der Leucin-Zipper fehlt. Nach 72 h wurden die Zellen in $500 \mu\text{l}$ Phosphatpuffer aufgeschlossen, abzentrifugiert und ein Aliquot vom Überstand wurde für die spätere Western Blot-Analyse als Expressionskontrolle („*Input*“, aufgetragen wurden $10 \mu\text{l}$ einer 1:20-Verdünnung) abgenommen. Nach Zugabe von Ni^{2+} -NTA-Agarose und sorgfältigem Waschen wurden die an die Ni^{2+} -NTA-Agarose gebundenen Proteine mit $50 \mu\text{l}$ Phosphatpuffer B (250 mM Imidazol) eluiert („*His pull down*“, aufgetragen wurden $10 \mu\text{l}$ einer 1:4 Verdünnung bei HT- α -N bzw. einer 1:20 Verdünnung bei HT- β -N). Die Kinasen und die N-Termini wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen die Gesamtkinase (cGKI „D. Hildebrand“ **Tab. 18**) bzw. gegen den *His-tag* (His $_6$ G, *Invitrogen*, **Tab. 18**) detektiert. 10 ng gereinigte cGKI α , cGKI β und cGKI β M wurden als Kontrolle für die richtige Bandenhöhe aufgetragen. Die Interaktionsanalyse wurde von M. Hillenbrand durchgeführt.

C.3.2. Expression und Reinigung von HT- α -N und HT- β -N

Nachdem gezeigt wurde, dass bei Coexpression die HT-N-Termini die entsprechende *full length*-Kinase isoformspezifisch binden können, sollten HT- α -N und HT- β -N für weitere Analysen in großem Maßstab in Bakterien exprimiert und anschließend gereinigt werden. pHT- α -N bzw. pHT- β -N (**Abb. 15**) wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) eingebracht und es wurde zunächst eine Testreinigung mit je 250 ml Kultur durchgeführt. Die Bakterien wurden aufgezogen wie in B.4 beschrieben und die Überexpression wurde 3 h mit 0,5 mM IPTG induziert (**Abb. 17**).

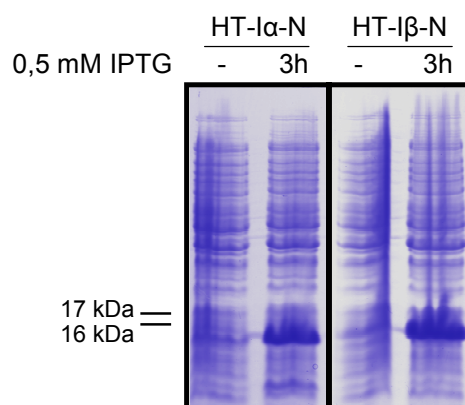


Abb. 17. IPTG-Induktion der Expression von HT- α -N und HT- β -N in *E. coli* BL21(DE3). Bakterienkulturen, die mit pHT- α -N und pHT- β -N transformiert wurden, wurden bis zur exponentiellen Phase des Wachstums hochgezogen. Die Expression der rekombinanten N-Termini, die indirekt unter der Kontrolle des LacZ-Operators stand, wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 3 h induziert. Aliquots wurden vor und nach der Induktion entnommen, lysiert und auf SDS-Gele so aufgetragen, dass die Proteinmenge anhand der Zelldichte gleich eingestellt war. Das berechnete Molekulargewicht beträgt bei HT- α -N 16 kDa bei HT- β -N 17 kDa.

Nach Zellyse der Bakterien (Ultraschall) wurde mit dem Zellhomogenat eine Ni²⁺/NTA-Affinitätschromatographie (B.5.1) durchgeführt, von der alle Fraktionen über SDS-PAGE (Coomassie) und Western Blot (B.5.7) kontrolliert wurden (**Abb. 18**).

Die Reinigung wurde wie unter B.5.1 beschrieben im *batch*-Verfahren durchgeführt. Zunächst wurde das Homogenat zur Trennung der löslichen (Extrakt) von der unlöslichen (Pellet) Fraktion abzentrifugiert. Ein großer Teil des Proteins schien in der unlöslichen Fraktion zu sein (stark ausgeprägte Proteinbande auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts, die auch von den entsprechenden isoformspezifischen Antikörpern erkannt wurde). Trotzdem war sowohl HT- α -N, als auch HT- β -N im Extrakt zu finden, wie aus dem Western Blot ersichtlich wurde. Die His₆-markierten Proteine aus dem Extrakt wurden an der Ni²⁺-NTA-Agarose zurückgehalten und nach mehreren Waschschritten mit 250 mM Imidazol eluiert. Die restlichen Bakterienproteine blieben größtenteils im Durchlauf. Das Eluat war noch

Ergebnisse

etwas verunreinigt, wie in der Coomassie-Färbung zu sehen ist. Anschließend wurde die Proteinpräparation dialysiert, um das Imidazol zu entfernen (nicht gezeigt). Mit jeder Fraktion der Reinigung wurde zur Bilanzierung der Proteinausbeute (**Tab. 13**) eine Proteinbestimmung (B.5.5) durchgeführt.

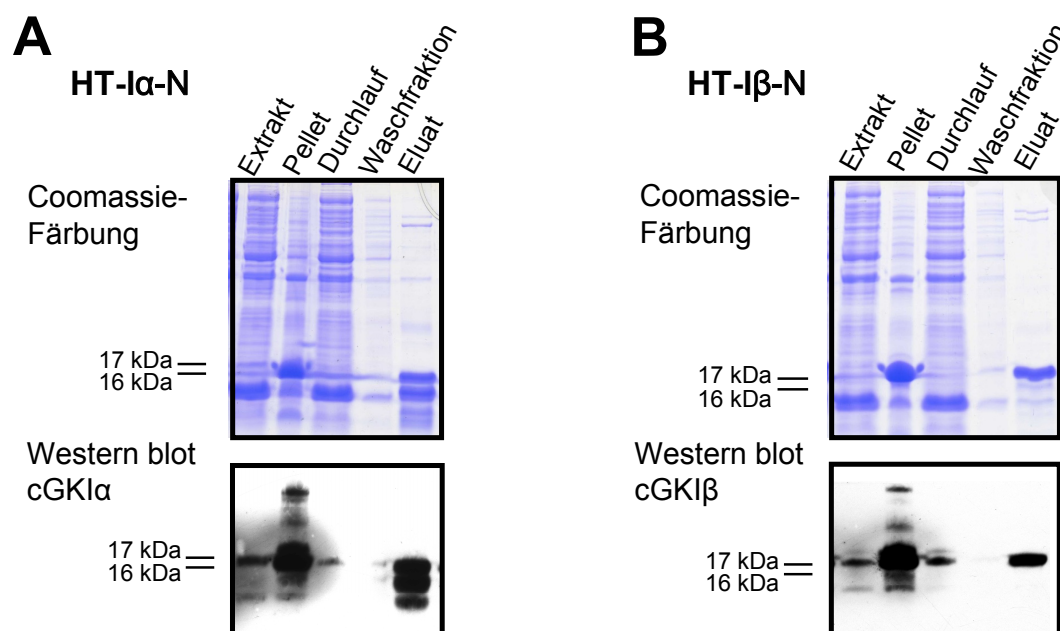


Abb. 18. Reinigung der rekombinanten Proteine HT- α -N (A) und HT- β -N (B) aus *E. coli* über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie im *batch*-Verfahren. Von Extrakt, Pellet, Durchlauf und Waschraktion wurden gleiche Volumenfraktionen (jeweils 10 μl für das Coomassie-gefärbte SDS-Gel bzw. 10 μl einer 1:20 Verdünnung für den Western Blot) aufgetragen. Vom Eluat wurden 15 μl für das Coomassie-gefärbte SDS-Gel bzw. 15 μl einer 1:20 Verdünnung für den Western Blot aufgetragen. HT- α -N und HT- β -N wurden über isoformspezifische Antikörper gegen cGKI α bzw. β (Santa Cruz, **Tab. 18**).

Im Extrakt fiel zusätzlich eine starke Proteinbande auf, die bei niedrigerem Molekulargewicht lief und an die Ni^{2+} -NTA-Agarose nicht bindete (blieb im Durchlauf). Diese war im Western Blot nicht detektierbar, was auf ein anderes Protein schließen ließ. Der Auftrag der Lysozymlösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), die für die Lyse verwendet wurde, auf ein SDS-Gel deutete darauf hin, dass es sich bei der genannten Bande um Lysozym handelte (Daten nicht gezeigt).

Im Eluat von HT- α -N konnten mehrere Banden sowohl in der Coomassie-Färbung, als auch durch den cGKI α -spezifischen Antikörper detektiert werden (**Abb. 18A**, Eluat). Diese Banden kamen durch Degradation des Proteins während der Reinigung zustande, da sie in den vorangehenden Schritten nur schwach ausgeprägt waren. Um das Abbauproblem zu umgehen, wurden verschiedene Puffersysteme, Reinigung bei 4°C oder auch Aufschluss in Anwesenheit von Ni^{2+} -NTA-Agarose, um das Protein sofort nach der Zelllyse abzufangen, getestet. Trotz aller Bemühungen blieb das Degradationsbandenmuster der HT- α -N-Proteinpräparation bestehen.

Ergebnisse

Tab. 13. Bilanzierung der Testreinigung von HT- α -N und HT- β -N über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie im *batch*-Verfahren (je 250 ml Kultur).

Fraktion	Volumen [ml]	Proteinangaben für die HT- α -N-Reinigung			Proteinangaben für die HT- β -N-Reinigung		
		[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	[mg]	[mg/l Kultur]	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	[mg]	[mg/l Kultur]
Extrakt	11	2,80	30,80	123,20	2,20	24,20	96,80
Durchlauf	11	2,45	26,95	107,80	1,67	18,41	73,65
Waschfraktion	12	0,73	8,76	35,04	0,42	5,04	20,16
Eluat	1,2	0,80	0,96	3,84	0,31	0,37	1,49
Dialysiertes Eluat	0,5	0,70	0,35	1,40	0,64	0,32	1,28

Da es möglich erschien, dass das bakteriell exprimierte Protein nicht richtig gefaltet und dadurch instabil war, wurde eine Expression im Baculovirus/Sf9-System (B.4.2.2) durchgeführt. Die nach der Affinitätsreinigung erhaltene Proteinpräparation war relativ homogen (deutlich weniger ausgeprägte Abbaubanden im Coomassiegefärbten SDS-Gel und im Western Blot, Daten nicht gezeigt, s. aber Western Blot in **Abb. 16**), bestand jedoch größtenteils aus Proteinaggregaten, wie eine spätere Gelfiltrationsanalyse zeigte (Daten nicht gezeigt).

Da es trotz mehrerer Strategien nicht möglich war, eine homogene lösliche Präparation von HT- α -N zu erhalten, wurde auf eine Reinigung in großem Maßstab und nachfolgende funktionelle Analysen verzichtet.

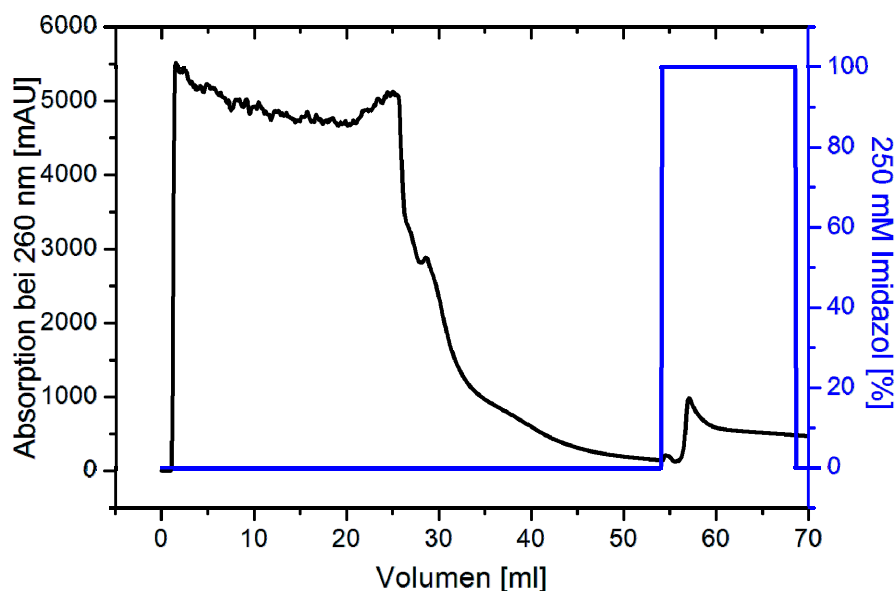


Abb. 19. Säulenreinigung von HT- β -N aus 4 l Bakterienkultur durch Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (HisTrap FF crude 2x 1 ml, ÄKTA). Nach der Bakterienlyse und der Entfernung der unlöslichen Fraktion wurde die lösliche Fraktion (25 ml) auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml Laufpuffer gewaschen und mit 15 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert. Das Eluat wurde als 1 ml-Fraktionen gesammelt. Gezeigt sind die UV-Absorption (linke Achse) und der prozentuale Anteil des Elutionspuffers (rechte Achse).

Ergebnisse

Bei HT-I β -N lieferte die Ein-Schritt-Reinigung aus *E. coli*-Lysat, im Gegensatz zu HT-I α -N, eine relativ homogene Proteinpräparation (**Abb. 18B**, Eluat). Eine Expression des HT-I β -N über das Baculovirus/Sf9-System lieferte ebenfalls eine relativ homogene Proteinpräparation, die jedoch keinerlei Vorteile in bezug auf Löslichkeit und Homogenität des Proteins zum weniger zeit- und kostenaufwändigeren *E. coli*-Expressionssystem zeigte. Aus diesem Grund wurde HT-I β -N in späteren Reinigungen in *E. coli* exprimiert und anstelle des *batch*-Verfahrens eine Säulenreinigung durchgeführt.

Für die Reinigung in großem Maßstab wurde eine 4 l Bakterienkultur angesetzt und eine Säulenreinigung (ÄKTA) durchgeführt (**Abb. 19**), bei der das Eluat in 15 x 1 ml Fraktionen gesammelt wurde. Da die UV-Absorption danach nicht auf die Basislinie abfiel, wurde nach der Reäquilibrierung der Säule mit 5 ml Laufpuffer (Fraktion 16) manuell mit weiteren 12 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert (Fraktion 17), bis kein Protein durch Bradford nachweisbar war.

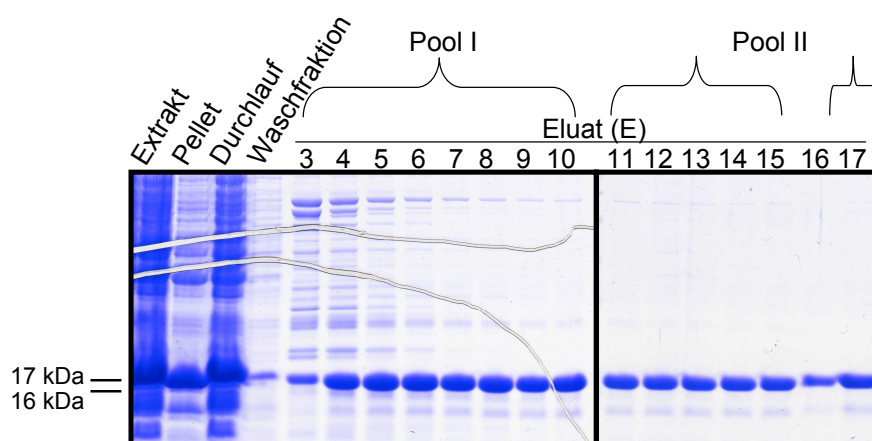


Abb. 20. Analyse der Fraktionen aus der Ni²⁺/His-Affinitätschromatographie (ÄKTA) des rekombinanten HT-I β -N. Von dem Extrakt, Pellet, Durchlauf und Waschschritt wurden gleiche Volumenfraktionen (1/4000), von E3-15 (Fraktionen je 1 ml) wurden 5 μ l, von E16 (5 ml) und 17 (12 ml) – 10 μ l auf das SDS-Gel aufgetragen. Das Gesamtprotein wurde mit Coomassie gefärbt. Vereinigt wurden Fraktionen E3-10 (Pool I) und E11-E15 + E17 (Pool II).

Tab. 14. Bilanzierung der Säulenreinigung von HT-I β -N (4 l Kultur) über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie.

Fraktion	Volumen [ml]	Protein-konzentration [μ g/ μ l]	Protein [mg]	Proteinausbeute [mg/l Kultur]
Extrakt	25	18,1	453,4	113,4
Durchlauf	25	17,2	430,8	107,7
Waschfraktion	30	0,62	18,7	4,7
Eluat 3-10* (Pool I)	8	3-4	27,2	6,8
Eluat 11-15* (Pool II)	5	3	14,8	3,6
Eluat 16 (Reeq.)	5	0,2	1,2	0,3
Eluat 17 manuell (Pool II)	12	0,3	4,8	1,2

* Die Daten für diese Fraktionen wurden in der Tabelle zusammengefasst

Ergebnisse

Proteingehalt und Reinheit der Fraktionen wurden zunächst über Proteinbestimmung und SDS-PAGE (Coomassie-Färbung, **Abb. 20**) beurteilt, dann eine Bilanzierung durchgeführt (**Tab. 14**) und Fraktionen ähnlicher Zusammensetzung wie folgt vereinigt: Pool I – E3 bis E10 (Proteinkonzentration $\approx 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, jedoch viele Verunreinigungen) und Pool II – E11 bis E15, E17 (Proteinkonzentration $\approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, reines Protein). Die Fraktion 16 stammte aus der Reäquilibrierung des Reinigungsprogramms und enthielt eine vernachlässigbare Proteinmenge ($\approx 500 \mu\text{g}$ in 5 ml). Sie wurde aus diesem Grund nicht weiter verwendet.

Eine gute Möglichkeit die Proteinpräparationen aufzukonzrieren und von restlichen Verunreinigungen zu befreien, war die Ionenaustauschchromatographie. Da HT-I β -N einen theoretischen pI von 9,47 besitzt, ist es bei einem pH-Wert von 7,4 des verwendeten Puffers effektiv positiv geladen. Aus diesem Grund wurde ein Kationenaustauscher verwendet. Um die NaCl-Konzentration der Proteinpräparation (300 mM) zu erniedrigen und diese damit für die Kationenaustauschchromatographie vorzubereiten wurden beide Pools gegen Phosphatpuffer E (100 mM NaCl) dialysiert.

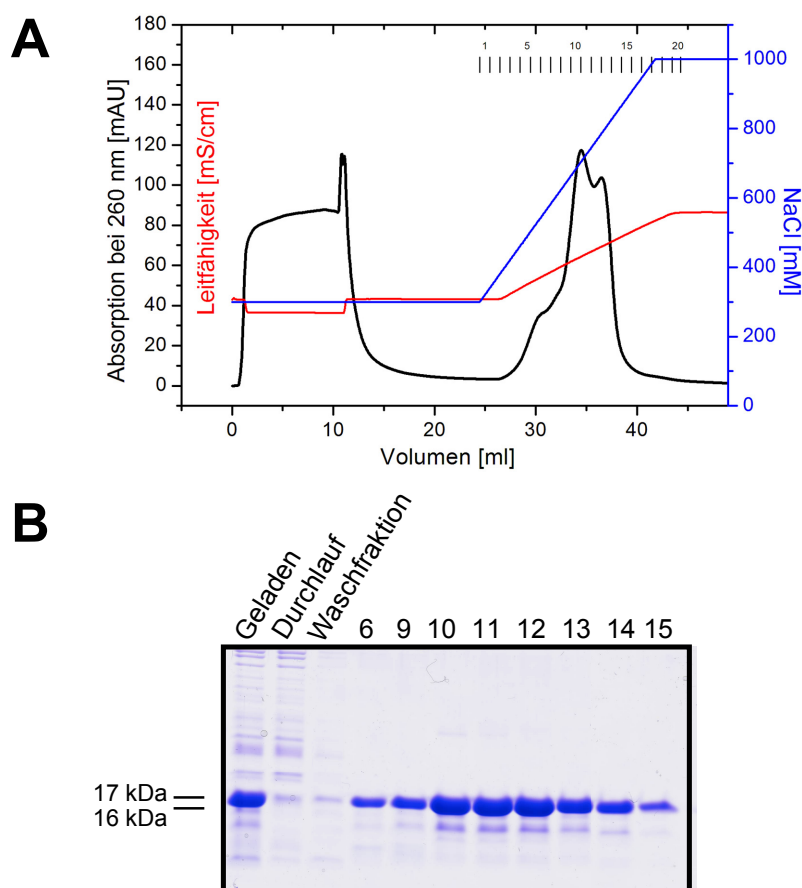


Abb. 21. Kationenaustauschchromatographie (HiTrap SP HP, 1 ml) von Pool I des über Affinitätschromatographie gereinigten HT-I β -N. Es wurde ein Salzgradient von 300 mM auf 1000 mM NaCl in 15 min aufgebaut. Fraktionen á 500 μl wurden gesammelt. Alle Fraktionen, die UV-Absorption aufwiesen (A), wurden gesammelt und durch SDS-PAGE (aufgetragen wurden 10 μl von jeder Fraktion) analysiert (B). HT-I β -N eluierte in drei Peaks von der Säule – einer bei ca. 500 mM, und zwei bei ca. 800 mM NaCl, die allerdings überlappten. Die übrigen Proteine, die nach der Affinitätschromatographie das Eluat kontaminierten, blieben im Durchlauf und in der Waschfraktion.

Ergebnisse

Pool I fiel bei der niedrigen NaCl-Konzentration aus und wurde aus diesem Grunde zurück gegen Phosphatpuffer (300 mM NaCl) dialysiert. Pool II dagegen zeigte keine Präzipitate bei 100 mM NaCl. Beide Pools wurden anschließend einer Kationenaustauschchromatographie unterzogen (**Abb. 21** und **Abb. 22**).

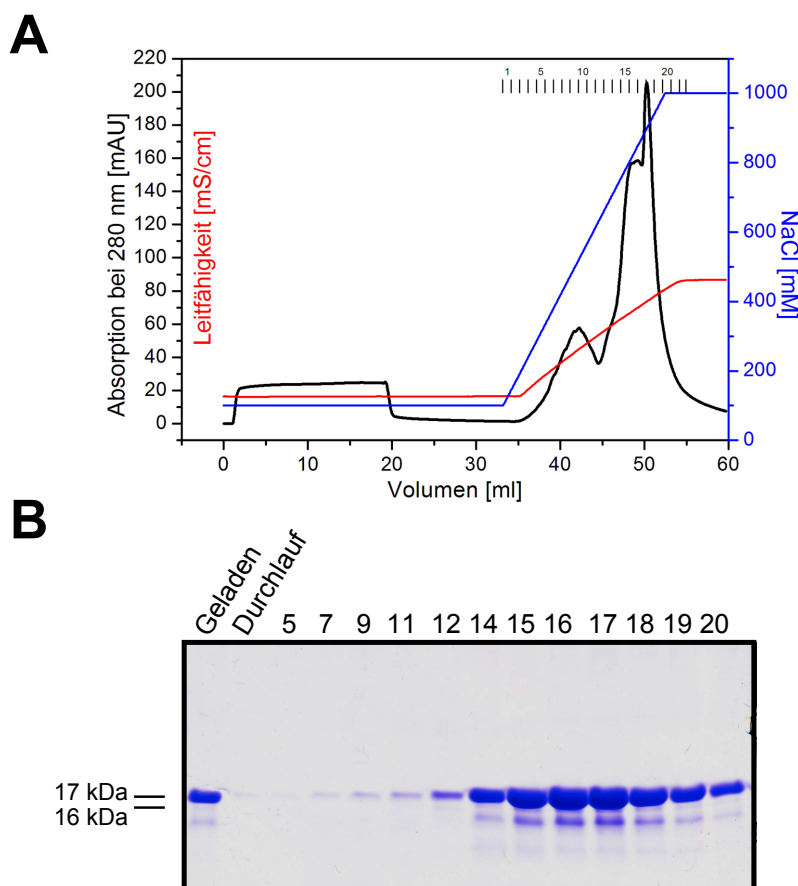


Abb. 22. Kationenaustauschchromatographie (HiTrap SP HP, 1 ml) von Pool II des über Affinitätschromatographie gereinigten HT-I β -N. Es wurde ein Salzgradient von 100 mM auf 1000 mM NaCl in 20 min aufgebaut. Fraktionen á 500 μ l wurden gesammelt. Alle Fraktionen, die UV-Absorption aufwiesen (A), wurden gesammelt und durch SDS-PAGE (aufgetragen wurden 10 μ l von jeder Fraktion) analysiert (B). Es fällt auf, dass das Protein in drei Peaks von der Säule eluierte – einer bei ca. 500 mM, und zwei überlappende bei ca. 800 mM NaCl.

Die Chromatogramme zeigten jeweils drei Elutionspeaks – einer bei ungefähr 500 mM, und zwei, die ineinander übergangen bei ungefähr 800 mM (**Abb. 21** und **Abb. 22**, jeweils **A**). Die Peaks waren bei Pool I weniger gut voneinander aufgelöst, da der hohe Proteingehalt das Auflösungsvermögen der Chromatographie beeinträchtigte. Wie in der SDS-PAGE (Coomassie) zu erkennen ist, handelte es sich bei allen Peaks um HT-I β -N. Im Gel war außer der Bandenstärke kein Unterschied im Proteinbandenmuster der Peaks zu erkennen. Deshalb wurde mit zwei Fraktionen („9“ und „17“) der Kationenaustauschchromatographie des Pools II eine analytische Gelfiltration durchgeführt (**Abb. 23**), um die Konformation von HT-I β -N in diesen Fraktionen zu untersuchen. Die Fraktion „17“ bestand hauptsächlich aus einem

Ergebnisse

Peak, der ungefähr 45 kDa (verglichen mit der Eichgeraden der Standardproteine) entsprach. Dies deutete auf eine Dimerbildung des HT-I β -N (theoretisches Molekulargewicht des Dimers 34 kDa). Ein Trimer (51 kDa) ist nicht auszuschließen, ist aber von der Art der Interaktion zwischen Leucin-Zipper-Domänen schwer denkbar. Ein kleiner Peak im hochmolekularen Bereich (über 158 kDa) konnte durch Aggregation erklärt werden. Die Fraktion „9“ dagegen bestand ausschließlich aus aggregiertem HT-I β -N, da diese als einziger Peak im hochmolekularen Bereich eluierte. HT-I β -N bildete also neben Dimeren auch größere Komplexe, die womöglich durch die Kationenaustauschchromatographie getrennt werden konnten.

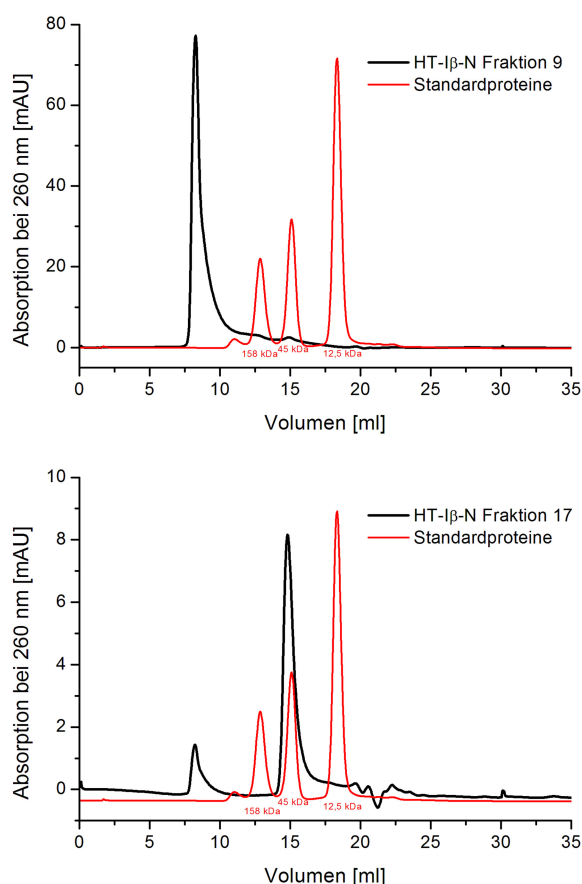


Abb. 23. Gelfiltration (Superdex 200 10/300 GL) der durch die Kationenaustauschchromatographie von Pool II aufgetrennten Fraktionen „9“ (oben) und „17“ (unten). Zum Vergleich sind im Diagramm die Peaks von Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht dargestellt (Größen im Diagramm angegeben), die nicht parallel aufgetragen wurden. Es wurden Aliquots zu je $\approx 50 \mu\text{g}$ in $500 \mu\text{l}$ aufgetragen. Der Hauptpeak der Fraktion 17 eluierte nach einer Retentionszeit, die ca. 45 kDa der Standardeichgeraden entsprach. Ein Nebenpeak im hochmolekularen Bereich wurde ebenfalls detektiert. Die Fraktion „9“ eluierte einheitlich als Peak im hochmolekularen Bereich.

Die Kationenaustauscherfraktionen 10-14 des Pools I und 14-20 des Pools II wurden vereinigt und stellten eine relativ homogene Proteinlösung dar (**Abb. 24**), die für weitere Experimente verwendet wurde. Die Präparation hatte eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und wurde in Phosphatpuffer mit 20% Glycerol bei -20°C aufbewahrt. Nach

Ergebnisse

der Dialyse und Kationenaustauschchromatographie blieben 12 mg HT-I β -N (3 mg/l Kultur) von den 46 mg Protein nach der Affinitätschromatographie übrig. Dieser scheinbar hohe Verlust kam wahrscheinlich durch die Beseitigung der verunreinigenden Proteine (Pool I) und des aggregierten HT-I β -N, aber auch durch Verluste, die mit jedem Reinigungsschritt einhergehen, zustande.

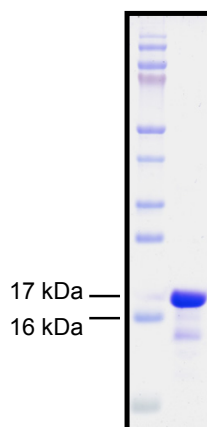


Abb. 24. Endpräparation von HT-I β -N. Es wurden 5 μ l (5 μ g) der für die weiteren Versuche verwendeten Proteinlösung aufgetragen.

C.3.3. Charakterisierung von HT-I β -N

Mit der homogenen HT-I β -N Proteinpräparation wurden funktionelle Analysen durchgeführt, um das inhibitorische Potential zu überprüfen. Dabei wurde der Einfluss auf gereinigte cGKI α und cGKI β *in vitro* (Kinase-Assay) untersucht, wie auch der Effekt auf das Wachstum von VSMCs in Zellkulturexperimenten.

C.3.3.1. Einfluss von HT-I β -N auf die Aktivität von cGKI α und cGKI β

Es wurde die Kinaseaktivität von cGKI α und cGKI β in drei Aktivierungszuständen (basal, halbmaximal-aktiviert und maximal aktiviert) allein und unter Zugabe von 1 μ M HT-I β -N (und damit in einer ungefähr 1000-mal höheren Konzentration zu der monomeren cGKI im Test) gemessen (**Abb. 25**). Die Aktivität von cGKI α wurde durch HT-I β -N nur leicht gesenkt (bei der K_a -entsprechenden cGMP-Konzentration von 59% auf 49% und bei der sättigenden cGMP-Konzentration von 100% auf 93%). Im Gegensatz dazu wurde die cGKI β -Aktivität deutlich reduziert (bei der K_a -entsprechenden cGMP-Konzentration von 55% auf 37% und bei der sättigenden cGMP-Konzentration von 100% auf 63%). Die Basalaktivität beider Kinasen wurde leicht erniedrigt (von 20% bzw. 22% auf 16%). Diese Ergebnisse deuten auf eine isoformspezifische Inhibition der Kinaseaktivität von cGKI β hin.

Ergebnisse

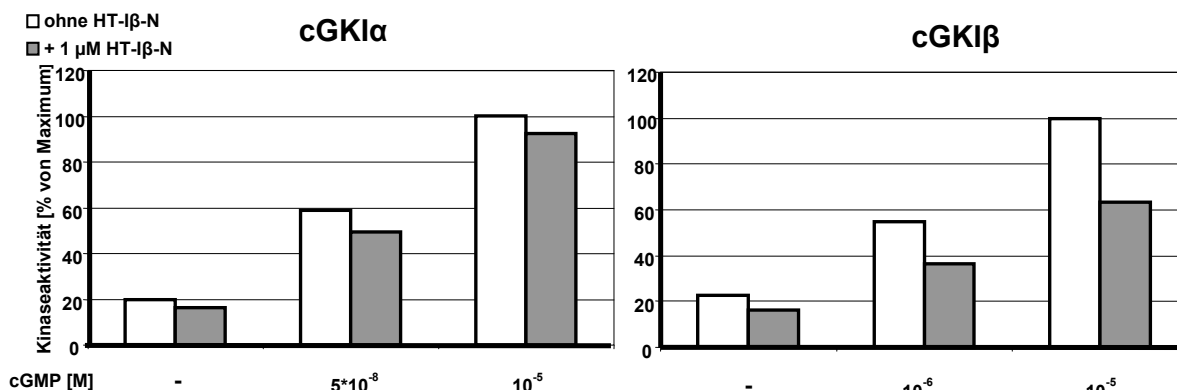


Abb. 25. Einfluss von HT-β-N auf die Kinaseaktivität der cGKIα (links) und der cGKIβ (rechts). Die Kinaseaktivität ($\mu\text{mol Substrat /min} \times \text{mg Enzym}$) wurde prozentual auf die Aktivität, die mit der höchsten cGMP-Konzentration erreicht wurde, bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung ($n = 2$) aus einem repräsentativen Versuch.

C.3.3.2. Einfluss von HT-β-N auf das cGKI-abhängige Wachstum von VSMCs

Um die Effizienz von HT-β-N als cGKI-Inhibitor zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente mit VSMCs aus WT-Mäusen durchgeführt. Das Adhäsionsverhalten der VSMCs ohne und mit 8-Br-cGMP (1 mM) wurde unter Zugabe von HT-β-N (3 μM) untersucht (**Abb. 26**). Diese Konzentration wurde nach Vorversuchen als optimal gewählt, da sie einen wachstumshemmenden Effekt, jedoch noch keine allgemeine Toxizität aufwies. Je nach Reinheit der Proteinpräparation muss allerdings diese Konzentration aufs Neue austitriert werden.

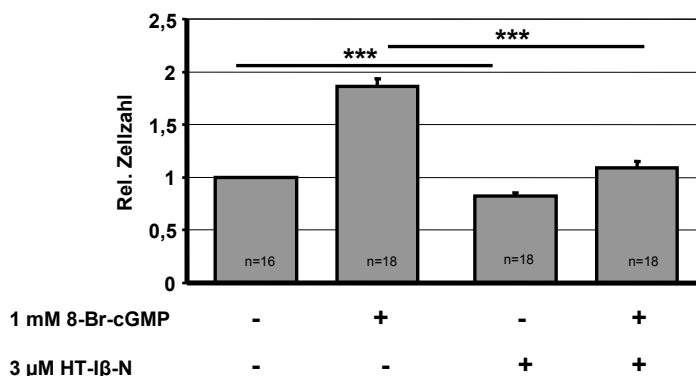


Abb. 26. Einfluss von HT-β-N auf das cGKI-vermittelte Wachstum von WT-VSMCs. 25 000 Zellen/Loch wurden unter direkter Zugabe der Substanzen (1 mM 8-Br-cGMP und/oder 3 μM HT-β-N) in 96-Lochplatten ausgesät und die Anzahl der adhärennten Zellen nach 72 h wurde über den MTS-Assay bestimmt. Die Zellzahl wurde auf die Messwerte der unbehandelten Zellen normalisiert (rel. Zellzahl). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die n-Zahl kommt durch Poolen der einzelnen Löcher (96-Lochplatte) (≥ 5) aus 3 Experimenten zustande. *** entspricht $p < 0,01$.

HT-β-N, der aufgrund der Tat-Sequenz (A.3) in die Zelle gelangen kann, unterdrückte signifikant das cGMP-stimulierte Wachstum der WT-VSMCs. Jedoch wurde auch die Adhäsion der unstimulierten WT-VSMCs durch HT-β-N signifikant

Ergebnisse

reduziert. Über diesen Versuchsansatz konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass cGKI auch unter Basalbedingungen einen adhäsionsstimulierenden Effekt hat, der durch HT-I β -N aufgehoben wurde. Des Weiteren konnte auch keine Aussage über die Isoformspezifität dieser Wirkung getroffen werden, da die WT-VSMCs beide cGKI-Isoformen exprimieren.

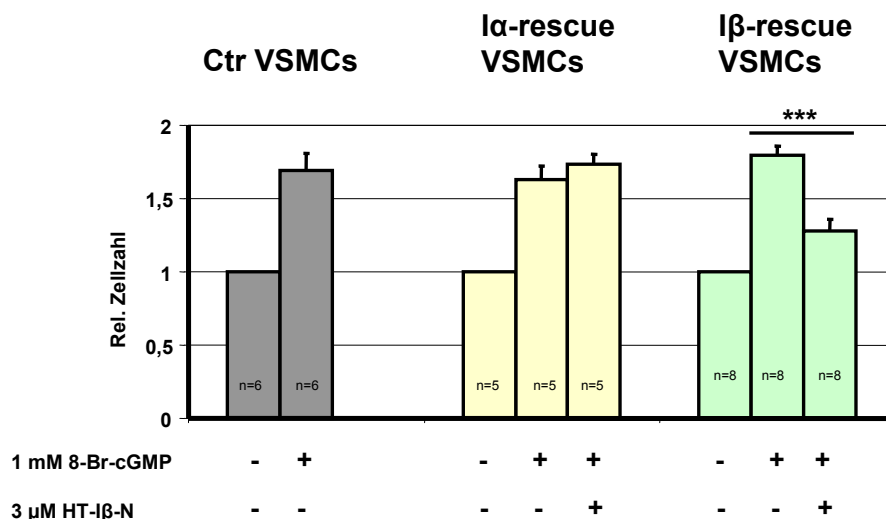


Abb. 27. Einfluss von HT-I β -N auf das cGKI-vermittelte Wachstum von I α - und I β -rescue-VSMCs. 25 000 Zellen/Loch wurden unter direkter Zugabe der Substanzen (1 mM 8-Br-cGMP und/oder 3 μ M HT-I β -N) in 96-Lochplatten ausgesät und die Anzahl der adhären Zellen nach 72 h wurde über den MTS-Assay bestimmt. Die Zellzahl wurde auf die Messwerte der unbehandelten Zellen jedes Genotyps normalisiert (rel. Zellzahl). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus einem Experiment mit n Löchern einer 96-Lochplatte. *** entspricht $p < 0,001$.

Um dies näher zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente mit VSMCs aus cGKI α - und cGKI β -rescue Mäusen [A.1.2, (Weber et al., 2007)] durchgeführt. Diese Mäuse tragen nur je eine cGKI-Isoform als Knock-in im glattmuskelspezifisch exprimierten SM22 α Gen und besitzen keine endogene cGKI (Knockout Hintergrund). Da keine Untersuchungen vorlagen, welche der beiden Isoformen zu dem erhöhten Wachstum der VSMCs beitragen kann, wurde zunächst das Wachstum der VSMCs aus I α - und I β -rescue Mäusen unter Basalbedingungen und unter Zugabe von 8-Br-cGMP (1 mM) verglichen (**Abb. 27**). Beide cGKI-Isoformen induzierten bei cGMP-Stimulation die Adhäsion der VSMCs und zwar im Ausmaß der WT-VSMCs. Bei Zugabe von 3 μ M HT-I β -N konnte der 8-Br-cGMP-Effekt (1 mM) in den cGKI β -exprimierenden VSMCs aufgehoben werden, der in den cGKI α -exprimierenden VSMCs allerdings nicht. Dies deutet auf eine isoformspezifische Wirkung hin, wobei anzumerken ist, dass cGKI α deutlich stärker überexprimiert wird als cGKI β (Weber et al., 2007).

C.3.4. Synthese, Reinigung und Charakterisierung der Peptide tat β 24 und tat β 39

Um zu untersuchen, ob der wachstumshemmende Effekt von HT-I β -N in intakten Zellen auf die Leucin-Zipper-Domäne zurückzuführen war, wurden zwei unterschiedlich lange Peptide synthetisiert – tat β 24 und tat β 39, die 4 bzw. 6 Heptad-Sequenzen des Leucin-Zippers enthielten (s. F.1). Zusätzlich waren die Peptide N-terminal mit der Tat-Sequenz versehen, um sie über Proteintransduktion (s. A.3) in lebende Zellen einzuschleusen.

C.3.4.1. Synthese und Reinigung von tat β 24 und tat β 39

tat β 24 (36 Aminosäuren) und tat β 39 (51 Aminosäuren), sowie die Tat-Sequenz alleine (12 Aminosäuren, s A.3) wurden freundlicherweise von Dr. H. Kalbacher über Festphasenpeptidsynthese (B.6.1) erzeugt. Eine HPLC-Reinigung wurde standardmäßig durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Peptide wurden gefriergetrocknet und in PBS aufgenommen.

C.3.4.2. Einfluss von tat β 24 und tat β 39 auf das cGKI-abhängige Wachstum von VSMCs

Das basale und 8-Br-cGMP-stimulierte (1 mM) Wachstum von primären WT-VSMCs aus der Maus wurde nach Zugabe von tat β 24, tat β 39 oder tat (je 10 μ M) untersucht (**Abb. 28**). Sowohl tat β 24 als auch tat β 39 reduzierten das cGMP-stimulierte Wachstum der Zellen auf ca. 50%. tat β 24 unterdrückte zusätzlich das basale Wachstum. Diese Effekte waren auf die Leucin-Zipper-Sequenz zurückzuführen, da die Tat-Sequenz alleine im Vergleich zu den Kontrollzellen keinen Effekt auf das basale und cGMP-stimulierte Wachstum hatte. Dies deutete darauf hin, dass der Leucin-Zipper des HT-I β -N unter anderem für den wachstumshemmenden Effekt in intakten VSMCs verantwortlich war.

Ergebnisse

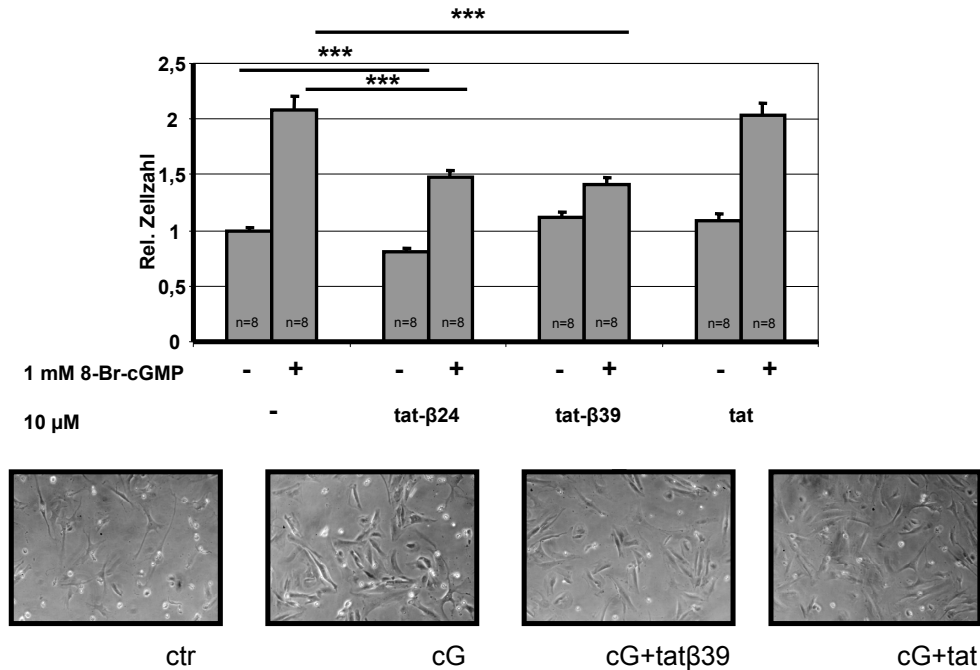


Abb. 28. Einfluss von tat β 24, tat β 39 und tat auf das cGKI-vermittelte Wachstum von WT-VSMCs. 25 000 Zellen/Loch wurden unter direkter Zugabe der Pharmaka/Peptide (1 mM 8-Br-cGMP und je 10 μ M tat β 24, tat β 39 und tat) in 96-Lochplatten ausgesät und die Anzahl der adhären Zellen nach 72 h wurde über den MTS-Assay bestimmt. Die Zellzahl wurde auf die Messwerte der unbehandelten Zellen normalisiert (rel. Zellzahl). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus einem repräsentativen Experiment mit n Löchern einer 96-Lochplatte. *** entspricht $p < 0,001$.

D. Diskussion

Die cytosolische Ser-/Thr-Proteinkinase cGKI, deren zwei Isoformen α und β in der glatten Muskulatur exprimiert werden (Keilbach et al., 1992; Lincoln et al., 1988), ist essentiell für die physiologische Funktion der VSMCs (Pfeifer et al., 1999; Sausbier et al., 2000). Auf der anderen Seite wird sie aber auch mit pathophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht, wie etwa der Entstehung der Atherosklerose (Wolfsgruber et al., 2003). Diese Vorgänge gehen hauptsächlich mit einer Dedifferenzierung, einer erhöhten Proliferation und Migration der VSMCs einher. Um die Signalkaskaden, die von cGKI in Gang gesetzt werden und zu pathologischen Veränderungen der VSMCs führen, näher zu untersuchen, sind pharmakologische Inhibitoren ein wichtiges Werkzeug. Allerdings ist es unentbehrlich, dass potentiell neue Inhibitoren sowohl *in vitro* als auch in geeigneten Zellsystemen getestet werden müssen. Um eine Aussage über die Effizienz und Spezifität der Inhibitoren in intakten Zellen treffen zu können, ist es wiederum von Vorteil Prozesse zu kennen, die eindeutig auf die Aktivität der Kinase zurückzuführen sind (Feil et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Adhäsion primärer VSMCs aus Mausemblen als Hauptkriterium für die Funktion der cGKI benutzt. In diesem Zellsystem weisen die WT-VSMCs nach Aktivierung der Kinase durch das membrangängige Analogon 8-Br-cGMP eine signifikant beschleunigte Adhäsion auf, wogegen 8-Br-cGMP keinen Effekt auf das Wachstum von cGKI-Knockout VSMCs hat (Weinmeister et al., 2008; Wolfsgruber et al., 2003) (s. auch **Abb. 5**). Zusätzlich wurde die Phosphorylierung des cGKI-Substrates VASP (Halbrugge et al., 1990) vor und nach 8-Br-cGMP-Stimulation in WT-VSMCs analysiert und mit cGKI-Knockout-VSMCs verglichen. Ein weiterer Vorteil dieses Zellkultursystems ist die Tatsache, dass es die Prozesse *in vivo* bei der proatherogenen phänotypischen Modulation der VSMCs widerzuspiegeln scheint (S. Feil, persönliche Mitteilung).

D.1. Charakterisierung von Rp-PET und Rp-pCPT

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der zwei zurzeit am häufigsten verwendeten cGKI-Inhibitoren, Rp-PET und Rp-pCPT getestet. Es war bekannt, dass diese cGMP-Analoga an die cGMP-Bindungsstellen der cGKI binden und dadurch den natürlichen Aktivator cGMP verdrängen (kompetitive Hemmung), ohne selbst die Konformationsänderung auszulösen, die zur Aktivierung der Kinase notwendig ist (Butt et al., 1990). *In vitro* Analysen konnten zeigen, dass Rp-PET beide cGKI-Isoformen mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich hemmt (Butt et al., 1995). Dank der hohen relativen Lipophilie (Poppe et al., 2008) wurde Rp-PET als besonders geeignet für Studien mit intakten Zellen gehalten.

Rp-PET konnte in der vorliegenden Arbeit, wenn in äquimolarer Konzentration zu 8-Br-cGMP eingesetzt, weder das erhöhte Wachstum der primären WT-VSMCs (**Abb. 5A**), noch die VASP-Phosphorylierung (**Abb. 6A**) beeinflussen. Erst im 1:4 Verhältnis von 8-Br-cGMP zu Rp-PET konnte eine Inhibition der cGKI-vermittelten Prozesse in WT-VSMCs festgestellt werden (**Abb. 5** und **Abb. 6**, jeweils **B**). Wenn man die höhere Lipophilie von Rp-PET im Vergleich zu 8-Br-cGMP berücksichtigt (46-mal lipophiler), sollte Rp-PET intrazellulär in enormem Überschuss (≈ 200 -mal) zum Agonisten vorliegen, um eine Hemmung der Kinase zu erzielen. Bei diesen Konzentrationen wird jedoch die Spezifität beeinträchtigt, da Rp-PET im mikromolaren Bereich auch cAK hemmt (Pope et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine relativ ineffiziente Inhibition der cGMP-stimulierten cGKI in intakten Zellen durch Rp-PET hin. In Abwesenheit des vollen Agonisten 8-Br-cGMP allerdings hatte Rp-PET schon bei 100 μ M einen klaren stimulierenden Effekt auf cGKI-abhängige Prozesse in VSMCs (**Abb. 5** und **Abb. 6**, jeweils **A**). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass dieses cGMP-Analogon eher ein partieller Agonist als ein Antagonist der cGKI ist.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurden Kinaseaktivitätsmessungen mit gereinigter cGKI α und cGKI β durchgeführt. Rp-PET hemmte die cGMP-stimulierte Kinaseaktivität beider Isoformen mit K_i -Werten, die mit den publizierten korrelierten [(Pope et al., 2008) **Abb. 7**, **Tab. 1**]. In Abwesenheit von cGMP konnte jedoch auch *in vitro* ein partieller agonistischer Effekt beobachtet werden. Rp-PET aktivierte cGKI α auf ca. 38% der maximal durch cGMP erreichten Kinaseaktivität, hatte aber keinen Effekt auf die Aktivität von cGKI β . Eine spontane Umwandlung des Inhibitors in den Aktivator PET wurde über massenspektrometrische Analyse ausgeschlossen. Folglich scheint Rp-PET ein partieller Agonist von cGKI α und ein Antagonist von cGKI β zu sein. Eine mögliche Erklärung könnte in dem cGKI α -spezifischen Vorhandensein einer hochaffinen cGMP-Bindungsstelle liegen, die auch für die im Vergleich zu cGKI β höhere Affinität von cGKI α gegenüber cGMP verantwortlich ist (Ruth et al., 1991). Rp-PET bindet möglicherweise an beide, hochaffine und niederaffine, Bindungsstellen, löst aber nur über die hochaffine die Elongation des Enzyms aus, welche für die Erhöhung der Kinaseaktivität erforderlich ist (Wall et al., 2003).

Da auf Primärstrukturebene die Sequenz der beiden Bindungsstellen selbst identisch ist, kann die Kinetik der cGMP-Bindung lediglich durch den N-terminalen Bereich allosterisch bestimmt sein (Ruth et al., 1997). Um die Bindung von Rp-PET ohne den Einfluss des N-Terminus zu untersuchen, wurden FRET-Messungen mit einem rekombinanten cGMP-Indikator durchgeführt, der die cGMP-Bindungsstellen der cGKI zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen, CFP und YFP, trägt (Russwurm et al., 2007). Durch die Bindung von cGMP wird eine Konformationsänderung ausgelöst, die den Energietransfer von dem angeregten CFP auf YFP reduziert und

einen konzentrationsabhängigem Abfall des FRET-Signals zufolge hat. In der vorliegenden Arbeit lieferte das Verhältnis der CFP- zu YFP-Emission gegen die cGMP-Konzentration aufgetragen eine „Aktivierungskurve“ mit $K_a = 0,3 \mu\text{M}$. Die Bindung von Rp-PET führte zu einer ähnlichen Änderung des FRET-Signals mit $K_a = 0,2 \mu\text{M}$. Die Daten mit dem cGMP-Indikator bestätigten den partiellen agonistischen Effekt, der bei den Experimenten mit gereinigter cGKI α registriert wurde. Folglich induziert Rp-PET die Konformationsänderung der Kinase auch in Abwesenheit des N-Terminus. Dies deutet darauf hin, dass der β -N-Terminus die Aktivierung von cGKI β durch Rp-PET verhindert.

Die *in vitro* Untersuchung des anderen als cGKI-Inhibitor genutzten cGMP-Analogons, Rp-pCPT (Butt et al., 1994), lieferte ähnliche Ergebnisse: auch diese Substanz aktivierte *in vitro* ohne Vorhandensein von cGMP partiell cGKI α und nicht cGKI β (**Abb. 12**), hemmte aber die cGMP-stimulierte Kinaseaktivität (**Abb. 11**).

Erst kürzlich wurde berichtet, dass die Rp-cGMPS-Analoga auch PDEs hemmen können, die cGMP zu GMP abbauen (Poppe et al., 2008). Dadurch kann ein Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels zustande kommen, was die Ausprägung des agonistischen Effekts in intakten Zellen zusätzlich verstärken könnte.

Zusammenfassend sind die Rp-cGMPS-Analoga keine zuverlässigen Antagonisten, da ihre Wirkung von vielen Faktoren bestimmt wird. Je nachdem, welche Isoform in den zu untersuchenden Zellen stärker exprimiert wird und wie hoch der intrazelluläre cGMP-Spiegel ist, können die Substanzen entweder eine Hemmung oder eine Aktivierung der cGKI-Aktivität zufolge haben. Erschwerend kommen unspezifische Effekte auf andere Proteine wie PKA und PDEs hinzu (Poppe et al., 2008). Die hier dargelegten Ergebnisse erklären auch, warum die ursprüngliche Validierung der Rp-cGMPS-Analoga eine effiziente Inhibition der cGKI-abhängigen VASP-Phosphorylierung zeigte. Diese wurde in humanen Thrombocyten durchgeführt (Butt et al., 1994), welche ausschließlich cGKI β exprimieren (Geiselhoringer et al., 2004).

D.2. Konstruktion und Charakterisierung neuer isoformspezifischer Inhibitoren

Neben dem Mangel an zuverlässigen pharmakologischen Inhibitoren der cGKI besteht bei der Untersuchung der cGKI-Signalkaskade in der glatten Muskulatur ein weiteres Problem: Bei der Manipulation der cGKI-Aktivität wäre es wichtig, zwischen beiden Isoformen unterscheiden zu können, um so isoformspezifische Funktionen analysieren zu können. Ein Modell, das für diesen Zweck eingesetzt wird, sind die α und β -*rescue* Mäuse, die die entsprechende Isoform als Knock-in im glattemuskelspezifisch-exprimierten SM22 α Gen tragen und bezüglich der endogenen Kinase Knockout sind (Weber et al., 2007). Allerdings sollte bedacht werden, dass

die Knock-in cGKI verglichen mit dem Wildtyp überexprimiert wird und die Möglichkeit besteht, dass eine Isoform aufgrund ihrer hohen Expression die Funktion der anderen kompensieren kann. Außerdem fehlt in diesem Mausmodell eine Isoform chronisch und kann nicht in einem gewissen Kontext ausgeschaltet werden. Diese Probleme könnten durch die Etablierung isoformspezifischer Inhibitoren umgangen werden. Die offensichtlich einzige mögliche Eingriffsstelle, um die Funktion der cGKI isoformspezifisch zu manipulieren, ist der N-terminale Bereich, da dieser den einzigen Unterschied zwischen cGKI α und cGKI β ausmacht. Der N-Terminus beider Isoformen enthält eine Leucin-Zipper-Domäne, die sowohl für die isoformspezifische Dimerisierung des Enzyms (M. Hillenbrand, persönliche Mitteilung) als auch für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist (Ammendola et al., 2001; Casteel et al., 2005; Surks and Mendelsohn, 2003). Zusätzlich trägt der N-Terminus eine Pseudosubstratsequenz, die die Substratbindungstasche der inaktiven cGKI blockiert. Durch den Einsatz von rekombinantem N-Terminus könnten diese Interaktionen nach einem dominant-negativen Prinzip unterbunden werden. Auf DNA-Ebene wurden die N-Termini mit einem His₆-tag für die Affinitätsreinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose, sowie mit der Proteintransduktionssequenz Tat, die das Durchdringen biologischer Membranen ermöglicht, versehen (pHT-I α -N und pHT-I β -N, **Abb. 15**, Sequenz s. F.1). Coexpression mit den *full length*-Kinasen in Sf9-Zellen und anschließende *Pull-down*-Experimente bestätigten, dass der N-Terminus jeder Isoform die entsprechende *full length*-Kinase bindet (**Abb. 16**). Die Bindung erfolgte im Fall von HT-I β -N über den Leucin-Zipper, da dieser keine Interaktion mit der Leucin-Zipper-defizienten cGKI β -Mutante (cGKI β -M) eingehen konnte.

Um das inhibitorische Potential der rekombinanten N-Termini zu untersuchen, wurden diese in *E. coli* exprimiert und über Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung im *batch*-Verfahren lieferte Ausbeuten von ca. 1,5 mg Protein/l Bakterienkultur (**Tab. 13**), die Präparation war jedoch mit anderen Proteinen verunreinigt (**Abb. 18**). Der gereinigte HT-I β -N lag im Eluat als intaktes Protein vor (**Abb. 18B**), HT-I α -N dagegen wurde während der Reinigung degradiert (**Abb. 18A**). Es handelte sich dabei um einen C-terminalen Abbau, da alle Banden durch einen His₆G-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), was mit der Identifikation eines destabilisierenden Arginin 77 in der N-terminalen Sequenz von cGKI α vereinbar scheint (Scholten et al., 2007). Es wurden verschiedene Bedingungen getestet, um den Abbau zu verhindern, die aber diesen nicht signifikant beeinflussten. Die Expression in Sf9-Zellen lieferte eine homogenere Präparation von HT-I α -N, die aber größtenteils aus Proteinaggregaten bestand wie aus Gelfiltrationsversuchen ersichtlich wurde (Daten nicht gezeigt). Es könnte hilfreich sein, kürzere Varianten des N-Terminus zu konstruieren (ohne Arg77), um die Degradation zu vermeiden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bereits

Diskussion

zwei synthetische Peptide, tata24 und tata39, die 4 bzw. 6 Heptaden des Leucin-Zippers enthalten (F.1), auf VSMCs getestet. Diese hatten jedoch keine (tata24) oder eine toxische (tata39) Wirkung auf die Zellen (Daten nicht gezeigt). Auf eine Säulenreinigung in großem Maßstab, sowie auf eine funktionelle Charakterisierung wurde bei HT-I α -N aufgrund der geschilderten Komplikationen verzichtet.

Nach der erfolgreichen Testreinigung von HT-I β -N im *batch* wurde eine Säulenreinigung über Ni²⁺-Affinitätschromatographie mit anschließender Kationenaustauschchromatographie aus 4 l Bakterienkultur durchgeführt, die eine reine, trotzdem teilweise aggregierten, HT-I β -N-Präparation mit einer Ausbeute von ca. 3 mg/l Bakterienkultur lieferte. Dieser Wert ist etwa um den Faktor zwei höher als die Ausbeute der *batch*-Reinigung (1,3 mg/l), ohne Berücksichtigung der in der *batch*-Präparation zusätzlich vorhandenen Proteine. Durch die zusätzliche Kationenaustauschchromatographie wurden zweierlei positive Effekte erreicht. Einerseits stellte sich die Methode als effektiver zusätzlicher Reinigungsschritt heraus, da die Mehrheit der Proteine negativ geladen ist und nicht an die negativ geladenen funktionellen Gruppen der Säule bindet. So blieben die übrigen bakteriellen Proteine des stark verunreinigten Pool I im Durchlauf und in der Waschfraktion, im Gegensatz zu HT-I β -N, der stark an die Säule bindete und erst bei hohen Salzkonzentrationen abzulösen war (**Abb. 21** und **Abb. 22**). Auf der anderen Seite konnten die Proteinlösungen mit geringer Proteinkonzentration sehr effizient angereichert werden, da die bei Pool II geladenen 17 ml in nur 4 ml eluiert wurden. Die erhaltene HT-I β -N-Präparation (Proteinkonzentration von ca. 1 μ g/ μ l) wurde für weitere Versuche eingesetzt.

Zunächst wurde die Wirkung des HT-I β -N auf gereinigte cGKI α , cGKI β und die Leucin-Zipper-defiziente Mutante cGKI β M *in vitro* untersucht. HT-I β -N hemmte signifikant die cGMP-stimulierte cGKI β , dagegen kaum die cGKI α , was auf eine Isoformspezifität schließen lässt. Interessanterweise hemmte HT-I β -N auch cGKI β M signifikant, was auf eine Leucin-Zipper-unabhängige Inhibition der Kinaseaktivität hindeutet (Daten nicht gezeigt). Ein anderes Motiv innerhalb von HT-I β -N, nämlich die autoinhibitorische Domäne, die im unstimulierten Zustand der cGKI die Bindung des Substrats verhindert, könnte durchaus für die beobachtete Hemmung der Phosphotransferaseaktivität zuständig sein. Obwohl die katalytischen Domänen von cGKI α und cGKI β auf Primärstrukturebene identisch sind, könnte der N-terminale Bereich der jeweiligen Isoform die Tertiärstruktur so beeinflussen, dass nur die entsprechende autoinhibitorische Domäne sterisch in die Substratbindungstasche passt. Dies würde erklären, wieso HT-I β -N die cGKI α nicht hemmt.

Um den Effekt von HT-I β -N auf die cGKI-Aktivität in intakten Zellen zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente mit WT-VSMCs durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der HT-I β -N sowohl das basale, als auch das 8-Br-cGMP-stimulierte Wachstum primärer Maus-VSMCs hemmt. Die Zugabe von HT-I β -N auf cGKI-

Diskussion

Knockout-VSMCs bewirkte auch eine leichte Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen, die aber im Vergleich zu dem wachstumshemmenden Effekt auf die 8-Br-cGMP-stimulierten WT-Zellen viel schwächer war (Daten nicht gezeigt). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das HT-I β -N Protein auch eine unspezifische cGKI-unabhängige Wirkung auf das Wachstum hat. Außerdem konnte durch dieses Experiment nicht beurteilt werden, ob HT-I β -N die Funktion von cGKI β isoformspezifisch beeinflussen kann. Dafür wurde der Wachstumsversuch mit VSMCs aus α - und β -*rescue* Mäusen durchgeführt. HT-I β -N hob den wachstumsfördernden Effekt von 8-Br-cGMP bei den β -*rescue*-VSMCs auf, nicht aber bei den α -*rescue*-VSMCs. Dies sprach für eine isoformspezifische Hemmung der cGKI β und gegen eine unspezifische toxische Wirkung auf das Zellwachstum. Jedoch sollte angemerkt werden, dass die α -*rescue*-Mäuse die cGKI α in den glatten Muskelzellen stärker überexprimieren als β -*rescue*-Mäuse die cGKI β . Folglich könnte die Spezifität der Inhibition eine Frage der Dosis sein. Um die Isoformspezifität von HT-I β -N zu untersuchen, sollte zu Systemen übergegangen werden, die endogen nur eine Isoform exprimieren. In humanen Thrombocyten wird z.B. nur cGKI β exprimiert, deren Aktivität ähnlich wie in den VSMCs anhand der VASP-Phosphorylierung beurteilt werden kann. Für die Analyse der Wirkung von HT-I β -N auf endogene cGKI α bietet sich Mausgewebe wie die Lunge, das Herz oder das Cerebellum an. Allerdings wurde bis jetzt kein direkter Nachweis der cGKI-Aktivität in diesen Geweben beschrieben.

Die Wirkung von HT-I β -N *in vitro* war wahrscheinlich auf die autoinhibitorische Domäne des N-Terminus zurückzuführen. Um die Rolle des Leucin-Zippers für die Hemmung von cGKI-vermittelten Prozessen in intakten Zellen zu untersuchen, wurden die Peptide tat β 24 und tat β 39 synthetisiert, die unterschiedlich lange Bereiche der Leucin-Zipper-Sequenz beinhalten. Diese hatten *in vitro* keinen Effekt auf die Kinaseaktivität von cGKI β (Daten nicht gezeigt), was die Annahme bestätigte, dass die Hemmung der Kinaseaktivität über eine andere Region im N-terminalen Bereich erfolgt. Die Wachstumsversuche mit WT-VSMCs zeigten jedoch, dass der Leucin-Zipper alleine imstande war, dem wachstumsfördernden Effekt von 8-Br-cGMP entgegenzuwirken.

Allerdings bleibt die Frage offen, ob die Peptide und HT-I β -N in Zellen an die Kinase selbst und/oder an ihre Substrate binden. Es ist durchaus auch eine kumulative Wirkung möglich: eine Hemmung der Kinaseaktivität durch die Pseudosubstratsequenz und die gleichzeitige Interaktion mit Substraten über den Leucin-Zipper. Da die Peptide 4 bzw. 6 Heptaden des Leucin-Zippers von insgesamt 8 umfassen, wäre eine Konstruktion und Expression kürzerer Varianten des β -N-Terminus (ohne die Pseudosubstratsequenz) sinnvoll. Deren Charakterisierung würden dazu beitragen, die Pseudosubstratsequenz-abhängigen Effekte eindeutig zu identifizieren.

Diskussion

Die Interaktion von cGKI β mit HT-I β -N, die bei der Coexpression erfolgte, konnte über Ni²⁺ *pull down* mit den bereits gereinigten Proteinen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), evtl. weil die starke Interaktion bei der Coexpression cotranslational über Dimerbildung von Chimären (je eine Untereinheit HT-I α / β -N und *full length* Kinase) stattfindet. *In vitro* könnte die Interaktion zu schwach sein, um diese im konventionellen *pull down* feststellen zu können. Alternativ können auch andere Versuchsansätze herangezogen werden, z. B. könnte durch Gelfiltration untersucht werden, ob eine Verschiebung im Laufprofil von cGKI β nach Zugabe von HT-I β -N erfolgt.

In intakten Zellen könnte die Analyse der Wirkung von HT-I β -N auf Proteine, die *downstream* von der cGKI am gleichen Signalweg beteiligt sind, indirekte Hinweise für eine Interaktion zwischen HT-I β -N und cGKI β erbringen. Die über die cGMP/cGKI-Signalkaskade beschleunigte Adhäsion von VSMCs geht mit einer Hemmung der ROCK (Rho-Kinase) durch cGKI und der daraus resultierenden erhöhten Integrinexposition an der Zelloberfläche einher (Weinmeister et al., 2008). Die pharmakologischen ROCK-Inhibitoren Y27632 und H1152 führten zu einer erhöhten Adhäsion sowohl in den WT- als auch in cGKI-Knockout-VSMCs, die durch zusätzliche Behandlung der WT-VSMCs mit 8-Br-cGMP nicht gesteigert werden konnte. Noch nicht geklärt ist, ob ROCK ein direktes Substrat der Kinase ist. Die Analyse der Wirkung von HT-I β -N auf die über ROCK-Inhibitoren verstärkte Adhäsion von cGKI-defizienten VSMCs, könnte Aufschluss darüber geben, ob der Effekt von HT-I β -N über cGKI selbst oder eventuell über ihre Substrate vermittelt wird.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Menge an Protein, die über eine CPP-Sequenz in die Zelle befördert wurde, nicht zuverlässig quantifiziert werden kann. Eine immunocytochemische Detektion ist technisch durch die Tatsache limitiert, dass sogar nach mildem Fixieren die Proteine, die an der Zellmembran von außen binden, artifiziell ins Zellinnere gelangen (Richard et al., 2003). Aus diesem Grund basierten die Untersuchungen zur Bestimmung der Freisetzung von CPP-gekoppelten Proteinen (in dem Fall Enzymen) ins Cytoplasma auf Messungen derer Enzymaktivität. Zum Beispiel wurde der Erfolg bei der Proteintransduktion der Cre-Rekombinase anhand eines von ihr aktivierten Reportergens beurteilt (Peitz et al., 2002). Für diese Aktivierung reichen allerdings nur wenige Cre-Moleküle aus, die durch die Excision einer Stopp-Kassette die Expression des Reportergens anschalten. Um jedoch die cGKI effizient zu hemmen, muss eine gewisse intrazelluläre Konzentration erreicht werden. Ob dies der Fall ist, kann nur indirekt über die beschriebenen Methoden zum Nachweis der cGKI-Aktivität in intakten Zellen beurteilt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Manipulation des N-Terminus einen neuen viel versprechenden Ansatz für die Etablierung isoformspezifischer

Inhibitoren der cGKI darstellt. Bevor HT-I β -N bzw. die Peptide tat β 24 und tat β 39 in funktionellen Studien eingesetzt werden, müssen jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden, um zu klären, wie die isoformspezifische Hemmung zustande kommt und ob diese auch in anderen Zellsystemen zu verzeichnen ist.

D.3. Zukunftsperspektiven

Es sollten weitere Untersuchungen mit den rekombinanten cGKI-N-Termini durchgeführt werden:

- Die Region, die für die Interaktion zwischen HT-I β -N und cGKI β in Sf9-Insektenzellen bzw. für die Hemmung der Adhäsion durch externe Zugabe von HT-I β -N zuständig ist, könnte durch die Expression von Proteinen, die nur den Leucin-Zipper oder nur die autoinhibitorische Domäne enthalten, identifiziert werden. Zusätzlich könnten chimäre Proteine, die aus dem cGKI α -Leucin-Zipper und der cGKI β -autoinhibitorischen Domäne und umgekehrt bestehen, konstruiert werden, um zu untersuchen, welche Region für die spezifische Hemmung der gereinigten cGKI zuständig ist. Um HT-I α -N als homogene Proteinpräparation reinigen zu können, kann dieser evtl. verkürzt werden (um das destabilisierende Arginin 77 zu umgehen) und/oder der Leucin-Zipper und die autoinhibitorische Domäne getrennt exprimiert werden.
- Es sollte das inhibitorische Potential von HT-I β -N in anderen Zellsystemen analysiert werden. Die Aktivität der cGKI β kann z.B. in humanen Thrombocyten über die Phosphorylierung von VASP oder über eine Hemmung der Thrombin-induzierten Aggregation detektiert werden. Ein sinnvoller Ansatz wäre, die VASP-Phosphorylierung zu induzieren (über 8-Br-cGMP oder pCPT) und durch Zugabe von HT-I β -N zu verfolgen, ob eine Hemmung der Phosphorylierung erzielt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Thrombin-induzierte Aggregation der Thrombocyten durch Aktivierung der cGKI (über 8-Br-cGMP oder pCPT) zu hemmen und zu untersuchen, ob die Zugabe von HT-I β -N diese Hemmung aufzuheben vermag.
- Um eine Interaktion von cGKI β und HT-I β -N in Säugerzellen zu analysieren, kann das pHT-I β -N in eine Zelllinie, die endogen die cGKI exprimiert (z. B. *mouse embryonic fibroblasts*, MEFs), transfiziert werden. Anschließend können die Zellen nicht denaturierend aufgeschlossen werden und das Zellhomogenat für *pull down*-Versuche eingesetzt werden. Interessant wäre auch, zu untersuchen, ob HT-I β -N evtl. andere Proteine bindet, um neue Interaktionspartner der cGKI zu finden.

E. Zusammenfassung

Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) ist eine im Cytosol vorliegende Ser/Thr-Proteinkinase, die durch den sekundären Botenstoff cGMP aktiviert wird. cGKI ist an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt, wie etwa an der Regulation des Blutgefäßtonus, der Thrombocytenaggregation, der Darmperistaltik und auch an komplexeren Vorgängen wie Lernen und Gedächtnis. Es gibt Hinweise darauf, dass neben ihrer essentiellen Rolle bei der Relaxation der glatten Muskulatur die cGKI auch pathologische Prozesse in der Blutgefäßwand begünstigt. Diese könnten hauptsächlich auf einer cGKI-abhängigen Stimulation der Proliferation, Migration und Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) beruhen. Ähnliche Veränderungen der VSMCs gehen mit der Entwicklung der in der westlichen Welt bedeutendsten Gefäßerkrankung, der Atherosklerose, einher. Die Hemmung der cGKI könnte folglich einen neuen therapeutischen Ansatz für die Behandlung der Atherosklerose darstellen. Da in Säugern zwei Isoformen der cGKI existieren (α und β), die beide in den VSMCs exprimiert werden, ist die Etablierung isoformspezifischer Inhibitoren zur weiteren Untersuchung der (patho-)physiologischen Funktionen der jeweiligen cGKI-Isoform dringend notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das inhibitorische Potential der zurzeit am häufigsten verwendeten cGKI-Inhibitoren, Rp-8-Br-PET-cGMPS (Rp-PET) und Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp-pCPT), validiert. In intakten VSMCs konnte Rp-PET der Aktivierung bekannter cGKI-vermittelter Prozesse wie der VASP-Phosphorylierung und der beschleunigten Adhäsion ("Wachstum") durch den Agonisten 8-Br-cGMP nicht effizient entgegenwirken. In Abwesenheit von 8-Br-cGMP aktivierte Rp-PET vielmehr selbst partiell die genannten cGKI-vermittelten Prozesse. *In vitro* hemmte zwar Rp-PET die cGMP-induzierte Kinaseaktivität beider Isoformen, stimulierte jedoch in Abwesenheit des vollen Agonisten cGMP isoformspezifisch die Aktivität von cGKI α . FRET-Messungen mit einem rekombinanten cGMP-Indikator, der die cGMP-Bindungsstellen der Kinase trägt, bestätigten die partiell agonistische Wirkung von Rp-PET. Der chemisch verwandte Inhibitor Rp-pCPT zeigte in Kinase-Assays einen ähnlichen partiell agonistischen Effekt auf cGKI α . Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse scheinen Rp-PET und Rp-pCPT nicht zuverlässig genug für *in vivo*-Analysen der cGKI-Funktion zu sein.

Eine Möglichkeit cGKI-vermittelte Prozesse isoformspezifisch zu hemmen, ist die Manipulation der N-terminalen Domäne. Diese ist der einzige Bereich, in dem sich cGKI α und β auf Primärstrukturebene unterscheiden. Der N-Terminus trägt u. a. ein Leucin-Zipper-Motiv, das für die Interaktion mit anderen Proteinen und für die Homodimerisierung der cGKI-Isoformen zuständig ist. Die externe Zugabe des

Zusammenfassung

Leucin-Zippers könnte auf eine dominant-negative Art die Funktionen der Isoformen blockieren. Für diesen Zweck wurden die N-Termini der zwei Isoformen (HT-I α -N und HT-I β -N), bestehend aus dem Leucin-Zipper und der Pseudosubstratsequenz, als membrangängige, rekombinante Proteine exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Da von HT-I α -N keine intakte, homogene Proteinpräparation hergestellt werden konnte, wurde dieses Konstrukt nicht weiter charakterisiert. Die Wirkung von HT-I β -N auf cGKI α und β *in vitro*, sowie auf VSMCs in Primärkultur wurde näher untersucht. HT-I β -N reduzierte die Kinaseaktivität gereinigter cGKI β , aber nicht die gereinigter cGKI α und hemmte das cGKI-abhängige Wachstum von VSMCs. Erste Versuche mit VSMCs aus transgenen Mäusen, die nur eine der Isoformen exprimieren, deuteten darauf hin, dass der wachstumshemmende Effekt von HT-I β -N auf eine selektive Inhibition der cGKI β -vermittelten Signaltransduktion zurückzuführen war. Um herauszufinden, ob die Hemmung der cGKI in Zellen durch HT-I β -N auf den Leucin-Zipper allein zurückzuführen war, wurde dieser in Form kurzer, membrangängiger Peptide (tat β 24 und tat β 39) eingesetzt. Auch diese Peptide hemmten das cGKI-vermittelte Wachstum von VSMCs.

Die isoformspezifische Manipulation der cGKI-Signaltransduktion über Peptide oder kleine Proteine stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit zur weiteren Untersuchung der spezifischen Funktion der beiden cGKI-Isoformen dar. Möglicherweise könnten solche oder ähnliche cGKI-Inhibitoren auch zur Therapie von menschlichen Gefäßerkrankungen eingesetzt werden.

Anhang

38 Q Y A **L** Q E K I E E **L** R Q R D A L **I** D E
PstI

2261 CTGGAGCTGGAGTTGGATCAGAAGGACGAACTGATCCAGAAGCTGCAGAACGAGCTGGAC
58 L E L E **L** D Q K D E L **I** Q K L Q N E **L** D

2321 AAGTACCGCTCGGTGATCCGGCCGGCCACCCAGCAGGCGCAGAAGCAGAGCGCGAGCACC
78 K Y R S V **I** R P A T Q Q A Q K Q S A S T

2381 TTGCAAGGCGAGCCGCGCACCAAGCGGCAGGCGATCTCCGCTGAGCCCACCGCCTTTGAC
98 L Q G E P R T **K R Q A** I S A E P T A F D

2441 ATCCAGGATCTCAGCCATGTGACCCTGCCCTTCTACCCCAAGAGTCCACAGTCCAAAGAT
118 I Q D L S H V T L P F Y P K S P Q S K D

XhoI / **NV4**

2501 CTC**TAG**ctcgagcaccaccatcaccatcaccatcactaagtgattaacctcaggtgcagg
138 L - **NV6**

2561 ctgcctatcagaagtggtggtggtggtggtgccaatgccctggctcacaataccactgag
2621 atcgatcttttccctctgcaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctg
2681 acttctggctaataaaggaaattttattttcattgcaatagtgtggttgaattttttgtgt
2741 ctctcactcgaaggacatatggggagggcaaatcatttaaacatcagaatgagattttg

T7 Terminator

2801 gtttagagtttgcaacatatgcccatatgtaa**ctagcataacccttggggcctctaa**
2861 **cgggtcttgagggttttttg**ctgaaagcatgcgaggaa

cGK1α

-6 aaaaac**ATG**AGCGAGCTGGAGGAAGACTTTGCCAAGATTCTCATGCTCAAGGAGGAGAGG
1 M **S** E L E E D F **A K I** **I** M L K E **E** R
.....

55 ATCAAAGAGCTGGAGAAGCGGCTGTCAAGAGAAGGAGGAAGAAATCCAGGAGCTGAAGAGG
18 **I** K E L E K R **L** S E K E E E **I** Q E L K R
.....

115 AACTCCATAAATGCCAGTCAGTGCTGCCCGTGCCCTCGACCCACATCGGCCCGCGACC
38 **K** **L** H K **C** Q S V **L** P V P S T H **I** G P R T
.....

175 ACCGGGCACAGGGCATCTCGGCCGAGCCGACAGCTACAGGTCCTTCCACGACCTCCGA
58 **T* R A Q G** I S A E P Q T Y R **S* F H D L R**

235 CAGGCATTCGGGAAGTTCACCAAATCCGAAAGGTCCAAGGATCTCATAAAGGAGGCCATC
78 Q A F R K F **T* K S E R**] S K D L I K E A I

295 CTTGACAATGACTTTATGAAGAACTTGGAGCTGTCACAGATCCAAGAGATTGTGGATTGT
98 L D N D **[F M K N L E L S Q I Q E I V D C**

355 ATGTACCCAGTGGAGTACGGCAAAGACAGCTGCATCATCAAAGAAGGAGATGTGGGGTCA
118 M Y P V E Y G K D S C I I K E G D V G S

415 CTGGTGTATGTCATGGAAGATGGTAAGGTTGAAGTTACAAAAGAAGGCGTGAAGCTGTGC
138 L V Y V M E D G K V E V T K E G V K L C

475 ACAATGGGTCCTGGTAAAGTGTGGAGAGTTGGCTATCCTTTACAACGTACCCGGACG
158 T M G P G K V F G E L A I L Y N C T R T

535 GCGACCGTCAAACTCTTGTAATGTGAAACTCTGGGCCATTGATCGACAATGTTTTTCAG
178 A T V K T L V N V K L W A I D R Q C F Q

595 ACGATAATGATGAGGACAGGACTTATCAAGCATACCGAGTATATGGAATTTTTAAAAAGC
198 T I M M R T G L I K H T E Y M E F L K S

655 GTTCCAACATTCCAGAGCCTTCCTGAAGAGATCCTCAGTAAGCTTGCTGACGTCCTTGAA
218 **V P**] **[T F Q S L P E E I L S K L A D V L E**

Anhang

715 GAGACCCACTATGAAAATGGGGAATATATCATCAGGCAAGGTGCAAGAGGGGACACCTTC
238 E T H Y E N G E Y I I R Q G A R G D T F

775 TTTATCATCAGTAAAGGAAAGGTTAATGTCACCTCGTGAAGACTCGCCCAATGAAGACCCA
258 F I I S K G K V N V T R E D S P N E D P

835 GTCTTTCTTAGAACCTTAGGAAAAGGAGATTGGTTTGGAGAGAAAGCCTTGCAGGGGGAA
278 V F L R T L G K G D W F G E K A L Q G E

895 GATGTGAGAACAGCGAATGTAATTGCGGCAGAAGCTGTAACCTGCCTTGTGATCGACAGA
298 D V R T A N V I A A E A V T C L V I D R

955 GACTCTTTCAAACATTTGATTGGAGGATTAGATGATGTTTCTAATAAAGCATATGAAGAT
318 D S F K H L I G G L D D V S N K A Y E D

1015 GCAGAAGCTAAGGCAAAATATGAAGCTGAAGCTGCTTTCTTCGCCAACCTGAAGCTGTCT
338 A E A] K A K Y E A E A A F F A N L K L S

1075 GATTTCAACATCATTGACACCCTTGGAGTTGGAGGTTTTCGGACGCGTAGAACTGGTCCAG
358 D [F N I I D T L G V G G F G R V E L V Q

1135 TTAAAAAGTGAAGAATCCAAAACCTTTGCAATGAAGATTCTCAAGAAACGGCACATCGTG
378 L K S E E S K T F A M K I L K K R H I V

1195 GATACAAGACAGCAGGAACACATCCGCTCGGAGAAGCAGATCATGCAGGGGGCCCATTCG
398 D T R Q Q E H I R S E K Q I M Q G A H S

1255 GACTTCATAGTGAGATTATACAGAACATTTAAGGACAGCAAATATTTGTATATGTTGATG
418 D F I V R L Y R T F K D S K Y L Y M L M

1315 GAAGCTTGCCTAGGTGGAGAGCTCTGGACCATTCTCAGGGATCGGGGGTCATTTGAAGAT
438 E A C L G G E L W T I L R D R G S F E D

1375 TCTACAACCAGATTTTATACAGCATGTGTGGTAGAAGCTTTTGCCTATCTGCATTCCAAA
458 S T T R F Y T A C V V E A F A Y L H S K

1435 GGAATCATTTACAGGGACCTCAAGCCTGAAAATCTCATCCTAGATCACCGAGGTTATGCC
478 G I I Y R D L K P E N L I L D H R G Y A

1495 AAAGCTGTTGATTTTGGCTTTGCAAAGAAAATAGGATTTGGAAAAGAAAACATGGACTTTT
498 K L V D F G F A K K I G F G K K T W T F

1555 TGTGGGACTCCAGAATATGTAGCCCCAGAGATCATCCTGAACAAAGGCCATGACATTTCA
518 C G T P E Y V A P E I I L N K G H D I S

1615 GCCGACTATTGGTCACTGGGAATCCTCATGTATGAGCTTCTGACTGGCAGCCACCTTTC
538 A D Y W S L G I L M Y E L L T G S P P F

1675 TCAGGCCAGATCCTATGAAAACCTATAACATCATATTGAGGGGGATTGACATGATAGAG
558 S G P D P M K T Y N I I L R G I D M I E

1735 TTTCCAAAGAAGATTGCCAAAAATGCTGCTAATTTAATTAATAAAGACTATGCAGGGATAAT
578 F P K K I A K N A A N L I K K L C R D N

1795 CCATCAGAAAGATTAGGGAATTTGAAAAACGGAGTGAAAGACATTCAAAGCACAAATGG
598 P S E R L G N L K N G V K D I Q K H K W

1855 TTTGAGGGCTTTAATTTGGGAAGGCTTAAGAAAAGGCACCTTGACACCTCCTATAATACCA
618 F] [E G F N W E G L R K G T L T P P I I P

1915 AGTGTTCATCACCCACAGACACAAGCAATTTTGGAGTTTCCCTGAGGACAATGATGAA
638 S V A S P T D T S N F D S F P E D N D E

Anhang

1975 CCGCCACCTGATGACAACCTCAGGATGGGACATAGACTTC**TAA**tgtatttctcttacctgc
658 **P P P D D N S G W D I D F** -

2035 ttctgccttgctgaagacagctttttctaagacacagctgccagcaaacctgaaggaaag
2095 agagaagctgagtgcttgggtcaccatgatgcctttgatcgatgctgctccagtaacta
2155 cagtggcattaggacttattgcttagatgacagtagtgctctttacatgttttctgtttc
2215 aacctaaatatagcagttgacatggtggtcctgaagcaaagcctttcaccactaaagaga
2275 tgttctccactgttgcaatgatcttgctttgctctgattatattgaaagactgtaagaac
2335 cacttcaatctagtaaaagagtcagtaccttgctagaattatcaagaagatcaaaaaata
2395 atatattgggtacgatagattactatggtacaaaaactggactcttccttcttcaggtga
2455 gggttgctcggttctgtttctgcaagccagtgtatataccgtacacaagaggaccacacat
2515 ctggttgctcacagaggatcatgtcaaccagtgtagaagtttcatgattttatcccag
2575 cagtgctgatgacgagctgaatgttacctttcctttctgacagattttaaaaattggta
2635 tgataaaagcacaactgctatggattctgctgagaaatttcatagcaggtacatacgtgt
2695 tttcacagaggactgaagaaaaatcaacatgcatgtatctgttcatttctttttgataaa
2755 ttggcatgacagaat

cGKIβ

-163 gcagactgggcatgctcagaagccaagcctggctttggctcaagtcggaagctttcgca
-103 ctgggaggcagcagcagcactttgggaaagtgtgatcggagaggggaggaagccccaagac
-43 cgggagcagcggcaggaaggaagcggcagcccgagcgggagagc**ATG**GGCACCTGCGGGAT
1 M [G T **L** R D

18 TTACAGTATGCGCTCCAGGAGAAGATCGAGGAGCTGAGGCAGCGGGATGCTCTCATCGAC
6 **L Q Y A **L** Q E K I E E **L** R Q R D : A L **I** D**
.....

78 GAGCTGGAGCTGGAGTTGGATCAGAAGGACGAAGCTGATCCAGAAGCTGCAGAACGAGCTG
26 **E L E L E **L** D Q K D E L **I** Q K L Q N E **L** :**
.....

138 GACAAGTACCGCTCGGTGATCCGGCCGGCCACCCAGCAGGCGCAGAAGCAGAGCGCGAGC
46 **D K Y R S V **I** R P A T Q Q A Q K Q S* A S**

198 ACCTTGCAAGGCGAGCCGCGCACCAAGCGGCAGGCGATCTCCGCTGAGCCACCGCCTTT
66 **T L Q G E P R T **K R Q A** I S* A E P T A F**

258 GACATCCAGGATCTCAGCCATGTGACCCTGCCCTTCTACCCCAAGAGTCCACAGTCCAAG
86 **D I Q D L S H V T L P F Y P K S P Q] S K**

318 GATCTCATAAAGGAGGCCATCCTTGACAATGACTTTATGAAGAAGCTTGGAGCTGTCACAG
106 **D L I K E A I L D N D [F M K N L E L S Q**

378 ATCCAAGAGATTGTGGATTGTATGTACCCAGTGGAGTACGGCAAAGACAGCTGCATCATC
126 **I Q E I V D C M Y P V E Y G K D S C I I**

438 AAAGAAGGAGATGTGGGGTCACTGGTGTATGTCATGGAAGATGGTAAGGTTGAAGTTACA
146 **K E G D V G S L V Y V M E D G K V E V T**

498 AAAGAAGGCGTGAAGCTGTGCACAATGGGTCTGGTAAAGTGTTTGGAGAGTTGGCTATC
166 **K E G V K L C T M G P G K V F G E L A I**

558 CTTTACAACCTGTACCCGGACGGCGACCGTCAAAACTCTTGTAATGTGAAACTCTGGGCC
186 **L Y N C T R T A T V K T L V N V K L W A**

618 ATTGATCGACAATGTTTTTCAGACGATAATGATGAGGACAGGACTTATCAAGCATAACCGAG
206 **I D R Q C F Q T I M M R T G L I K H T E**

678 TATATGGAATTTTTTAAAAAGCGTTCCAACATTCCAGAGCCTTCTGAAGAGATCCTCAGT
226 **Y M E F L K S V P] [T F Q S L P E E I L S**

Anhang

738 AAGCTTGCCGACGTCCTTGAAGAGACCCACTATGAAAATGGGGAATATATCATCAGGCAA
246 K L A D V L E E T H Y E N G E Y I I R Q

798 GGTGCAAGAGGGGACACCTTCTTTATCATCAGTAAAGGAAAGGTTAATGTCACCTCGTGAA
266 G A R G D T F F I I S K G K V N V T R E

858 GACTCGCCCAATGAAGACCCAGTCTTTCTTAGAACCTTAGGAAAAGGAGATTGGTTTGGGA
286 D S P N E D P V F L R T L G K G D W F G

918 GAGAAAGCCTTGCAGGGGGAAGATGTGAGAACAGCGAATGTAATTGCGGCAGAAGCTGTA
306 E K A L Q G E D V R T A N V I A A E A V

1078 ACCTGCCTTGTGATCGACAGAGACTCTTTCAAACATTTGATTGGAGGATTAGATGATGTT
326 T C L V I D R D S F K H L I G G L D D V

1138 TCTAATAAAGCATATGAAGATGCAGAAGCTAAGGCAAAATATGAAGCTGAAGCTGCTTTC
346 S N K A Y E D A E A] K A K Y E A E A A F

1198 TTCGCCAACCTGAAGCTGTCTGATTTCAACATCATTGACACCCTTGGAGTTGGAGGTTTC
366 F A N L K L S D [F N I I D T L G V G G F

1258 GGACGCGTAGAACTGGTCCAGTTAAAAAGTGAAGAATCCAAAACCTTTGCAATGAAGATT
386 G R V E L V Q L K S E E S K T F A M K I

1318 CTCAAGAAACGGCACATCGTGGATAACAAGACAGCAGGAACACATCCGCTCGGAGAAGCAG
406 L K K R H I V D T R Q Q E H I R S E K Q

1378 ATCATGCAGGGGGCCCATTCGGACTTCATAGTGAGATTATACAGAACATTTAAGGACAGC
426 I M Q G A H S D F I V R L Y R T F K D S

1438 AAATATTTGTATATGTTGATGGAAGCTTGCCTAGGTGGAGAGCTCTGGACCATTCTCAGG
446 K Y L Y M L M E A C L G G E L W T I L R

1498 GATCGGGGGTCATTTGAAGATTCTACAACCAGATTTTATACAGCATGTGTGGTAGAAGCT
466 D R G S F E D S T T R F Y T A C V V E A

1558 TTTGCCTATCTGCATTCCAAAGGAATCATTACAGGGACCTCAAGCCTGAAAATCTCATC
486 F A Y L H S K G I I Y R D L K P E M L I

1618 CTAGATCACCGAGGTTATGCCAAACTGGTTGATTTTGGCTTTGCAAAGAAAATAGGATTT
506 L D H R G Y A K L V D F G F A K K I G F

1678 GGAAAGAAAACATGGACTTTTTGTGGGACTCCAGAATATGTAGCCCCAGAGATCATCCTG
526 G K K T W T F C G T P E Y V A P E I I L

1738 AACAAAGGCCATGACATTTTCCAGCCGACTATTGGTCACTGGGAATCCTCATGTATGAGCTT
546 N K G H D I S A D Y W S L G I L M Y E I

1798 CTGACTGGCAGCCACCTTTCTCAGGCCAGATCCTATGAAAACCTATAACATCATATTG
566 L T G S P P F S G P D P M K T Y N I I L

1858 AGGGGGATTGACATGATAGAGTTTCCAAAGAAGATTGCCAAAAATGCTGCTAATTTAATT
586 K G I D M I E F P K K I A K N A A N L I

1918 AAAAACTATGCAGGGATAATCCATCAGAAAGATTAGGGAATTTGAAAACCGGAGTGAAA
606 K K L C R D N P S E R L G N L K N G V K

1978 GACATTCAAAAGCACAAATGGTTTTGAGGGCTTTAATTGGGAAGGCTTAAGAAAAGGCACC
626 D I Q K H K W F] [E G F N W E G L R K G T

2038 TTGACACCTCCTATAATACCAAGTGTTCATCACCCACAGACACAAGCAATTTTGCAGT
646 L T P P I I P S V A S P T D T S N F D S

Anhang

2098 TTCCTGAGGACAATGATGAACCGCCACCTGATGACAACCTCAGGATGGGACATAGACTTC
 666 [F P E D N D E P P P D D N S G W D I D F]

2158 TAAtgtatttctcttacctgcttctgccttgctgaagacagctttttctaagacacagct
 -

2218 gccagcaaacctgaaggaaagagagaagctgagtgcttggggcaccatgatgcctttga
 2278 tcgatgctgctccagtaactacagtggcattaggacttattgcttagatgacagtagtgc
 2338 tctttacatgttttctgtttcaacctaaatatagcagttgacatggtggtcctgaagcaa
 2398 agcctttcaccactaaagagatgttctccactgttgcaatgatcttgctttgctctgatt
 2458 atattgaaagactgtaagaaccacttcaatctagtaaaagagtcagtaccttgctagaat
 2518 tatcaagaagatcaaaaaataatattgggtacgatagattactatggtacaaaaactg
 2578 gactcttcttcttcagggtgaggggtgtcggttctgtttctgcaagccagtgatataacc
 2638 gtacacaagaggaccacacatctgttggtcacagaggtcatgtcaaaccagtgctagaag
 2698 tttcatgattttatttcccagcagtgctgatgacgagtctgaatgttacctttcctttct
 2758 gacagattttaaaaattggtatgataaaagcacaactgctatggattctgctgagaaatt
 2818 tcatagcaggtacatacgtgttttcacagaggactgaagaaaaatcaacatgcatgtatc
 2878 tgttcatttctttttgataaattggcatgacagaat

Nucleotidsequenz¹⁰: untranslatierte Bereiche sind in Kleinbuchstaben angegeben, translatierte Bereiche in Großbuchstaben. Start- und Stopp-Codon sind fett und unterstrichen. Die Lage der verwendeten Primer ist markiert (→).

Aminosäuresequenz¹¹: Es sind einzelne Motive und Domänen hervorgehoben. Das N-terminale Methionin wird nach Translation entfernt (bei der Nummerierung ist dieses Met nicht mit eingeschlossen). Der N-Terminus der cGKI α liegt modifiziert als N-Acetylserin (S) vor. Innerhalb der N-terminalen Domäne von cGKI α (■) und cGKI β (■) liegt das Leucin-Zipper Motiv (I oder L), die Pseudosubstrat-Sequenz (unterstrichen, fett) und einige Autophosphorylierungsstellen (S* oder T*). Daneben ist in der Sequenz der cGKI α das Cys-42 markiert, über welches eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei α Untereinheiten gebildet werden kann (C). Es ist ebenso das für limitierte Proteolyse anfällige Arginin (R) gezeigt, was zu einem konstitutiv aktiven Fragmentes (65 kDa) der cGKI α aber nicht cGKI β führt. Beide Isoformen besitzen ab dem Sequenzmotiv SKDL... identische Sequenz. Darauf folgend schließt sich die regulatorische Domäne an, die aus cGMP-Bindungsstelle 2 (■) und 1 (■) besteht. Innerhalb der katalytischen Domäne (■) liegen die putativen Regionen für **Mg²⁺-ATP-Bindung**, **Phosphotransfer** und **Substrat-Bindung**. Es schließt sich an die katalytische Domäne der relativ kurze AGC-Kinase-C-Terminus (■) an. Peptide des N-Terminus von cGKI α und β sind durch Boxen mit durchgezogener tata39 bzw. tat β 39) und gestrichelter Linie (tata24 bzw. tat β 24) markiert.

F.2. Plasmide, Primer und Baculoviren

Tab. 15. Für die Klonierung verwendete Plasmide.

Plasmid	Größe	Resistenz	Promotor	Verwendung	Referenz
pTriEx-HTNC	6,8 kb	Amp	β -actin, p10, T7	pTriEx-1 backbone mit His- und Tat-Sequenz	(Peitz et al., 2002)
p α -N-Term (SphI)	5,2 kb	Amp	-	Quelle für die cDNA des cGKI α -N-Terminus	Robert Feil
p β -N-Term (SphI)	5,2 kb	Amp	-	Quelle für die cDNA des cGKI β -N-Terminus	Robert Feil
pFastBac myc (XbaI)	4,7 kb	Amp, Gent	PH	Donorplasmid für die Erzeugung rekombinanter Baculoviren	Matthias Hillenbrand

¹⁰ (Wernet et al., 1989)

¹¹ Aminosäuresequenz und Domänen/Motive: UniProtKB/Swiss-Prot Einträge P00516 (α) und P21136 (β) (Feil, 1994)

Anhang

Tab. 16. Verwendete Primer.

Primer	Länge	Sequenz 5'→3'	Schmelz-Temperatur	Orientierung	Bindungsstelle
NV1	35mer	TCC CCG CCG TAA GCT TGA GCG AGC TGG AGG AAG AC	76,5°C	vorwärts	cGKI α
NV2	36mer	AGG CCG CCG CTC GAG CTA GAG ATC TTT GGA CCT TTC	75,2°C	rückwärts	cGKI α
NV3	35mer	TCC CCG CCG TAA GCT TGG GCA CCC TGC GGG ATT TA	76,5°C	vorwärts	cGKI β
NV4	36mer	AGG CCG CCG CTC GAG CTA GAG ATC TTT GGA CTG TGG	76,3°C	rückwärts	cGKI β
NV6	20mer	TCT GAT AGG CAG CCT GCA CC	61,4°C	rückwärts	pTri-Ex1
RF53	21mer	CCT GGC TGT GAT TTC ACT CCA	59,8°C	vorwärts	cGKI Intron 10
RF118	24mer	AAA TTA TAA CTT GTC AAA TTC TTG	50,8°C	rückwärts	cGKI Intron 11
RF125	17mer	GTC AAG TGA CCA CTA TG	50,4°C	rückwärts	cGKI Intron 10
RF67	21mer	CTC AGA GTG GAA GGC CTG CTT	61,8°C	vorwärts	SM22 α Intron 1
RF90	20mer	CAC ACC ATT CTT CAG CCA CA	57,3°C	rückwärts	SM22 α Exon 2
SW8	18mer	AAC TCC AGC TCC AGC TCG	58,2°C	rückwärts	cGKI Exon 1b (β)
SW12	23mer	CCT CCT TGA GCA TGA GAA TCT TG	60,6°C	rückwärts	cGKI Exon 1a (α)

Tab. 17. Verwendete Baculoviren.

Virus	Kodiertes Protein	Bezugsquelle	Referenz
I α -WT	cGKI α	Robert Feil	(Feil et al., 1993)
I β -WT	cGKI β	Peter Ruth	(Ruth et al., 1997)
I β -M	N-terminal-trunkierte cGKI β (54-685)	Robert Feil	-

F.3. Antikörper

Tab. 18. Verwendete primäre Antikörper.

Epitop	Größe des Proteins (kDa)	Typ*	Spender-organismus	Verdünnung	Bezugsquelle, Kat. #	Aufbewahrung
cGKIcommon	76/78	p	Kaninchen	1:5000	D. Hildebrand	-20°C
cGKI α (N-16)	76	p	Ziege	1:500	<i>Santa Cruz, sc-10335</i>	4°C
cGKI β (E-20)	78	p	Ziege	1:500	<i>Santa Cruz, sc-10342</i>	4°C
His ₆ G	-	m	Maus	1:2000	<i>Invitrogen, R940-25</i>	4°C

Anhang

VASP	46/50	p	Kaninchen	1:2000	Alexis, Alx-210-725	-20°C
VASP	46/50	p	Kaninchen	1:1000	Cell signalling, 3132	-20°C
Akt	60	p	Kaninchen	1:1000	Cell signalling, 9272	-20°C

* p – polyclonal, m - monoclonal

Tab. 19. Verwendete sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt).

Epitop	Typ	Spender-organismus	Verdünnung	Bezugsquelle, Kat. #	Aufbewahrung
Ziegen-IgG	polyclonal	Esel	1:2000	Santa Cruz, sc-2056	4°C
Maus-IgG	polyclonal	Ziege	1:2000	Santa Cruz, sc-2055	4°C
Kaninchen-IgG	polyclonal	Ziege	1:2000	Cell Signaling, 7074	-20°

F.4. cGMP-Analoga und Enzyme

Aliquots der gelösten Chemikalien und Enzyme wurden bei -20°C aufbewahrt.

F.4.1. cGMP und cGMP-Analoga

cGMP (Biolog, Kat.# G001) H ₂ O	100 mM	100 µmol ad. 1 ml
8-Br-cGMP (Biolog, Kat.# B004E) H ₂ O	100 mM	50 mg ad. 1,12 ml
Rp-8-pCPT-cGMPS (Biolog, Kat.# C013) H ₂ O	10 mM	1 µmol ad. 100 µl
Rp-8-Br-PET-cGMPS (Biolog, Kat.# P007) H ₂ O	10 mM	1 µmol ad. 100 µl
8-pCPT-cGMP (Biolog, Kat.# C009E) H ₂ O	10 mM	10 µmol ad. 1 ml
8-Br-PET-cGMP (Biolog, Kat.# P003) H ₂ O	10 mM	10 µmol ad. 1 ml

F.4.2. Enzyme

Proteinase K - Lösung (Roth, Kat. # 7528.1) Proteinase K 1xTE-Puffer	5%	50 mg ad. 1 ml
---	----	-------------------

Taq-Polymerase (5 U/µl), 10x Taq-Puffer -MgCl₂, 25 mM MgCl₂ (Peqlab, Kat.# 01-1040)

Deep Vent_RTM DNA Polymerase (2 U/µl), 10x ThermoPol Reaction Buffer (NEB, Kat # M0258S)

RNase A (Macherey-Nagel, Kat.# 740 505.50)

Anhang

Tab. 20. Verwendete Restriktionsenzyme.

Enzym	Erkennungssequenz und Spaltstelle (▼)	Puffer	Kat.#
BglII (10 U/μl)	5' A▼GATCT 3'	NEBuffer 3	NEB, R0144S
HindIII (20 U/μl)	5' A▼AGCTT 3'	NEBuffer 2	NEB, R0104S
NcoI (10 U/μl)	5' C▼CATGG 3'	NEBuffer 3*	NEB, R0193S
XhoI (20 U/μl)	5' C▼TCGAG 3'	NEBuffer 2	NEB, R0146S

* Bei Doppelverdau mit XhoI wurde NEBuffer 2 benutzt, in dem die Aktivität von NcoI auch 100% beträgt.

T4-DNA-Ligase (400 U/μl), 10x T4-Ligasepuffer (NEB, Kat. # M0202)

Lysozym (Roth, Kat.# 8259.1) H ₂ O	50 mg/ml	25 mg ad. 500 μl
Benzonase (Novagen, Kat.# 70746-3)		
Papain (Sigma, Kat.# P5762) Ca ²⁺ -freies Medium	7 mg/ml	70 mg ad. 10 ml
Kollagenase (Sigma, Kat.# C7926) Ca ²⁺ -freies Medium	10 mg/ml	100 mg ad. 10 ml
Hyaluronidase (Sigma, Kat.# H3506) Ca ²⁺ -freies Medium	10 mg/ml	100 mg ad. 10 ml

F.5. Kommerziell erhältliche Kits

Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma, Kat.# TP0300)

Nucleobond AX-100 (Macherey-Nagel, Kat.# 740 521.100)

CellTiter[®] 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay "MTS" (Promega, Kat.# G3580)

ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Kat.# RPN2135)

ABIPrism[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Perkin Elmer, Kat.# 4303149); Spin columns Centri sep 1 ml (Perkin Elmer, Kat. # 401763)

F.6. Chromatographie-Säulenmaterial

Ni-NTA-Agarose 50% Suspension in 30% Ethanol (Quiagen, Kat.# 30210)

Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Kat # 17-5175-01)

HisTrapFF crude 1 ml (GE Healthcare, Kat.# 11-0004-58)

HiTrap SP HP 1 ml (GE Healthcare, Kat.# 17-1151-01)

F.7. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 21. Verwendete Chemikalien, die nicht von Carl Roth bezogen wurden.

Chemikalie	Hersteller (Kat. #)
Agarose (Seakem LE)	Biozym, 840004
³² P-gamma-ATP, 370 MBq/ml	GE-Healthcare, A-0018
Combitek Eichproteine I, MG 18 – 300 kDa	Boehringer Mannheim GmbH, 104 540
DMEM	Gibco, 31966-047
DNA-Größenstandard	Invitrogen, 15615-016
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, 10500-064
Grace's Insect Cell Medium	Gibco, 11605-045
p-Hydroxycumarinsäure	Sigma, C9008
Luminol	Sigma, A4685
Na-L-Glutamat Monohydrat	Merck, 1.06445.1000
Protein-Größenstandard	Invitrogen, LC5925
Penicillin/Streptomycin	Gibco, 15140-122
Pluronic® F-68 (10%)	Gibco, 24040-032
Proteaseinhibitoren-Cocktail	Sigma, P8849
Toluidinblau	Sigma, T3360
Trypanblau	Gibco, 15250-061
Ultima Gold™	Perkin Elmer, 6013327

Tab. 22. Wichtige Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller (Kat. #)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, 72.690
15 ml Röhrchen	Sarstedt, 62.554.502
2 ml Reaktionsgefäße, safe seal	Sarstedt, 72.695
50 ml Röhrchen selbststehend	Sarstedt 62.554.254; 62.559.001
6 Lochplatten	Corning, 3506
96 Lochplatten	Corning, 3599
Amicon Ultra-15 (5k)	Millipore, UFC900508
CL-XPosure™ Film (5 x 7 inches)	PIERCE, 34090
Dialyseschlauch seamless cellulose tubing 23 mm x 15 mm	Sigma-Aldrich, D0405-100FT
Filtermembranen Durapore Membrane Filters (0,45 µm HV)	Millipore, HVLP04700
Filterspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt 70.760.213; 70.760.211; 70.762.211
Filter-Papiere 460 x 570 mm	Whatman (Schleicher & Schüll) (4926.1, Carl Roth)
Immobilon P Transfer Membran (26,5 cm x 3,75 cm)	Millipore (T831.1, Carl Roth)
Kanülen 100 Sterican (ø 0,4 x 20 mm, 27 G x ¾")	B.Braun Melsungen AG (X133.1, Carl Roth)
Lysing Matrix D	MP Biomedicals, 6913-100
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm²)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (T729.1, Carl Roth)
NucleoBond AX 100	Macherey-Nagel, 740 521.100

Anhang

Pasteurpipetten 230 mm	<i>Carl Roth, 4522</i>
Petrischalen 92 x 16 mm ohne Nock	<i>Sarstedt, 82.1472.001</i>
Pipettenspitzen 200 µl; 1000 µl	<i>Sarstedt, 70.760.002; 70.762</i>
Serologische Pipetten 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml	<i>Corning, 4486; 4487; 4488; 4489</i>
Spritzen Omnifix-F1 1 ml	<i>B.Braun Melsungen AG (H999.1, Carl Roth)</i>
Sterilfilter	<i>PALL (PN4612, VWR)</i>
Szintilationsgefäße (Super Polyethylen Vial™)	<i>Perkin Elmer, 6008117</i>
Thermopapier K65HM-CE/KP65HM-CE 110 x 21 mm	<i>Mitsubishi</i>
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²	<i>Corning, 430639; 430641; 431080</i>

Tab. 23. Verwendete Gerätschaften.

Gerät	Hersteller	Modell
Autoklaven	1. <i>SANOclav</i> 2. <i>MMM GmbH</i>	1. La-Va 2. Ventilab S3000
Blotting-Apparatur	<i>Roth</i>	MAXI-Semi-Dry-Blotter
Elektrophoresekammern (DNA, horizontal) + Kämme	<i>eigene Herstellung</i>	-
ELISA-Reader	<i>Labsystem</i>	Multiskan RC
Filmentwicklermaschine	<i>Konica</i>	SRX-101A
Filtrationsaufsatz für Flaschen	<i>Nalgene</i>	Reusable Bottle Top Filter Unit (250 ml, 45 mm)
Gefrier/Kühlkombination	<i>Liebherr</i>	Comfort No Frost
Gefrierschrank (-20°C)	<i>Liebherr</i>	Premium No Frost
Gefrierschrank (-80°C)	<i>Revco Technologies (Asheville NC USA)</i>	Model-Nr.: ULT2186-3-V35
Geldokumentation	bestehend aus: 1. <i>Vilber-Lourmat</i> 2. <i>Cybertech</i> 3. <i>Mitsubishi</i>	1. TFX-20.M 2. CS1 3. Video copy processor
Gelsystem	<i>BioRad</i>	Mini Protean 3
Handzähler	<i>Neolab</i>	-
Heizblöcke	1. <i>Eppendorf</i> 2. <i>Neolab</i>	1. Thermomixer compact 2. neoBlock-Heizer-Duo 2-2504
Inkubationshaube für Tischschüttler	<i>Sartorius</i>	Certomat HK
Inkubator (27°C) Inkubator (37°C, CO ₂)	1. <i>Heraeus</i> 2. <i>New Brunswick Scientific</i>	1. BB6060 CU 2. Innova CO-170
Inverses Mikroskop	<i>Zeiss</i>	Axiovert 40
Kühlwasserbad	<i>Julabo</i>	F20-HC
Magnetrührer	<i>Heidolph</i>	1. MR3002 (mit Heizung) 2. MR3000
Mikrowellenofen	<i>LG</i>	WaveDom
pH-Meter	<i>Knick</i>	pH-Meter 761 calimatic
Pipetten 8-Kanalpipette	1. <i>Gilson</i> 2. <i>Abimed</i>	1. Pipetman P20, P200, P1000 2. Discovery 20-200 µl
Pipettierhilfe	<i>Integra bioscience</i>	Pipetboy acu
Proteinreinigungssystem	1.-3. <i>GE Healthcare</i>	bestehend aus: 1. ÄKTApurifier UPC 10 2. Frac-920

Anhang

		3.UNICORN 5.11 (Software)
Scanner	<i>Epson</i>	Epson Perfection 4990 Photo
Sequenzierautomat	bestehend aus: 1. <i>Perkin-Elmer Applied Biosystems</i> 2. <i>Sony</i>	1. ABI Prism™ Sequence-Analyzer 2. Multiscan 100ES
Spannungsquellen	1. <i>Biometra</i> 2. <i>BioRad</i>	1. Standard Power Pack 25 2. Model 3000Xi
Standzentrifugen	1. <i>Eppendorf</i> 2. <i>Beckman</i>	1. Centrifuge 5804R 2. J2-HS
Sterilwerkbank	1. <i>Thermo-Fisher Scientific</i> 2. <i>Heraeus</i>	1. Hera safe 2. HLB2472
Stickstofftank	<i>Taylor-Wharton</i>	LS3000
Speed vac	<i>Eppendorf</i>	Concentrator 5301
Szintillationszähler	<i>Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer</i>	2500 TR
Thermocycler	<i>Peqlab</i>	Primus 96 advanced
Tischschüttler	1. <i>Sartorius</i> 2. <i>Köttermann</i> 3. <i>Infors AG</i>	1. Certomat R 2. 4020 3. TR-225
Tischzentrifugen	<i>Eppendorf</i>	1. Centrifuge 5417R (Kühlung) 2. Centrifuge 5417C
Ultraschallbad	<i>Elma</i>	Elmasonic S 30 H
Ultraschallgerät	<i>Branson</i>	Digital Sonifier 250
Waage	1. <i>Sartorius</i> 2. <i>Mettler</i>	1. Excellence 2. AM50 (Feinwaage)
Wasserbäder	1. Eigene Herstellung 2. <i>Memmert</i> 3. <i>Georg Kästner Labor und Umwelttechnik</i>	1. – 2. WB14 3. 1013
Wasser-Filtrationsanlage	<i>Millipore</i>	MilliQ UF plus

G. Literaturverzeichnis

- Ammendola, A., Geiselhoringer, A., Hofmann, F. and 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**, 24153-24159.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. and Cohen, P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, **371**, 199-204.
- Biel, M., Zong, X. and Hofmann, F. (1999) Cyclic nucleotide gated channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **33**, 231-250.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- 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**, 248-254.
- Browning, D.D., Mc Shane, M., Marty, C. and Ye, R.D. (2001) Functional analysis of type 1 α cGMP-dependent protein kinase using green fluorescent fusion proteins. *J Biol Chem*, **276**, 13039-13048.
- Bullock, W., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Burgoyne, J.R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R.L., Brennan, J.P., Schroder, E., Browning, D.D. and Eaton, P. (2007) Cysteine redox sensor in PKG β enables oxidant-induced activation. *Science*, **317**, 1393-1397.
- Burkhardt, M., Glazova, M., Gambaryan, S., Vollkommer, T., Butt, E., Bader, B., Heermeier, K., Lincoln, T.M., Walter, U. and Palmethofer, A. (2000) KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J Biol Chem*, **275**, 33536-33541.
- Butt, E., Eigenthaler, M. and Genieser, H.G. (1994) (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur J Pharmacol*, **269**, 265-268.
- Butt, E., Pohler, D., Genieser, H.G., Huggins, J.P. and Bucher, B. (1995) Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. *Br J Pharmacol*, **116**, 3110-3116.
- Butt, E., van Bemmelen, M., Fischer, L., Walter, U. and Jastorff, B. (1990) Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by (Rp)-guanosine 3',5'-monophosphorothioates. *FEBS Lett*, **263**, 47-50.
- Capecchi, M.R. (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, **6**, 507-512.
- Caruthers, M.H., Beaucage, S.L., Becker, C., Efcavitch, J.W., Fisher, E.F., Galluppi, G., Goldman, R., deHaseth, P., Matteucci, M., McBride, L. and et al. (1983) Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal*, **3**, 1-26.
- Casteel, D.E., Boss, G.R. and Pilz, R.B. (2005) Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I β and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif. *J Biol Chem*, **280**, 38211-38218.

Literaturverzeichnis

- Casteel, D.E., Zhang, T., Zhuang, S. and Pilz, R.B. (2008) cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity. *Cell Signal*, **20**, 1392-1399.
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D. and Henco, K. (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol*, **31**, 371-387.
- Dostmann, W.R., Taylor, M.S., Nickl, C.K., Brayden, J.E., Frank, R. and Tegge, W.J. (2000) Highly specific, membrane-permeant peptide blockers of cGMP-dependent protein kinase I α inhibit NO-induced cerebral dilation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14772-14777.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B. and Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 664-668.
- Feil, R. (1994) Überproduktion der cGMP-abhängigen Proteinkinase mit Hilfe prokaryotischer und eukaryotischer Expressionssysteme. Dissertation. *Institut für Pharmakologie und Toxikologie*. TU München, München.
- Feil, R. (2007) Conditional somatic mutagenesis in the mouse using site-specific recombinases. *Handb Exp Pharmacol*, 3-28.
- Feil, R., Feil, S. and Hofmann, F. (2005) A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends Mol Med*, **11**, 71-75.
- Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S. and Hofmann, F. (2002) Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res*, **90**, 1080-1086.
- Feil, R., Kellermann, J. and Hofmann, F. (1995) Functional cGMP-dependent protein kinase is phosphorylated in its catalytic domain at threonine-516. *Biochemistry*, **34**, 13152-13158.
- Feil, R., Muller, S. and Hofmann, F. (1993) High-level expression of functional cGMP-dependent protein kinase using the baculovirus system. *FEBS Lett*, **336**, 163-167.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64-71.
- Foller, M., Feil, S., Ghoreschi, K., Koka, S., Gerling, A., Thunemann, M., Hofmann, F., Schuler, B., Vogel, J., Pichler, B., Kasinathan, R.S., Nicolay, J.P., Huber, S.M., Lang, F. and Feil, R. (2008) Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 6771-6776.
- Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, **437**, 55 - 75.
- Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1999) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **36**, 275-328.
- Geiselhoring, A., Gaisa, M., Hofmann, F. and Schlossmann, J. (2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*, **575**, 19-22.
- Grace, T.D. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, **195**, 788-789.

Literaturverzeichnis

- Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. and 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**, 3088-3093.
- Heil, W.G., Landgraf, W. and Hofmann, F. (1987) A catalytically active fragment of cGMP-dependent protein kinase. Occupation of its cGMP-binding sites does not affect its phosphotransferase activity. *Eur J Biochem*, **168**, 117-121.
- Hillenbrand, M. (2007) Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Baculoviren für biochemische Untersuchungen an der cGMP-abhängigen Proteinkinase. Diplomarbeit. *Interfakultäres Institut für Biochemie*. Universität Tübingen, Tübingen.
- Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, **411**, 177-184.
- Hofmann, F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **280**, 1-4.
- Hofmann, F., Ammendola, A. and Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113 (Pt 10)**, 1671-1676.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. and Schlossmann, J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, **86**, 1-23.
- Ignarro, L.J., Napoli, C. and Loscalzo, J. (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res*, **90**, 21-28.
- Kass, D.A., Takimoto, E., Nagayama, T. and Champion, H.C. (2007) Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res*, **75**, 303-314.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-473.
- Kemp-Harper, B. and Feil, R. (2008) Meeting report: cGMP matters. *Sci Signal*, **1**, pe12.
- Koesling, D. and Friebe, A. (1999) Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 41-65.
- Kuhn, M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*, **93**, 700-709.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lincoln, T.M., Dey, N. and Sellak, H. (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*, **91**, 1421-1430.
- Lincoln, T.M., Thompson, M. and Cornwell, T.L. (1988) Purification and characterization of two forms of cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *J Biol Chem*, **263**, 17632-17637.
- Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A. and Langel, U. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 99-103.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Merrifield, R.B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154.

Literaturverzeichnis

- Munzel, T., Feil, R., Mulsch, A., Lohmann, S.M., Hofmann, F. and Walter, U. (2003) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, **108**, 2172-2183.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. and Edenhofer, F. (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4489-4494.
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, **83**, 346-356.
- 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. and Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*, **17**, 3045-3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 105-149.
- Poppe, H., Rybalkin, S.D., Rehmann, H., Hinds, T.R., Tang, X.B., Christensen, A.E., Schwede, F., Genieser, H.G., Bos, J.L., Doskeland, S.O., Beavo, J.A. and Butt, E. (2008) Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods*, **5**, 277-278.
- Porath, J. and Flodin, P. (1959) Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, **183**, 1657-1659.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V. and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, **278**, 585-590.
- Roskoski, R., Jr. (1983) Assays of protein kinase. *Methods Enzymol*, **99**, 3-6.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **340**, 115-126.
- Russwurm, M., Mullershausen, F., Friebe, A., Jager, R., Russwurm, C. and Koesling, D. (2007) Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J*, **407**, 69-77.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C. and Hofmann, F. (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem*, **202**, 1339-1344.
- Ruth, P., Pfeifer, A., Kamm, S., Klatt, P., Dostmann, W.R. and Hofmann, F. (1997) Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase I alpha. *J Biol Chem*, **272**, 10522-10528.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. and Hofmann, F. (2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87**, 825-830.

Literaturverzeichnis

- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. and Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 21722-21729.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. and Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, **404**, 197-201.
- Scholten, A., Fuss, H., Heck, A.J. and Dostmann, W.R. (2007) The hinge region operates as a stability switch in cGMP-dependent protein kinase I α . *FEBS J*, **274**, 2274-2286.
- Schwarze, S.R., Hruska, K.A. and Dowdy, S.F. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol*, **10**, 290-295.
- Schwede, F., Maronde, E., Genieser, H. and Jastorff, B. (2000) Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol Ther*, **87**, 199-226.
- Sekhar, K.R., Hatchett, R.J., Shabb, J.B., Wolfe, L., Francis, S.H., Wells, J.N., Jastorff, B., Butt, E., Chakinala, M.M. and Corbin, J.D. (1992) Relaxation of pig coronary arteries by new and potent cGMP analogs that selectively activate type I α , compared with type I β , cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*, **42**, 103-108.
- Sonnenburg, W.K. and Beavo, J.A. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Surks, H.K. (2007) cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ Res*, **101**, 1078-1080.
- Surks, H.K. and Mendelsohn, M.E. (2003) Dimerization of cGMP-dependent protein kinase I α and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cell Signal*, **15**, 937-944.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. and Mendelsohn, M.E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science*, **286**, 1583-1587.
- Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. and Mendelsohn, M.E. (2003) Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, **9**, 1506-1512.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. and McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, **13**, 213-217.
- Wadia, J.S., Stan, R.V. and Dowdy, S.F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, **10**, 310-315.

Literaturverzeichnis

- Wall, M.E., Francis, S.H., Corbin, J.D., Grimes, K., Richie-Jannetta, R., Kotera, J., Macdonald, B.A., Gibson, R.R. and Trehella, J. (2003) Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2380-2385.
- Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Worner, R., Wegener, J.W., Valtcheva, N., Feil, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Feil, R. (2007) Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res*, **101**, 1096-1103.
- Wegener, J.W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. and Feil, R. (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res*, **90**, 18-20.
- Weinmeister, P. (2006) Regulation of vascular smooth muscle cell growth by cyclic nucleotides and cGMP-dependent protein kinase I. Dissertation. *Institut für Pharmakologie und Toxikologie*. TU München, München.
- Weinmeister, P., Lukowski, R., Linder, S., Traidl-Hoffmann, C., Hengst, L., Hofmann, F. and Feil, R. (2008) Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase I promotes adhesion of primary vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*, **19**, 4434-4441.
- Wernet, W., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, **251**, 191-196.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.
- Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F. and Feil, R. (2003) A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13519-13524.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A. and Maeda, N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, **258**, 468-471.

H. Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Valtcheva, N., Nestorov, P., Beck, A., Russwurm, M., Hillenbrand, M., Weinmeister, P. and Feil, R. (2009). The commonly used cGKI inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS can activate cGKI in vitro and in intact cells. *J Biol Chem*, **284**, 556-562.

Ghoreschi, K., Weigert, C., Deng, C., Brück, J., Hussain, R.Z., Gocke, A.R., Respa, A., **Valtcheva, N.**, Feil, S., Feil, R., Rupec, R.A., Lovett-Racke, A.E., Dringen, R., Racke, M.K. and Röcken, M. Oxidative stress interrupts TLR4-induced STAT1-ICSBP-IL-12/IL-23 signaling and Th1/Th17 cell-mediated autoimmune disease. *submitted*

Feil, S., **Valtcheva, N.**, Feil, R. "Inducible Cre Mice" Chapter 18 in *Gene Knockout Protocols 2nd Edition*, in press

Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Worner, R., Wegener, J.W., **Valtcheva, N.**, Feil, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Feil, R. (2007) Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res*, **101**, 1096-1103.

Konferenzbeiträge

Valtcheva, N., Nestorov, P., Beck, A., Weinmeister, P., Hofmann, F., Feil, S., Feil, R. (2008). cGKI modulators: old and new tools for the analysis of cGMP signalling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **377**, Suppl. 1, R71

Valtcheva, N., Weinmeister, P., Hofmann, F., Feil, S., Feil, R. (2007). Analysis of cGKI inhibition by Rp-cGMP analogs. *BMC Pharmacol.* **7**, Suppl. 1, P62

Valtcheva, N., Weinmeister, P., Hofmann, F., Feil, S., Feil, R. (2007). Two cGMP analogs that are commonly used as cGKI inhibitors show unexpected effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **375**, Suppl. 1, P166

Hochschullehrer

Prof. Dr. R. Hampp	Botanik
Prof. Dr. F. Oberwinkler	Botanik
Prof. Dr. H. U. Seitz	Pflanzenphysiologie
Prof. Dr. W.-B. Frommer	Pflanzenphysiologie
Prof. Dr. V. Braun	Mikrobiologie
Prof. Dr. F. Götz	Mikrobiologie
Prof. Dr. W. Maier	Zoologie
Prof. Dr. W. Engels	Zoologie
Prof. Dr. C. F. Bardele	Zoologie
Prof. Dr. S. Treue	Tierphysiologie
Prof. Dr. D. Ammermann	Zellbiologie
Prof. Dr. G. Jürgens	Genetik
Prof. Dr. F. Schöffl	Genetik
Prof. Dr. V. Hemleben	Genetik
Prof. Dr. J. Strähle	Chemie
Prof. Dr. G. Häfelinger	Chemie
Prof. Dr. J. Ihringer	Physik
Prof. Dr. K. P. Hadeler	Mathematik
Prof. Dr. C. Müller	Mathematik
Prof. Dr. A. Nordheim	Zellbiologie
Prof. Dr. M. Duszenko	Biochemie
Prof. Dr. B. Hamprecht	Biochemie
Prof. Dr. F. Madeo	Biochemie

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Nadejda Valtcheva
Geburtsdaten: 12.05.1981 in Sofia, Bulgarien
Staatsangehörigkeit: bulgarisch

Schulbildung:

1987-1994 Grundschohle „Dobri Voynikov“, Sofia
1994-1999 Deutschsprachiges Gymnasium „Prof. K. Gelabov“, Sofia, Deutsche Abteilung
Mai 1999 Abitur, Allgemeine Hochschulreife als Bildungsinländerin (Note 1,0)

Studium:

Oktober 1999 Studienbeginn an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studiengang Biologie, Diplom
August 2001 Vordiplom
Oktober 2004 Abschluss des Studiums der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Note 1,2)
01.01.2005-21.11.2008 Doktorarbeit mit Titel „Etablierung und Charakterisierung von Modulatoren der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I“ am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. R. Feil

