

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Identifizierung und Funktion von Effektorproteinen

der NO/cGMP Signalkaskade

Angela Koller

aus

Nürnberg

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom

29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann und Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 28.06.2002

Angela Koller

Dissertation eingereicht am 28.06.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Hofmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 30.07.2002

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dazu gehören alle Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, von der Werkstatt bis in den dritten Stock. Es waren viele Kleinigkeiten, die den Alltag erleichtert haben und zur Lösung von größeren und kleineren Problemen beitrugen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Betreuung dieser Arbeit. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen, Ideen und Diskussionen und hat damit entscheidend zum Fortgang der Arbeit beigetragen. Durch seine analytische Betrachtungsweise und die interessierte Auseinandersetzung mit jedem Mitarbeiter ist es möglich, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen und auf hohem Niveau zu forschen.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und die Berichterstattung vor der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Peter Ruth danke ich für die Themenstellung und fachliche Diskussionen sowie Herrn Dr. Jens Schlossmann für die Einführung in die Biochemie. Herrn Dr. Keith Ashman danke ich für die Durchführung der MALDI-Analysen.

Frau Dr. Claudia Arntz hat mir molekularbiologisches Arbeiten beigebracht und stand mir dabei stets mit Rat und Tat zur Seite. Durch die Vermittlung ihrer ausgesprochen guten Fachkenntnisse war es mir möglich, jede Art von Klonierung ohne größere Probleme erfolgreich durchzuführen.

Frau Dr. Andrea Huber und Frau Simone Kamm danke ich ebenfalls für Ihre Unterstützung im Laboralltag und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Dr. Sascha Zimmermann möchte ich danken, ohne den ich wahrscheinlich nicht an diesem Institut gelandet wäre. Ein gemeinsames, kühles Bier hat im Studium und während der Promotion über so manchen Tiefschlag hinweggetröstet.

Herrn Klaus Pfreundner danke ich ganz besonders für seine Geduld, sein Verständnis und den Rückhalt in den letzten Jahren, Wochen und Tagen sowie für die technische Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich ihm und Herrn Dr. Jürgen Kolb für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danken.

Allgemeines

Falls nicht gesondert vermerkt, wurden Chemikalien höchster analytischer Reinheit der Firmen Roth, Merck oder Sigma verwendet.

Summenformeln verwendeter Chemikalien sind nach IUPAC bezeichnet, sofern keine Abkürzung für den entsprechenden Stoff angegeben ist.

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Milli Q (bidest) Wasser hergestellt.

Prozentangaben beziehen sich für Feststoffe auf deren Gewichtsanteil pro Volumen (m/v), für Flüssigkeiten auf deren Volumenanteil (v/v).

Bei der Verwendung von kommerziell erhältlichen Kits waren alle verwendeten Puffer und Reagenzien Bestandteile des jeweiligen Kits.

Für Arbeiten mit DNA wurden alle Materialien und Lösungen 20 min bei 121°C und 1,2 bar autoklaviert oder sterilfiltriert.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
	1.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen	1
	1.1.1 Struktur, Lokalisation und Funktionen der cGMP-abhängigen Proteinkinasen ...	2
	1.1.2 Relaxation des glatten Muskels durch cGMP-Kinase I	4
	1.2 Phospholamban.....	6
	1.2.1 Struktur und Lokalisation von Phospholamban	6
	1.2.2 Regulatorische Funktion von Phospholamban.....	7
	1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN	11
	2.1 Kultur und Transformation von Bakterien	11
	2.1.1 Verwendeter Stamm.....	11
	2.1.2 Nährmedien	11
	2.1.3 Kultivierung und Selektion	12
	2.1.4 Stammhaltung	12
	2.1.5 Transformation.....	12
	2.2 Molekulargenetische Methoden	13
	2.2.1 Verwendete Plasmide.....	13
	2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	13
	2.2.3 Gelelution und Reinigung von DNA-Fragmenten	14
	2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	14
	2.2.5 Restriktionsverdau	15

2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.2.8	Sequenzierung von Plasmid-DNA	17
2.2.9	Isolierung von Poly(A)-RNA mit Dynabeads®	18
2.2.10	Synthese einzelsträngiger cDNA	19
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.3	Kultur eukaryontischer Zellen.....	21
2.3.1	Verwendete Zelllinie.....	21
2.3.2	Nährmedium	21
2.3.3	Kultivierung	22
2.3.4	Stammhaltung	23
2.4	Proteinexpression in COS 7 Zellen	24
2.4.1	Transfektion von COS 7 Zellen	24
2.4.2	Ernten der Zellen.....	25
2.5	Allgemeine Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen.....	26
2.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.5.3	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
2.5.4	Elektroblot von Polyacrylamid-Gelen	30
2.5.5	Immundetektion	31
2.5.6	Färbung von Proteinen	33
2.5.7	Autoradiogramm	34
2.6	Spezielle Methoden zur Charakterisierung von Proteinen	35
2.6.1	Membranpräparation aus Rindertrachealmuskel	35
2.6.2	Co-Immunpräzipitation.....	36
2.6.3	Affinitätsreinigung über cGMP-Agarose.....	37
2.6.4	Vorreinigung über cGMP-Agarose und anschließende Immunpräzipitation	37
2.6.5	<i>In vitro</i> Phosphorylierung	38
2.6.6	MALDI-TOF-Analyse	40

3	ERGEBNISSE	41
3.1	Untersuchung des mikrosomalen Komplexes aus IP₃-Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I	41
3.1.1	Reinigung und Identifizierung assoziierter Proteine.....	41
3.1.2	Verbindung des Komplexes mit dem Zytoskelett.....	43
3.2	Interaktion von Phospholamban mit cGMP-Kinase I im glatten Muskel	45
3.2.1	cGMP-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban	45
3.2.2	Co-Immunpräzipitation von Phospholamban und cGMP-Kinase I	46
3.2.3	Assoziation weiterer Substrate der cGMP-Kinase I	48
3.3	Interaktion von rekombinantem Phospholamban mit cGMP-Kinase I in COS 7 Zellen	49
3.3.1	Klonierung von Phospholamban.....	49
3.3.2	Co-Expression von Phospholamban und cGMP-Kinase I in COS 7 Zellen.....	50
3.3.3	Co-Immunpräzipitation von cGMP-Kinase I und Phospholamban	50
3.3.4	Co-Expression von Phospholamban, cGMP-Kinase I, IRAGa und IP ₃ -Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen.....	51
3.3.5	Co-Immunpräzipitation von Phospholamban, cGMP-Kinase I β , IRAGa und IP ₃ -Rezeptor Typ I, Vergleich zur Fällung aus Rindertrachealmuskel.....	52
3.4	Interaktion von Phospholamban und cGMP-Kinase I mit der Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums	54
3.4.1	Interaktion von Phospholamban und SERCA 2.....	54
3.4.2	Assoziation von SERCA 2 an den Substrat-Komplex der cGMP-Kinase im glatten Muskel.....	55
4	DISKUSSION.....	57
4.1	Assoziation von Phospholamban mit cGMP-Kinase I β, IRAG und dem IP₃-Rezeptor Typ I am sarkoplasmatischen Retikulum.....	57

4.2	Phosphorylierung von Phospholamban durch die cGMP-Kinase I.....	59
4.3	Funktion von Phospholamban in der glatten Muskulatur	59
4.4	Interaktion des mikrosomalen Komplexes mit SERCA 2	60
4.5	Ausblick.....	62
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6	ANHANG	65
6.1	Für Westernblot und Immunpräzipitation verwendete Antikörper	65
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79
8.1	Buchstabencode der Nukleotide.....	81
8.2	Drei- und Ein-Buchstabencode der Aminosäuren	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1–1: Synthese und Rezeptoren von cGMP	2
Abb. 1–2: Mechanismus der Vasorelaxation durch cGMP-Kinase I	5
Abb. 1–3: Schematische Darstellung von Phospholamban und SERCA in verschiedenen Mausmodellen und die resultierende Kraftentwicklung im Herzen	8
Abb. 3–1: Autoradiogramm und Coomassiefärbung des mit cGMP-Agarose gereinigten Komplexes	43
Abb. 3–2: Co-Immunpräzipitation von IP ₃ -Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I mit anti- α -Aktin und anti-Calponin H1 Antikörper nach Vorreinigung über cGMP-Agarose	44
Abb. 3–3: cGMP-abhängige Phosphorylierung von PLB	46
Abb. 3–4: Co-Immunpräzipitation von PLB mit anti-PLB und anti-cGK I Antikörper	47
Abb. 3–5: Autoradiogramm und Westernblot der Co-Immunpräzipitationen mit anti-PLB und anti-cGK I Antikörper	48
Abb. 3–6: Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Phospholamban aus dem Herz der Maus	49
Abb. 3–7: Expression von PLB mit und ohne cGK I α oder cGK I β in COS 7 Zellen	50
Abb. 3–8: Expression von PLB, cGK I α , cGK I β , IRAG und IP ₃ -Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen	52
Abb. 3–9: Co-Immunpräzipitation von PLB, cGK I, IRAGa und IP ₃ -Rezeptor Typ I	53
Abb. 3–10: Co-Immunpräzipitation von SERCA 2 mit anti-Phospholamban Antikörper aus mikrosomalen Membranen des glatten Muskels	54
Abb. 3–11: Interaktion von SERCA 2 mit Phospholamban, α -Aktin und Calponin H1 nach Vorreinigung über cGMP-Agarose	55
Abb. 4–1: Regulation der Ca ²⁺ -Freisetzung aus dem SR durch Phospholamban	61

1 Einleitung

1.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Seit über 100 Jahren werden organische Nitrate zur Behandlung der Symptome koronarer Herzerkrankungen eingesetzt und zählen damit zu den ältesten Arzneistoffen der Pharmazie. Anfang der 80er Jahre wurde ein gefäßerweiternder Stoff der Endothelschicht von Blutgefäßen entdeckt („endothelium-derived relaxing factor“ = EDRF), der mit biologisch freigesetztem NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987) identisch ist. Im Organismus wird NO aus der Aminosäure L-Arginin von den drei bekannten Formen der NO-Synthase (neuronaler NOS I, induzierbarer NOS II, endotheliale NOS III) gebildet. Neben der relaxierenden Wirkung auf die glatte Muskulatur vermittelt NO zahlreiche Effekte, wie die Hemmung der Thrombozytenaggregation, die Modulation der synaptischen Transmission im ZNS und eine unspezifische Immunabwehr durch seine Zytotoxizität bei Freisetzung aus Makrophagen und Granulozyten.

Von NO freisetzenden Pharmaka wusste man bereits, dass NO die lösliche Isoform der Guanylylzyklase (sGC) aktiviert (Katsuki et al., 1977). Dadurch wird die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) induziert und über einen cGMP-abhängigen Weg die glatte Muskulatur relaxiert. Der Botenstoff cGMP wird auch von einer membranständigen Guanylylzyklase (pGC) gebildet, deren Isoformen A, B und C durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) und Guanylin aktiviert werden. Als „second messenger“ hat cGMP drei bisher bekannte Zielstrukturen, die das NO Signal in verschiedenen Zelltypen vermitteln. Dazu gehört die Gruppe der Phosphodiesterasen (Sonnenburg and Beavo, 1994), Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) in der Retina und im olfaktorischen System (Biel et al., 1998) sowie cGMP-abhängige Proteinkinasen. In Abb. 1–1 sind die Synthesewege und Rezeptoren von cGMP schematisch dargestellt. Die Vermittlung des NO Signals über cGMP-Kinase I und ihr Substrat Phospholamban ist Gegenstand dieser Arbeit und soll im folgenden genauer erklärt werden.

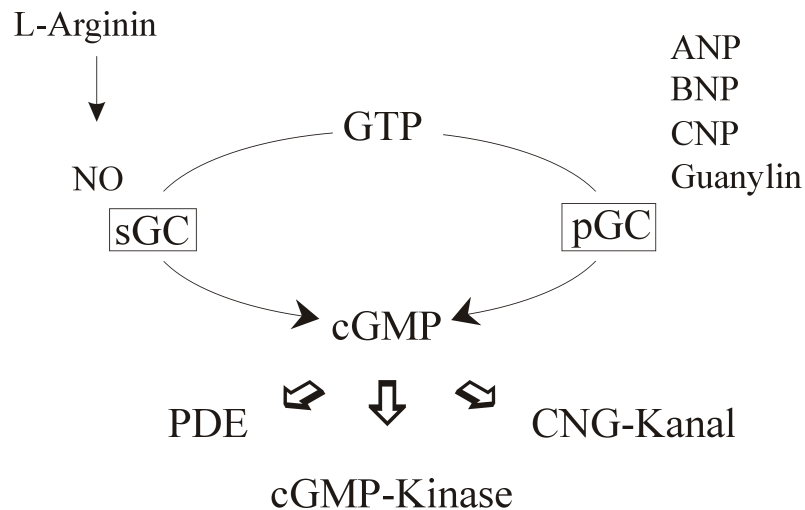


Abb. 1-1: Synthese und Rezeptoren von cGMP

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) kann sowohl von der löslichen Guanylylzyklase (sGC) nach Aktivierung durch Stickstoffmonoxid (NO), als auch von partikulärer Guanylylzyklase (pGC) nach Aktivierung durch die natriuretischen Peptide (ANP, BNP, CNP) oder Guanylin aus Guanosintriophosphat (GTP) gebildet werden. Zielproteine für cGMP sind Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-Kinasen und Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle).

1.1.1 Struktur, Lokalisation und Funktionen der cGMP-abhängigen

Proteinkinasen

Die cGMP-abhängige Proteinkinase wurde erstmals in Arthropoden beschrieben (Kuo and Greengard, 1970) und wenig später fand man in Säugetieren eine zytosolische (cGK I) (Hofmann and Sold, 1972) und eine membranständige Form der Kinase (cGK II) (de Jonge, 1981). Die Klonierung der cGMP-Kinase I aus dem glatten Muskel von Rindern zeigte die Existenz zweier Spleißvarianten α und β , die sich in den ersten 90-100 Aminosäuren unterscheiden (Wernet et al., 1989). In ihrer Grundstruktur haben alle cGMP-Kinasen neben dem N-Terminus eine regulatorische und eine katalytische Domäne (Pfeifer et al., 1999). Die regulatorische Domäne enthält zwei cGMP Bindungsstellen und ist für die Aktivierung der Kinase verantwortlich. Die Bindung von cGMP führt zur Konformationsänderung des Enzyms (Chu et al., 1997), die autoinhibitorische Wirkung des N-Terminus wird aufgehoben und die katalytische Domäne kann mit dem Substrat interagieren. Durch das Binden von Mg-ATP katalysiert sie die Übertragung des endständigen Phosphatrestes von ATP auf den Serin- oder Threoninrest eines Zielproteins. In Anwesenheit von cGMP wird die Kinase zusätzlich am N-Terminus autophosphoryliert und ihre basale Aktivität erhöht (Smith et al., 1996). Die ersten 50 Aminosäuren des N-Terminus beinhalten einen sogenannten „Leucin-

Zipper“, der Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen kann und Homodimere bildet. Die cGMP-Kinase II ist durch Myristoylierung des N-Terminus fest in die Zellwand integriert (Vaandrager et al., 1996), während die cGMP-Kinase I zytosolisch oder an Membranen assoziiert vorkommt (Keilbach et al., 1992).

Die Lokalisation der cGMP-Kinasen wurde in vielen Geweben untersucht. Die höchste Konzentration von cGMP-Kinase I fand man im glatten Muskel, in Blutplättchen und im Cerebellum. Außerdem wird sie im Hippocampus, in Dorsal Root Ganglien, der neuromuskulären Endplatte und im Blutgefäßsystem der Niere exprimiert. Geringere Mengen kommen in Endothel- und Immunzellen vor (Pfeifer et al., 1999). Die α Isoform ist vor allem in Lunge, Herz und Cerebellum lokalisiert, während die β Isoform im glatten Muskel von Uterus, Aorta und Trachea überwiegt (Keilbach et al., 1992). Die cGMP-Kinase II konnte in verschiedenen Hirnregionen, der intestinalen Mukosa, der Niere, Chondrozyten und der Lunge nachgewiesen werden (Lohmann et al., 1997). Die Verteilung der cGMP-Kinasen in verschiedenen Geweben ließ Spekulationen über ihre dortige Funktion zu, jedoch weiß man noch wenig über die spezifischen Aufgaben der Varianten des Enzyms.

Die physiologische Bedeutung der cGMP-Kinase I ist entsprechend ihrer Lokalisation sehr vielfältig. Mehrere Arbeitsgruppen konnten die Protektion des Gefäßsystems durch NO einem cGMP-abhängigen Effekt der cGMP-Kinase I zuordnen (Garg and Hassid, 1989). Durch ihre Aktivierung wird die Migration, Proliferation und Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen unterdrückt und atheromatösen Gefäßerkrankungen vorgebeugt. In Blutplättchen bewirkt die cGMP-Kinase I eine Hemmung der Thrombozytenaggregation (Massberg et al., 1999). Die wichtigste Aufgabe der cGMP-Kinase I ist die Relaxation der glatten Muskulatur, deren molekularer Mechanismus im folgenden Abschnitt genauer dargestellt wird.

Im Gegensatz zur cGMP-Kinase I ist die genaue Funktion der cGMP-Kinase II weitgehend unbekannt. Sie spielt eine Rolle bei der Sekretion im Intestinum, indem die Ausscheidung von Chlorid und Wasser erhöht wird (Vaandrager et al., 1998). In der Niere beeinflusst sie die Reninfreisetzung durch einen noch völlig unklaren Mechanismus (Kurtz and Wagner, 1998; Wagner et al., 1998). cGMP-Kinase II defiziente Mäuse zeigen zudem ein verkürztes Knochenwachstum (Pfeifer et al., 1996), was auf ihren Einfluss auf die enchondrale Ossifikation schließen lässt.

1.1.2 Relaxation des glatten Muskels durch cGMP-Kinase I

Seit der Entdeckung der NO/cGMP vermittelten Wirkung auf die Gefäßmuskulatur ist dieser Signalweg durch mehrere Mausmodelle verständlicher geworden. Die Deletion der für endotheliale NO-Synthase (Huang et al., 1995) und für die Guanylylzyklase A (Lopez et al., 1995) kodierenden Gene, zeigte eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks um 20 mmHg. Die cGMP-Kinase I defizienten Mäuse sind ebenfalls hypertensiv, haben schwerwiegende intestinale Störungen und einen Defekt im Tonus der glatten Muskulatur verschiedener Organe (Pfeifer et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das Zielprotein der cGMP vermittelten Vasorelaxation die cGMP-Kinase I ist, zumal der cAMP Effekt in diesen Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Bisher wurden verschiedene Ca^{2+} abhängige und unabhängige molekulare Mechanismen beschrieben, über die ihre Isoformen α und β den Tonus der glatten Muskulatur steuern.

Die cGMP-Kinase I überträgt ein neuronales oder hormonelles Signal durch Phosphorylierung auf verschiedene Substratproteine. Daraus kann eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultieren, die zur Relaxation der glatten Muskulatur führt. Ein Substrat der cGMP-Kinase I ist der IP_3 -Rezeptor Typ I, der die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) steuert. Der IP_3 -Rezeptor wird durch cGMP-Kinase I entweder direkt inhibiert (Komalavilas and Lincoln, 1996), oder von dem IP_3 -Rezeptor assoziierten Substrat IRAG (Schlossmann et al., 2000) moduliert. Neben dem Ausstrom von Calcium aus dem SR, steht auch dessen Wiederaufnahme durch eine spezifische Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) unter der Kontrolle der cGMP-Kinase. Die Phosphorylierung ihres Regulators Phospholamban erhöht die Affinität von SERCA für Calcium und die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR.

Aus dem Extrazellularraum fließt Calcium durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle. Die cGMP-Kinase I stimuliert sogenannte maxi K^+ -Kanäle (BK-Kanäle) und erhöht damit deren Offenwahrscheinlichkeit (Alioua et al., 1998). Es kommt zur Hyperpolarisation der Zellmembran, L-Typ Ca^{2+} -Kanäle werden geschlossen und der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vermindert. Die Ca^{2+} -aktivierten BK-Kanäle können den Muskeltonus zudem durch negative Rückkopplung steuern.

Neben dem Einfluss auf die Ca^{2+} -Konzentration des glatten Muskels wurde kürzlich ein Calcium unabhängiger Weg der cGMP-Kinase I α zur Regulation des Gefäßtonus beschrieben (Surks et al., 1999). Dabei wird die regulatorische Untereinheit (MBS = „myosin binding site“) der Myosin Leichtketten Phosphatase (MLCP) phosphoryliert, wobei es noch unklar ist, welche physiologische Bedeutung der Phosphorylierung der MBS durch cGMP-Kinase zukommt. Eine direkte Wirkung auf die Aktivität der Phosphatase konnte nicht gefunden werden (Nakamura et al., 1999).

In Abb. 1–2 sind die verschiedenen Mechanismen der cGMP-Kinase I dargestellt, die zum Erschlaffen der glatten Muskulatur führen können.

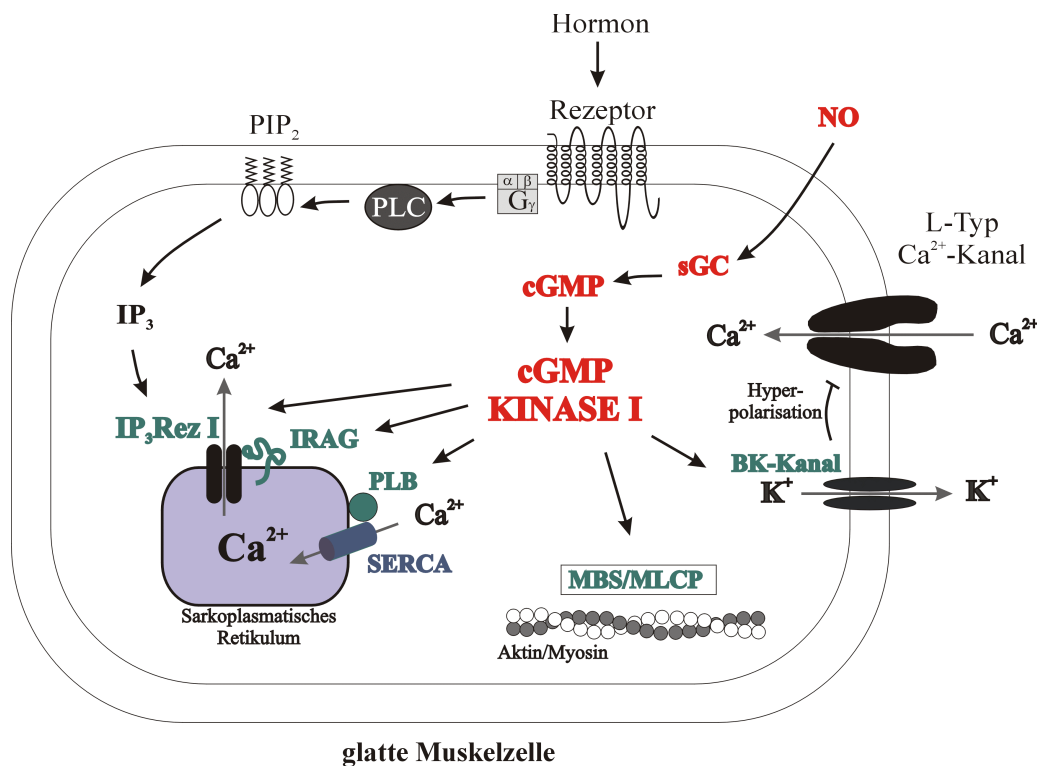


Abb. 1–2: Mechanismus der Vasorelaxation durch cGMP-Kinase I

Die cGMP-Kinase I kann den Tonus glatter Muskelzellen durch Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum steuern. Zielproteine der Kinase sind der IP_3 -Rezeptor Typ I (IP₃Rez I) oder sein Modulator IRAG, Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (BK-Kanäle) und Phospholamban (PLB), das den Rückstrom von Ca^{2+} in das SR durch die Ca^{2+} -ATPase (SERCA) reguliert. Durch Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit (MBS) der Myosin Leichtketten Phosphatase (MLCP) kann die cGMP-Kinase I α direkten Einfluss auf die Kontraktion des glatten Muskels nehmen.

1.2 Phospholamban

1.2.1 Struktur und Lokalisation von Phospholamban

Phospholamban ist ein kleines 5 kD Protein, das erstmals Anfang der 70er Jahre in Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums beschrieben wurde (Kirchberber et al., 1975). Seine Struktur weist drei charakteristische Teile auf. Die ersten 30 Aminosäuren (AS) stellen einen hydrophilen, zytosolisch lokalisierten Bereich dar und lassen sich in die Domänen Ia (AS 1-20) und Ib (AS 21-30) unterteilen. Die Domäne Ia ist dabei hauptverantwortlich für seine Assoziation mit der Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) und den modulatorischen Effekt, den Phospholamban auf dieses Enzym ausübt (Toyofuku et al., 1994). Sie beinhaltet drei Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen. Dem zytosolischen folgt ein transmembranärer Bereich am C-Terminus des Proteins (AS 31-52), der einen Leucin-Zipper enthält und der für die Verankerung in der Membran des SR verantwortlich ist. Außerdem hat diese Domäne II einen inhibitorischen Effekt und reguliert die Affinität von SERCA für Calcium (Kimura et al., 1996). Die Kopplung von Domäne Ia und II wird dem dazwischenliegenden Bereich Ib zugeschrieben, der zusätzlich die Interaktion zwischen Phospholamban und SERCA reguliert (Kimura et al., 1998).

In vitro phosphorylieren folgende Kinasen Phospholamban an drei Stellen der Domäne I: cAMP-Kinase an Ser¹⁶, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase an Thr¹⁷, Proteinkinase C an Ser¹⁰ (Simmerman et al., 1986). Bisher wird der Phosphorylierung durch all diese Kinasen die Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase zugeschrieben.

Bei Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen zeigt Phospholamban zwei Banden bei 25 kD und bei 5 kD. In Membranvesikeln aus Geweben von Säugern und nach Expression des Proteins in bakteriellen Systemen (Cook et al., 1989), konnte man die Bildung von Homopentameren beobachten, die sich durch Kochen teilweise zum Monomer reduzieren lassen (Jones et al., 1985). Mutationen in der Domäne II des Proteins zeigten, dass der Leucin-Zipper für die Bildung des Pentamers verantwortlich ist (Simmerman et al., 1996).

Phospholamban ist überwiegend im Herzmuskel (Ferguson et al., 1988) und weniger stark im langsamen Skelettmuskel („roter Muskel“) (Jorgensen and Jones, 1986) sowie in Geweben der glatten Muskulatur (Suzuki et al., 1986) exprimiert. Kürzlich wurde seine Existenz auch

im Endothel von Gefäßen beschrieben (Sutliff et al., 1999). Immunzytochemische Untersuchungen von Phospholamban zeigten seine subzelluläre Lokalisation zum Teil zytosolisch, aber hauptsächlich perinukleär (Cornwell et al., 1991) an Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums gebunden.

1.2.2 Regulatorische Funktion von Phospholamban

Die regulatorische Wirkung von Phospholamban auf die Ca^{2+} -ATPase des SR wurde schon früh erkannt und damit die Aufgabe, die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration zu steuern (Tada and Kirchberger, 1976). Der Einfluss des Proteins auf die β -adrenerge Stimulation des Herzens ist anhand von drei Mausmodellen, die eine unterschiedliche Expression des Gens zeigen, sehr gut untersucht. Phospholamban wurde einerseits überexprimiert (Kadambi et al., 1996), seine Expression reduziert (Luo et al., 1996) und das Gen komplett deletiert (Luo et al., 1994). Verminderung oder Deletion von Phospholamban führte zu einer erhöhten Frequenz von Relaxation und Kontraktion in isolierten Kardiomyozyten und zu einer verstärkten Affinität der Ca^{2+} -ATPase für Calcium. Die Überexpression von Phospholamban in Mäusen zeigte eine verminderte Ca^{2+} -Bindung der Ca^{2+} -ATPase und eine verlangsamte Kontraktilität der Zellen. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 1–3 dargestellt. Neben der Wirkung auf den Herzmuskel wurde gezeigt, dass der Gefäßtonus in PLB-defizienten Mäusen erhöht ist und seine Sensitivität gegenüber der Stimulation mit Kaliumchlorid oder Phenylephrin vermindert ist (Lalli et al., 1997). Eine ähnliche, regulatorische Funktion wurde im langsamen Skelettmuskel beschrieben (Slack et al., 1997).

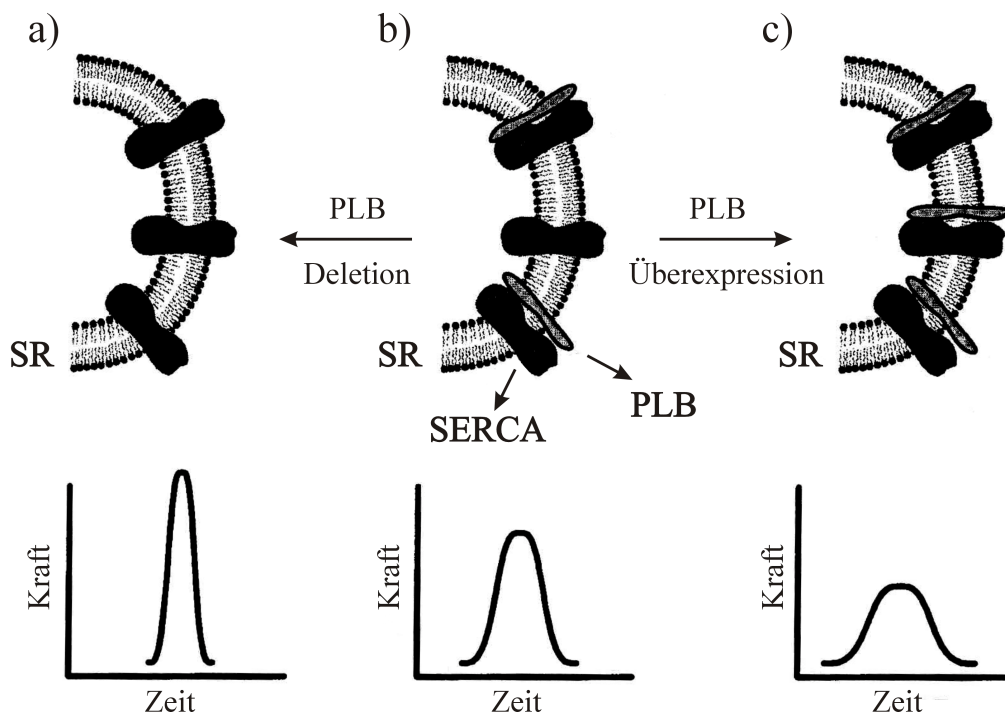


Abb. 1–3: Schematische Darstellung von Phospholamban und SERCA in verschiedenen Mausmodellen und die resultierende Kraftentwicklung im Herzen

Verschiedene Expressionsmuster von Phospholamban resultieren in einer erhöhten (a, PLB „knock out“) bzw. erniedrigten (c, Überexpression von PLB) Kraftentwicklung des Herzmuskels im Vergleich zu Wildtyptieren (b).

Aus: Phospholamban: A Protein Coming of Age (Kadambi and Kranias, 1997)

Durch Phosphorylierung von Phospholamban wird seine inhibitorische Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase aufgehoben und die Aufnahme von Calcium in das SR stimuliert. *In vivo* Untersuchungen am Herzen zeigten phosphoryliertes Phospholamban nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol (Wegener et al., 1989). Dabei geht die Übertragung des Phosphates auf Ser^{16} durch cAMP-Kinase der von Thr^{17} durch Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase voraus (Kuschel et al., 1999). Die unabhängige Funktion beider Phosphorylierungsstellen ist jedoch noch unklar. *In vitro* wird Phospholamban in Membranen des kardialen und glatten Muskels durch Zusatz der cGMP-abhängigen Proteinkinase (Raeymaekers et al., 1988) und nach Stimulation mit ANP phosphoryliert (Sarcevic et al., 1989). Twort et al. fanden nach Erhöhung der cGMP Konzentration eine gesteigerte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase (Twort and van Breemen, 1988). In kultivierten Zellen der Aorta konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Cornwell et al., 1991), wobei die Aktivierung von Phospholamban durch cGMP-Kinase *in vivo* kontrovers diskutiert wird (Huggins et al., 1989).

Als Regulationsmechanismus der Ca^{2+} -ATPase durch Phospholamban wird auch die Bildung von Homopentameren angesehen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten durch Mutationen in der Domäne II des Proteins zeigen, dass die monomere Form von Phospholamban den effektiveren Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase darstellt (Autry and Jones, 1997; Kimura et al., 1997). Das Gleichgewicht von Mono- und Pentamer ist dabei auch von der Phosphorylierung des Proteins abhängig und nach Aktivierung durch eine Kinase in Richtung des Pentamers verschoben (Cornea et al., 1997). Der genaue Mechanismus der Regulation des Calciumeinstroms in das SR durch Phospholamban und weitere Aufgaben des Proteins in der Zelle sind noch nicht geklärt. Neben der regulatorischen Funktion durch die Assoziation mehrerer Moleküle, wurde der pentameren Struktur die Funktion eines für Ca^{2+} -Ionen durchlässigen Kanals zugeschrieben (Herzyk and Hubbard, 1998; Kovacs et al., 1988). Zu dieser Theorie fehlen aber noch genauere Untersuchungen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der Mikrosomenfraktion glatter Muskeln wurde ein Substratkomplex der cGMP-Kinase I beschrieben (Schlossmann et al., 2000), der für die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration durch das sarkoplasmatische Retikulum verantwortlich gemacht wird. Neben dem IP_3 -Rezeptor Typ I und IRAG kommen noch andere Substrate der cGMP-Kinase in Membranpräparationen der Gefäßmuskulatur vor (Casnellie and Greengard, 1974; Li et al., 1996). Es war Ziel dieser Arbeit, die Beteiligung weiterer Bestandteile des oben genannten Komplexes zu untersuchen. Dazu sollte die partikuläre Fraktion aus dem Trachealmuskel von Rindern präpariert und daraus die an cGMP-Kinase assoziierten Proteine gereinigt und charakterisiert werden. Die Aufklärung dieser funktionellen Einheit kann weitere Aufschlüsse über die Regulation des Tonus der glatten Muskulatur geben.

2 Material und Methoden

2.1 Kultur und Transformation von Bakterien

2.1.1 Verwendeter Stamm

In dieser Arbeit wurde zur Amplifikation von Plasmiden der *Escherichia coli* Stamm XL2-Blue Mrf^r verwendet. Die Bakterien wurden chemisch kompetent von der Firma Stratagene bezogen. Der Genotyp des Stammes kann mit $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a$ beschrieben werden.

2.1.2 Nährmedien

LB-Medium		NZY⁺Broth (Stratagene)	
Pepton (Gibco-BRL)	10 g	NZ-amin (Casein Hydrolysat, Sigma)	10 g
Hefeextrakt (Gibco-BRL)	5 g	Hefeextrakt(Gibco-BRL)	5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l	1M MgCl ₂	12,5 ml
pH 7,2 – 7,5		1 M MgSO ₄	12,5 ml
		20 % Glucose	10 ml
		H ₂ O	ad 1 l
		pH 7,5	

Die Medien wurden autoklaviert (20 min, 121°C, 1,2 bar) und anschließend mit MgCl₂, MgSO₄ und sterilfiltrierter Glucose versetzt. Das fertige NZY⁺Broth Medium wurde bei -20°C, LB-Flüssigmedium bei RT aufbewahrt. Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % Agar (USB) zugegeben. Das mit einem Antibiotikum versetzte Festmedium konnte 4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.1.3 Kultivierung und Selektion

Durch Zugabe eines Antibiotikums können die plasmidtragenden Bakterienkolonien selektiert werden. Zur Selektion von pcDNA3.1 wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin als Hemmstoff zugesetzt. Die wässrige Stammlösung mit 100 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium (s.2.1.2). Flüssigkulturen (5 ml) wurden ausgehend von einer Einzelkolonie angeimpft und in 15 ml Plastikröhrchen über Nacht inkubiert (37°C, 225 rpm). Flüssigkulturen mit größerem Volumen (500 ml) wurden mit einer ca. 8 h gewachsenen Vorkultur 1:1000 beimpft und in 2 l Erlenmeyerkolben über Nacht bebrütet (37°C, 175 rpm).

2.1.4 Stammhaltung

E. coli Stämme können vorübergehend bei 4°C auf Agarplatten gehalten werden. Zur längeren Konservierung der transformierten Stämme wurden Einzelkolonien über Nacht in 5 ml Medium angezogen, 1:1 mit 100 % sterilem Glycerin vermischt und in Gefrieröhrchen bei -80°C gelagert.

2.1.5 Transformation

Das Einschleusen von DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Durch Zugabe eines Antibiotikums zur Kultivierung der transformierten Bakterien herrscht geeigneter Selektionsdruck um das Plasmid stabil auf Tochterzellen zu vererben.

Zur Transformation wurden in dieser Arbeit chemisch kompetente Zellen der Stammes XL2-Blue Mrf^r (s.2.1.1) verwendet, die in der Lage sind exogene DNA aufzunehmen. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, leicht gemischt und nach dem Protokoll der Firma Stratagene mit 1-50 ng DNA oder dem entsalzten Ligationsansatz (s.2.2.6) transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen 1 h in NZY⁺Broth ohne Hemmstoff geschüttelt (37°C, 225 rpm), um die Expression des Resistenzgens zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen auf ampicillinhaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die erhaltenen Klone wurden erneut angezogen (s.2.1.3), die Plasmid-DNA isoliert (s.2.2.2) und durch eine Restriktionsanalyse (s.2.2.5) überprüft.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Verwendete Plasmide

pBluescript

Das Plasmid pBluescript[®] II KS (+) (Stratagene) ist ein Abkömmling des Plasmids pUC19, enthält das Ampicillinresistenzgen und wurde zur Co-Transfektion in COS 7 Zellen verwendet (s.2.4.1).

pcDNA3.1(-)

Das Plasmid pcDNA3.1(-) (Invitrogen) ist ein Expressionsvektor und kann in Bakterien vermehrt und in eukaryontischen Zellen zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet werden. Die insertierte DNA steht unter der Kontrolle viraler Promotorsequenzen (P_{CMV}), die zu einer hohen Expressionsrate eukaryontischer Gene führen. Die Stabilität der transkribierten RNA wird durch ein Polyadenylierungssignal und Transkriptionsterminatorsequenzen verbessert. Das Plasmid trägt ein Ampicillin- und ein Neomycinresistenzgen.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

„Miniprep“ mit einem Kit der Firma peqLab

Die schnelle Präparation kleiner DNA-Mengen (bis 25 µg) wurde mit einem „Miniprep“ Kit der Firma peqLab (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I) durchgeführt. Die Methode kombiniert eine modifizierte alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) mit den selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften von Silikamembranen.

Die Bakterien werden dazu über Nacht angezogen (s.2.1.3), durch Zentrifugation pelletiert und in einer alkalischen Lyse aufgeschlossen. Der Zusatz von RNase A vermeidet die Kontamination mit freigesetzten RNA-Molekülen. Nach Neutralisation des alkalischen Lysats renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNA, während das viel größere Bakterienchromosom denaturiert und mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS, abgetrennt werden kann. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wird an eine Silikamembran gebunden, gewaschen und nach dem Trocknen der Säule mit 50 µl H₂O eluiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde für Restriktionsverdau und Sequenzierungen eingesetzt.

„Maxiprep“ mit einem Kit der Firma Qiagen

Benötigt man größere Mengen Plasmid-DNA als mit dem beschriebenen Verfahren gewonnen werden, so können mit einem „Maxiprep“ Kit der Firma Qiagen bis zu 750 µg DNA aus 250-500 ml Bakterienkultur (s.2.1.3) aufgereinigt werden. Das Prinzip ist mit dem der „Miniprep“ vergleichbar. Nach alkalischer Lyse der Bakterien wird die negativ geladene DNA in einem Nidrigsalzpuffer an ein Anionenaustauscherharz gebunden, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen durch höhere Salzkonzentrationen gewaschen und schließlich mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Die DNA wird durch Fällen mit Isopropanol entsalzt, mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 300 µl H₂O aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde für die Transfektion in COS 7 Zellen (s.2.4.1) eingesetzt.

2.2.3 Gelelution und Reinigung von DNA-Fragmenten

Eine einfache und schnelle Methode zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR, Restriktionsverdau oder aus einem Agarose-Gel bietet der GFXTM Kit der Firma Amersham (PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Auf Agarose-Gelen immobilisierte DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten, mit „Capture-Buffer“, der die Gelstruktur auflöst, inkubiert, und anschließend an das chaotrope Salz einer Säule gebunden. Genauso wurden gelöste DNA-Fragmente mit „Capture-Buffer“ versetzt, an die Säule gebunden und nach zwei Waschschrinen mit 30-50 µl H₂O eluiert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration und Reinheit einer RNA- oder DNA-Lösung zu bestimmen, wurde die Absorption eines geeignet verdünnten Aliquots zwischen 220 und 350 nm in einem UV-Vis-Spektrometer (Zeiss Jena) gemessen. Das Spektrogramm muss ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen und dann möglichst rasch abfallen. Ein Maß für die Reinheit ist das Verhältnis $A_{260/280}$. Bei reiner Nukleinsäure liegt es bei 2,0, bei reinem Protein bei 0,6. Über die Absorption der Lösung bei 260 nm kann bei einer Schichtdicke von 1 cm die Konzentration der Probe folgendermaßen ermittelt werden:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml dsDNA}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg/ml ssRNA}$$

2.2.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische, meist palindromische Basensequenzen innerhalb einer DNA-Doppelhelix erkennen und die DNA in beiden Strängen mit definierten Enden schneiden. Bei der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung entstehen einander komplementäre, 5'- bzw. 3'- überhängende Enden („sticky ends“), die immer eine 5'Phosphat- und eine 3'Hydroxyl-Gruppe besitzen, was die enzymatische Neuverknüpfung (s.2.2.6) kompatibler Enden ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2–1 angegebenen Restriktionsenzyme der Firma NEB mit den zugehörigen Puffern verwendet. Für einen Restriktionsverdau mit zwei Enzymen wurde der von NEB empfohlene Puffer verwendet.

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
<i>Bam HI</i>	5'-G/GATCC-3'
<i>Eco RI</i>	5'-G/AATTC-3'
<i>Pst I</i>	5'-CTGCA/G-3'
<i>Xba I</i>	5'-T/CTAGA-3'
<i>Xho I</i>	5'-C/TCGAG-3'

Tabelle 2–1 Verwendete Restriktionsenzyme

Die Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet.

Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zur Analyse von isolierter und klonierter DNA eingesetzt. Dazu wurden ca. 100 ng DNA in 15 µl Reaktionsansatz 1 h geschnitten. Für präparative Ansätze zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden 2-4 µg DNA in 40-50 µl Gesamtvolumen 3-5 h geschnitten. Pro µg DNA und pro h wurden 5-10 Units Enzym eingesetzt. Die Enzymmenge sollte nicht mehr als 1/10 des Ansatzes betragen. Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert (optimale Temperatur für die angegebenen Enzyme).

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxyl- und dem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Fragmente unter ATP Ver-

brauch. In der Ligation werden Fremd-DNA und linearisierte Vektor-DNA zu rekombinanter Plasmid-DNA verknüpft.

Zur Ligation wurden in einem 20 µl Ansatz 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl, NEB), 2 µl Ligasepuffer, Vektor-DNA und zu insertierendes DNA-Fragment bei 16°C über Nacht oder 4-5 h bei 23°C inkubiert. Das Verhältnis von Vektor-DNA und Insert betrug dabei 2:1 und deren Menge wurde aus dem Molekulargewicht (Größe des DNA-Fragments x 660 g/mol) folgendermaßen berechnet:

$$\text{Vektor [bp]} \times 660 \text{ g/mol} \times 25 \text{ fmol} \times 10^{-6} = \text{Vektor-DNA [ng]}$$

$$\text{Insert [bp]} \times 660 \text{ g/mol} \times 50 \text{ fmol} \times 10^{-6} = \text{Insert-DNA [ng]}$$

Um die DNA nach der Ligation in Bakterien zu transformieren (s.2.1.5), muss der Ansatz vollständig entsalzt werden. Dies wurde durch Dialyse gegen H₂O mit einer Membran der Firma Millipore (Typ VS, Porengröße: 0,025 µm) durchgeführt. Die Membran wurde in einer mit H₂O gefüllten Petrischale auf die Wasseroberfläche gelegt und der Ligationsansatz darauf pipettiert. Nach 20 min wurde der entsalzte Ansatz von der Membran genommen und bei -20°C gelagert oder direkt zur Transformation eingesetzt.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Reinigung von DNA-Molekülen erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und werden im elektrischen Feld nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Sigma) wurde in das Gel eingegossen und kann durch Interkalation in Nukleinsäuren diese unter UV-Licht sichtbar machen. Zur Auftrennung von Fragmenten im Bereich von 100-1000 bp wurden 2 % Agarosegele verwendet, für DNA der Länge 1-10 kb wurden 0,7 % Agarosegele verwendet. Die Agarose (Seakem GTG, Biozym) wurde in 1 x TBE aufgeschmolzen, auf 60°C abgekühlt, 0,1 µl/ml Ethidiumbromid zugegeben und in horizontale Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (6 x Dye) versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 80-150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde ein mit 6 x Dye versetzter DNA-Standard (1 kb-Ladder, Gibco-BRL) aufgetragen. Um den Verlauf der Elektrophorese zu verfolgen, wurden dem Probenpuffer die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-cyanol zugesetzt, die auf der Höhe bestimmter Molekülgrößen mitlaufen. Laufpuffer für die Elektrophorese war 1 x TBE.

10 x TBE		6 x Dye	
Tris/HCl, pH 8.0	0,9 M	Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 %
Borsäure (Merck)	0,9 M	EDTA	1,2 mM
EDTA	20 mM	10 x TBE	6 %
		Bromphenolblau (IBI)	0,15 %
		Xylencyanol FF (Sigma)	0,15 %

TBE wurde bei RT und 6 x Dye bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzanalyse rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten Methode von Sanger (Sanger et al., 1977). Durch Verwendung eines spezifischen Primers synthetisiert eine thermostabile, exonucleasefreie DNA-Polymerase in einer PCR-Reaktion (s.2.2.11) einen komplementären Strang des gewünschten DNA-Fragments. Der Reaktion sind neben der zu sequenzierenden DNA, dem Primer und der DNA-Polymerase noch Desoxynukleotide (dNTP) und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP) zugesetzt. Nach Einbau eines ddNTPs ist eine Verlängerung der DNA nicht mehr möglich und es kommt zu Kettenabbrüchen. Bei sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Da jede der vier Basen durch einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann die Basenfolge nach Auftrennung der Fragmente ermittelt werden.

Die Auftrennung erfolgte automatisch durch Kapillarelektrophorese (ABI PrismTM 310 Sequencer, PE Applied Biosystems). Die markierten Didesoxynukleotide werden dabei mit einem Laser angeregt, das emittierte Licht der vier verschiedenen Wellenlängen (ddGTP: 540 nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm) detektiert und die Sequenz mit einer entsprechenden Software ausgewertet.

Sequenzreaktion

Bei einer Sequenzreaktion können ca. 500 Basen identifiziert werden. Längere DNA-Fragmente müssen durch mehrere Reaktionen mit überlappenden Primern identifiziert werden. Es wurden 500 ng Plasmid-DNA zur Sequenzierung eingesetzt.

PCR-Ansatz

Ready Reaction Mix	4 µl
Primer 0,8 pmol/µl	4 µl
Plasmid-DNA 1 µg/µl	0,5 µl
H ₂ O	11,5 µl

Der gebrauchsfertige "Ready Reaction Mix" (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) enthält die DNA-Polymerase, dNTPs und die fluoreszenzmarkierten ddNTPs und wurde von PE Applied Biosystems bezogen. Er wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra (Uno-Thermoblock) durchgeführt. Zunächst wurde die DNA für 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend 25 Zyklen des folgenden Protokolls durchgeführt:

Denaturierung:	95°C	30 sek
Annealing:	50°C	40 sek
Elongation :	60°C	4 min

Die unterschiedlichen Temperaturen wurden langsam über einen Temperaturgradienten (1°C pro sek) eingestellt.

Die Reaktionsprodukte der PCR wurden über eine Gelfiltrationssäule (CentriSep Column, Perkin Elmer) von freien fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt, in 20 ml Template Suppression Reagent (TSR, ABI Prism) aufgenommen und für 3 min bei 95°C denaturiert. TSR verhindert die Ausbildung von doppelsträngiger DNA. Die Proben wurden entweder sofort sequenziert oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.9 Isolierung von Poly(A)-RNA mit Dynabeads®

Fast alle eukaryontischen Boten-RNA-Moleküle werden nach Transkription am 3'-Ende polyadenyliert. Diese Poly(A)-Schwänze können durch Basenpaarbindung an Polythymidylsäure zur affinitätschromatischen Reinigung von Boten-RNA aus Gesamt-RNA oder direkt aus Gewebe benützt werden. In dem „Dynabeads Biomagnetic Separation System“ der Firma Dynal sind die Oligo(dT)-Ketten kovalent an die Oberfläche magnetischer Polystyrolkugeln (Dynabeads Oligo (dT)₂₅) gebunden. Durch Inkubation der Dynabeads mit homo-

genisiertem Gewebe wird die dort exprimierte Poly(A)-RNA gebunden. In einem Magneten werden die Dynabeads immobilisiert, was die anschließenden Waschschrte sowie die Elution erleichtert und Kontaminationen verhindert.

Zur Isolierung von Poly(A)-RNA wurden 10 mg Gewebe mit 300 μ l Lysispuffer erst mit einem Teflon-Potter, dann durch dreimaliges Auf- und Abziehen mit einer Spritze (G24) homogenisiert. Das aufgeschlossene Gewebe wurde zentrifugiert (1 min, 4°C, 18 000 x g) und aus dem Überstand die Poly(A)-RNA mit 50 μ l gewaschener und equilibrierter Dynabeads nach dem Protokoll der Firma Dnal gereinigt. Nach Elution mit 10 μ l H₂O_{RNA} wurde die erhaltene Poly(A)-RNA bei -80°C aufbewahrt, oder direkt zur Synthese von cDNA verwendet.

H₂O_{RNA}

Bei Arbeiten mit RNA ist stets darauf zu achten, dass alle verwendeten Materialien und Lösungen frei von RNAsen sind. Das verwendete Wasser wurde in Flaschen autoklaviert (20 min, 121°C, 1,2 bar), die mindestens 4 h bei 180°C erhitzt wurden.

2.2.10 Synthese einzelsträngiger cDNA

Um aus Boten-RNA einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) zu erhalten, wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Superscript II Reverse Transkriptase, Gibco-BRL) verwendet. Das Enzym benötigt als Startpunkt der Synthese einen Primer. Dazu wurden sogenannte „Random-Hexamer-Primer“ eingesetzt, die sich an zufällig komplementäre RNA anlagern. Nach Anlagerung der Primer wird in Anwesenheit von dNTPs und Polymerase der erste cDNA-Strang synthetisiert. Nach Abschluss der Reaktion wird die Reverse Transkriptase durch Hitze inaktiviert und die verbleibende RNA des RNA/DNA-Hybrids durch Zugabe von RNase H verdaut. Die so synthetisierte cDNA wurde zur PCR eingesetzt.

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA wurde ein Kit der Firma Gibco-BRL (SuperScript™ Pre-amplification System for First Strand cDNA Synthesis) verwendet. Primer, dNTPs, Polymerase, RNase H und alle nötigen Lösungen und Puffer sind darin enthalten. Es wurden 10 μ l RNA-Lösung (s.2.2.9) zur Synthese eingesetzt. Die RNA-Konzentration konnte in diesem geringen Volumen nicht bestimmt werden.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Die DNA-Matrize wird durch Hitzedenaturierung (94°C) zunächst in Einzelstränge aufgeschmolzen. An die entstandenen Einzelstränge können nun spezifische Primer binden, die einen Startpunkt für die DNA-Synthese durch eine DNA-Polymerase bilden. Es werden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die sich an den kodierenden (*forward* Primer), bzw. den nicht-kodierenden (*reverse* Primer) Strang der zu amplifizierenden DNA anlagern (Primer-Annealing). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation). Nach erneutem Aufschmelzen der DNA und Primer-Annealing erfolgt wieder eine Elongation. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle. Die Annealing-Temperatur ist von den verwendeten Primern abhängig, die Elongations-Temperatur wird für die eingesetzte Polymerase optimiert und die Zeit zur Kettenverlängerung hängt von der Größe des zu amplifizierenden Genabschnittes ab (1 min/kb).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde PfX-Polymerase (Polymerasepuffer, MgSO₄, Invitrogen) eingesetzt, die sogenanntes „Proofreading“ besitzt und damit in der Lage ist Fehler in der DNA-Synthese zu korrigieren. Die PCR zur Amplifikation von Phospholamban wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra (Uno-Thermoblock) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

PCR-Ansatz

PfX-Polymerase	0,8 µl
10 x Polymerasepuffer	5 µl
10 mM dNTPs	1,5 µl
50 mM MgSO ₄	1 µl
Primer: PLB1f, 20 pmol/µl	0,75 µl
Primer: PLB2r, 20 pmol/µl	0,75 µl
H ₂ O	ad 50 µl

PCR-Protokoll

<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	15 sek	
Annealing	50°C	30 sek	30
Elongation	68°C	60 sek	
Verlängerung	68°C	2 min	1

PCR-Primer

Durch entsprechende Wahl der PCR-Primer kann die synthetisierte DNA modifiziert werden. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten können entsprechende Restriktionsschnittstellen (s.2.2.5) eingefügt werden. Vor dem „Start-ATG“ wurde eine sogenannte Kozak-Sequenz (Kozak, 1991) eingefügt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Annealing-Temperatur</i>	<i>Modifikation</i>
PLB1f	5'-CCG GAA TTC ACC GCC ATG GAA AAA GTG CAA TAC-3'	48°C	<i>Eco RI</i> Schnittstelle, <i>Kozak</i> -Sequenz
PLB2r	5'-GCG GGA TCC TCA CAG AAG CAT CAC AAT-3'	50°C	<i>Bam HI</i> Schnittstelle

Tabelle 2–2: Primer zur Klonierung von Phospholamban

2.3 Kultur eukaryontischer Zellen

2.3.1 Verwendete Zelllinie

Für die Expression in eukaryontischen Zellen wurde die permanente Zelllinie COS 7 (ECACC No: 87021302, European Collection of Cell Cultures) verwendet. COS 7 Zellen sind von Affennierenzellen (African green monkey) abgeleitet, haben die Morphologie von Fibroblasten und tragen stabil eine natürlich vorkommende Mutante des SV40 Virus, die das permanente Wachstum der Zellen ermöglicht.

2.3.2 Nährmedium

Um eukaryontische Zellen *in vitro* zu kultivieren, müssen die Kulturbedingungen den *in vivo* herrschenden Bedingungen so weit wie möglich angepasst sein. Dazu wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) der Firma Invitrogen mit folgenden Zusätzen (Invitrogen) verwendet:

DMEM	500 ml
FCS	50 ml
PenStrep 10 000 U	5 ml
Nicht essenzielle AS	5 ml
HT-Zusatz	10 ml

Das DMEM versorgt die Zellen mit Salzen, Glucose, Aminosäuren und Vitaminen, während 10 % fötales Kälberserum (FCS) den Zellen Wachstumsfaktoren, Hormone, Anheftungsfaktoren u. ä. zur Verfügung stellt. Weiterhin wurden die Zellen zum besseren Wachstum mit nicht essenziellen Aminosäuren (AS) und HT-Zusatz (Hypoxanthin und Thymidin) versorgt. Der Zusatz von Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verhindert das Wachstum von Bakterien in der Zellkultur.

Das substituierte Medium wurde bei 4°C höchstens 4 Wochen aufbewahrt.

2.3.3 Kultivierung

COS 7 Zellen wachsen in adhärennten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Kulturgefäße aus Plastik (Polystyrol, Costar). Die Zellen werden bei 37°C und 5 % CO₂ (konstanter pH-Wert) kultiviert.

Ein Gefrierstock der Zellen wurde auf Eis aufgetaut und in einer Kulturflasche (75 cm²) mit 15 ml Medium ausgesät (1. Passage). Nach ca. 2 Tagen hatten die Zellen die Flasche konfluent bewachsen und wurden umgesetzt (2. Passage). Die Zellen wurden dazu zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen, mit 4 ml 0,25 % Trypsin-EDTA in PBS (Invitrogen) versetzt, ca. 30 sek bei RT geschwenkt und nach fast vollständigem Absaugen des Trypsins 3 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch die Inkubation und anschließendes Abklopfen wurden die Zellen von der Gefäßwand abgelöst und konnten in 9 ml frischem Medium aufgenommen werden. 800 µl dieser Zellsuspension wurden erneut in 15 ml Medium angezogen.

Zur Transfektion der Zellen am folgenden Tag wurden 800 µl der Zellsuspension in Petrischalen (Durchmesser: 10 cm) mit 10 ml Medium ausgesät.

Phosphat gepufferte Saline (PBS):

NaCl	153 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
pH	7,5

Mit dem physiologischen PBS Puffer können die Zellen von Stoffwechselprodukten und verbrauchtem Medium gereinigt werden, ohne Schaden zu nehmen. PBS wurde bei RT gelagert.

2.3.4 Stammhaltung

Zum Anlegen neuer Gefrierstocks wurden die Zellen in einer großen Flasche (150 cm², 1,8 ml Zellsuspension in 25 ml Medium) angezogen, mit 7 ml Trypsin passagiert (s.2.3.3) und in 8 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann 10 min zentrifugiert (180 x g), das Medium abgenommen und in 3 ml kaltem (4°C) Gefriermedium aufgenommen. Die zu 1 ml aliquotierten Gefrierstocks wurden sofort bei -80°C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

Gefriermedium

DMEM	20 ml
FCS	2 ml
Nicht essenzielle AS	0,2 ml
DMSO	2,2 ml

Zur Konservierung wurden die Zellen ohne Antibiotikum mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gefriermedium wurde immer frisch hergestellt.

2.4 Proteinexpression in COS 7 Zellen

2.4.1 Transfektion von COS 7 Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Bei einer transienten Transfektion wird die zirkuläre Plasmid-DNA unabhängig vom Genom der Wirtszelle transkribiert, allerdings sind die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren.

Calciumphosphat-Methode

Die Calciumphosphat-Methode ermöglicht eine einfache, preiswerte und effiziente Transfektion von Plasmid-DNA in COS 7 Zellen. Die DNA wird mittels eines Calciumphosphat-Präzipitates, das sich an der Zelloberfläche anlagert, in die Zellen eingeschleust.

Dazu wurden 15-16 µg DNA in 210 µl Wasser verdünnt und tropfenweise mit 30 µl CaCl₂ (2 M) versetzt. In einem weiteren Gefäß wurden 240 µl 2 x HBS vorgelegt und das DNA-CaCl₂-Gemisch (240 µl) tropfenweise zupipettiert. Nach 30 min Inkubation bei RT (nach 15 min kräftig vortexen) konnte das Präzipitat tropfenweise zu den Zellen gegeben werden. Die Transfektion und Expression erfolgte durch weitere Inkubation der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ für drei Tage.

2 x HBS

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

2 x HBS und CaCl₂ wurden aliquotiert bei -20°C gelagert.

Transfektion von IP₃-Rezeptor Typ I, IRAGa, cGK I α/β und Phospholamban

Die für IP₃-Rezeptor Typ I, IRAGa, cGK I α/β und PLB kodierende DNA wurde in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA 3.1 kloniert (s.2.2.1) und in folgenden Mengen zur Transfektion in COS 7 Zellen eingesetzt. Bei der Expression nicht aller Komponenten des

Komplexes, wurde die DNA Menge mit pBluescript Plasmid-DNA auf 16 µg ergänzt, um vergleichbare Eigenschaften des Calciumphosphat-Präzipitates zu erhalten.

Plasmid-DNA	DNA/Schale	DNA/Schale	DNA/Schale	DNA/Schale
IP ₃ -Rezeptor Typ I	10 µg	10 µg		
IRAGa	2 µg	3 µg		
cGK I α oder β	2 µg	3 µg	2 µg	
Phospholamban	2 µg		2 µg	2 µg
pBluescript			12 µg	14 µg

Tabelle 2–3: Mengenangaben für die Transfektion von Plasmid-DNA in COS 7 Zellen

2.4.2 Ernten der Zellen

Drei Tage nach der Transfektion und Expression der Proteine wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde 2 x mit je 10 ml PBS gewaschen, pro Schale 2 ml kalter (4°C) PBS mit Proteaseinhibitoren zugegeben und die Zellen von der Schale abgeschabt. Nach Zentrifugation (720 x g, 10 min) und einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in hypotonem Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) mit Proteaseinhibitoren und 2 mM EDTA lysiert (50 µl/Schale), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Spritze (G23) wurden die Zellen nahezu vollständig homogenisiert. Das aufgeschlossene Zelllysate wurde bei -80°C aufbewahrt.

Proteaseinhibitoren

Benzamidin	1	mM
Leupeptin	0,5	µg/ml
PMSF	0,3	mM

2.5 Allgemeine Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen

2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Bradford, 1976). Der Coomassie-Farbstoff bindet Proteine in saurem Milieu nach zwei Mechanismen. Der Triphenylmethan-Farbstoff kann mit unpolaren Proteinstrukturen interagieren und durch anionische Sulfonsäuregruppen kationische Aminosäuren binden. Dadurch kommt es zu einer Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Da die Absorption bei 595 nm direkt proportional zur Proteinmenge ist, kann die Konzentration der Probe, soweit kein SDS enthalten ist, anhand von BSA Standards ermittelt werden.

Zur Messung wurden 100 µl Proteinlösung (1:100 bis 1:300 verdünnt), Standard-Lösung (1-10 µg BSA/100 µl H₂O) oder Puffer (Referenzmessung) mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt.

Bradford-Lösung

Coomassie Brilliant Blue G 250	200 mg
Ethanol	100 ml
84,5 % H ₃ PO ₄	200 ml
H ₂ O	ad 2 l

Der Coomassie-Farbstoff (Sigma) wurde in Ethanol gelöst, Wasser und Phosphorsäure zugegeben und mit Wasser auf 2 l aufgefüllt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und dann solange filtriert, bis die Extinktion bei 595 nm 0,35-0,4 beträgt. Die Lösung wurde bei RT lichtgeschützt gelagert.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine und Proteinkomplexe können mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und charakterisiert werden (Laemmli, 1970). Das SDS erfüllt hierbei zwei entscheidende Aufgaben. Einerseits denaturiert es die Proteine und dissoziiert Komplexe und Multimere in ihre Untereinheiten, zum anderen lagert es sich um die gelösten Moleküle, verleiht jedem Protein eine vergleichbare

negative Partialladung pro Masseneinheit und ermöglicht dadurch eine Auftrennung, die nur von der Größe, nicht aber von der Ladung der Proteine abhängt. Durch entsprechende Zusammensetzung der Gele kann je nach Protein ein optimales Trennverhalten erreicht werden. Multimere Proteine werden zusätzlich durch reduktive Spaltung mit DTT in ihre Untereinheiten zerteilt.

SDS-Polyacrylamidgel

Die Trennung im Gel erfolgt durch den sogenannten Molekularsiebeffekt anhand der Größe des Proteins im elektrischen Feld. Durch Änderung des Vernetzungsgrades des Acrylamids (AA) mit Bis-Acrylamid (BA) lassen sich die Trenneigenschaften der Gele variieren. Die Polymerisation des Gels folgt einer radikalischen Reaktion die durch Zusatz von APS als Radikalstarter (Zerfall des Peroxides) und TEMED als Katalysator sehr rasch abläuft. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine erst das Sammelgel durchlaufen, fokussiert und vorsortiert werden und dann im Trenngel aufgetrennt werden.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießvorrichtungen der Firma BioRad (Mini Protean I und II Cell) verwendet. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm, die Größe der Taschen 5 mm (10 Taschen pro Gel). Das Trenngel wurde bis ca. 2,5 cm unter den Rand der Apparatur eingefüllt, mit Isopropanol überschichtet und nach vollständiger Polymerisation (ca. 45 min) mit Wasser gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurde das Sammelgel darüber gegossen.

Trenngel	11 %	12,5 %	Sammelgel	5 %
30 % AA: 0,2 % BA	3,1 ml	3,5 ml	30 % AA(29:1, SERVA)	0,83 ml
1,8 M Tris/HCl, pH 8,8	1,8 ml	1,8 ml	0,6 M Tris/HCl, pH 6,8	0,5 ml
10 % SDS	83,5 μ l	83,5 μ l	10 % SDS	50 ml
H ₂ O	3,6 ml	3,2 ml	H ₂ O	3,6 ml
10 % APS	100 μ l	100 μ l	10 % APS	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	TEMED	10 μ l
Σ	8,5 ml	8,5 ml	Σ	5 ml

Tabelle 2-4: Zusammensetzung von 11 % und 12,5 % SDS-Polyacrylamidgelen

Die Mengen sind für 2 Gele der Mini Protean Apparaturen angegeben.

Das 11 % Gel eignet sich sehr gut zur Auftrennung von IP₃-Rezeptor Typ I (240 kD) und IRAG (130 kD), während sich das 12,5 % Gel besser zur Trennung von cGMP-Kinase I (73 kD) eignet.

Die AA/BA-Lösung wurde aus einer 40 % Acrylamid-Lösung (Fluka) und N,N'-Methylenbisacrylamid (Fluka) hergestellt. Die Acrylamidlösungen und TEMED wurden bei 4°C aufbewahrt, 10 % APS in H₂O bei -20°C eingefroren und die übrigen Lösungen bei RT gelagert.

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Die Proben wurden mit 4 x Probenpuffer nach Laemmli verdünnt (Σ max. 35 μ l), 3 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle des Laufverhaltens jeweils 8 μ l eines vorgefärbten Proteinstandards (175 kD – 6 kD, Broad Range, NEB) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Laufpuffer mit 80 V gestartet und nach Erreichen des Trenngels auf 150 V erhöht.

4 x Probenpuffer

Tris/HCl, pH 6,7	200 mM
SDS	5 %
DTT	200 mM
Bromphenolblau	0,04 %
Glycerin	40 %

10 x Laufpuffer

Tris/HCl, pH 8,3	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1 %

Der Probenpuffer wurde bei -20°C gelagert und immer frisch mit DTT versetzt, der Laufpuffer wurde bei RT aufbewahrt.

2.5.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine wie Phospholamban mit einem Molekulargewicht von 5 bis 30 kD aufzutrennen sind Tricin-Gele nach Schägger und Jagow (Schägger and von Jagow, 1987) wesentlich besser geeignet, als SDS-Gele nach Laemmli. Diese Trenneigenschaft ist darauf zurückzuführen, dass Tricin anstelle von Glycin als Folgeion verwendet wird. Tricin (liegt als Anion vor) läuft im Sammelgel schneller als Glycin (nahe IEP) und kann so die Eigenschaften des Sammelgels zu Gunsten kleiner Proteine verändern.

Zur besseren Auftrennung der kleinen Proteine wird zwischen Trenn- und Sammelgel ein Spacergel gegossen. Der Zusatz von Harnstoff kann das Laufverhalten ebenfalls positiv beeinflussen. Die Probenvorbereitung wurde wie bei SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt (s.2.5.2). Die Elektrophorese wurde in einem tricinhaltigen Kathodenpuffer und einem Tricin freien Anodenpuffer bei 30 V gestartet und nach Erreichen des Trenngels auf 150 V erhöhet.

Zusätzlich wurden zur Kontrolle des Laufverhaltens jeweils 8 μl eines vorgefärbten Proteinstandards (250 kD – 3 kD, SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen) aufgetragen.

	Trenngel	Harnstoffgel	Spacergel	Sammelgel
24,25 % AA/0,75 % BA	5 ml	5 ml	2 ml	1 ml
Gelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	1,6 ml	1,55 ml
Glycerin	1 g	-	-	-
Harnstoff (final 6 M)	-	2,7 g	-	-
Wasser	-	-	1,3 ml	3,7 ml
TEMED	7 μl	7 μl	6 μl	12 μl
10 % APS	45 μl	45 μl	20 μl	60 μl
Σ	7,5 ml	7,5 ml	5 ml	6,25

Tabelle 2-5: Zusammensetzung von 16,5 % Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen

Die Mengen sind für 2 Gele der Mini Protean Apparaturen angegeben.

Die AA/BA-Lösung wurde aus einer 40 % Acrylamid-Lösung (Fluka) und N,N'-Methylenbisacrylamid (Fluka) hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.

Anoden-, Kathoden- und Gelpuffer

	Tris	Tricin	pH	SDS
Anodenpuffer	0,2 M		8,9	
Kathodenpuffer	0,1 M	0,1 M	8,25	0,1 %
Gelpuffer	3,0 M		8,45	0,3 %

Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt, das Einstellen des Kathodenpuffers war nicht nötig, da der pH-Wert ungefähr bei 8,25 liegt. Alle Puffer wurden bei 4°C ca. 4 Wochen aufbewahrt.

2.5.4 Elektroblot von Polyacrylamid-Gelen

Der Transfer auf eine Membran ermöglicht eine spezifische Identifizierung und Charakterisierung der aufgetrennten Proteine und macht sie für eine Immundetektion (s.2.5.5) zugänglich. Nach dem „Semi-Dry“ System wurden die Proteine im elektrischen Feld vertikal auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, 0,45 µm Porengröße) transferiert. Die PVDF-Membran ist ideal zur Immundetektion geeignet, kann dazu mehrfach verwendet werden und ermöglicht das Übertragen der Proteine ohne einen Verlust durch die Membran. Sie eignet sich zum Transfer von Proteinen >10 kD. Zur Detektion des Phospholamban Monomers (5 kD) wurde eine Transfer-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet (Immobilon-P^{SQ}).

Die Probe wurde elektrophoretisch (s.2.5.2) aufgetrennt und in einer Transfer-Apparatur der Firma Novablot (Elektrophoretik Transfer Kit, LKB) nach folgendem Aufbau (von unten nach oben) auf die Membran übertragen:

- gewässerte Anode (Graphitplatte)
- 6 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer I
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II
- PVDF-Membran, mit Methanol befeuchtet, getränkt in Anodenpuffer II
- (Tricin-)SDS-Polyacrylamidgel
- 6 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer
- gewässerte Kathode (Graphitplatte)

Die Filter (GB001, Schleicher & Schüll) und die Membran wurden etwas größer als das Gel zugeschnitten, der Blot luftblasenfrei aufgebaut und die Proteine 1 h bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membran transferiert.

Anodenpuffer I

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

Kathodenpuffer

Tris/HCl, pH 7,6	25 mM
ϵ -Aminocapronsäure (Serva)	40 mM
Methanol	20 %

Anodenpuffer II

Tris/HCl, pH 10,4	30 mM
Methanol	20 %

2.5.5 Immundetektion

Im Westernblot können Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern identifiziert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden. Dieses Verfahren besteht aus drei Schritten (SDS-PAGE - Blot - Immundetektion) und erlaubt je nach Qualität des verwendeten Antikörpers eine sehr sensitive und spezifische Detektion eines Proteins.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren wurde die Membran 1 h in 5 % Magermilchpulver (MP) blockiert. Das überschüssige Milchpulver wurde durch drei Waschschriffe mit TBST (3 x 5 min) entfernt und die Membran 2 h mit einem spezifischen Antikörper (primärer Antikörper) inkubiert. Der Blot wurde anschließend gewaschen (3x 5 min, 1 % MP) und 2 h mit einem an Alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper (sekundärer Antikörper) inkubiert. Nach erneutem Waschen (2 x 5 min, 1 % MP, 1 x 5 min, TBST) wurde der Antigen-Antikörperkomplex folgendermaßen sichtbar gemacht:

Alkalische-Phosphatase

5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) wird durch Alkalische Phosphatase hydrolysiert und bildet nach Oxidation mit Nitrotetrazolblau (NBT) einen blauen Indolfarbstoff.

Zur Immundetektion wurden 20 ml AP-Puffer mit je 80 μ l BCIP- und NBT-Lösung versetzt und die Membran solange in dieser Lösung inkubiert, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt, der Blot getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

Meerrettich-Peroxidase

Meerrettich-Peroxidase (HRPO = horseradish peroxidase) oxidiert in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol, dabei entsteht vorübergehend ein lichtemittierender, angeregter Zustand. Diese Chemolumineszenz (428 nm) wird durch p-Iodophenol verstärkt und kann durch Schwärzung eines Films sichtbar gemacht werden.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden in einem Photolabor bei Rotlicht durchgeführt. Die Membran wurde mit dem Chemolumineszenzreagenz der Firma NEN Life Science Products überschichtet, 2 min inkubiert, der Blot in eine Klarsichthülle gelegt und durch Auflegen eines Filmes (Hyperfilm RPN6, Amersham) detektiert. Die Belichtungszeit betrug zwischen 30 sek und 15 min. Die Filme wurden mit einer Entwicklermaschine der Firma Agfa (Curix 60) entwickelt.

Verwendete Antikörper:

Die primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 6–1 und Tabelle 6–2 aufgelistet. Die anti-IRAG und anti-cGMP-Kinase I Antikörper wurden am Institut für Pharmakologie der TU München hergestellt. Für cGMP-Kinase I wurden spezifische Antikörper gegen den N-Terminus der beiden Isoformen α und β und gegen die gemeinsame Region („common“ Region) der Kinase verwendet.

10 x TBST

Tris/HCl, pH 8,0	100 mM
NaCl	1,5 mM
Tween 20 (SERVA)	0,5 %

Antikörperlösung

BSA	5 %
Natriumazid	0,05 %
in TBST	

AP-Puffer

Tris/HCl, pH 9,5	10 mM
NaCl	1,5 M
MgCl ₂	5 mM

Magermilchpulver

Magermilchpulver	1 bzw. 5 %
in TBST	

BCIP-Lösung		NBT-Lösung	
BCIP (Sigma)	25 mg/ml	NBT (Sigma)	50 mg/ml
DMF	50 %	DMF	70 %

TBST und AP-Puffer wurden bei RT aufbewahrt, die Antikörperlösungen bei 4°C und BCIP- und NBT lichtgeschützt bei -20°C gelagert. 1 und 5 % Milchpulver (Reformhaus) wurden immer frisch hergestellt.

2.5.6 Färbung von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können im Gel fixiert und angefärbt werden oder auf einem Westernblot mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht und identifiziert werden.

2.5.6.1 Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Blau kann Proteine unspezifisch binden und im Gel sichtbar machen (s.2.5.1). Da die Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes proportional zur Proteinmenge erfolgt, ist eine quantitative Auswertung möglich. Die Coomassie-Färbung eignet sich auch zur Detektion von Westernblots, ist dort aber vollständig reversibel. Mit Coomassie Blau können Proteinbanden ab 50 ng detektiert werden.

Kleine Proteine wie Phospholamban haben ein wesentlich schlechteres Bindungsvermögen für den Coomassie-Farbstoff und können oft gar nicht angefärbt werden.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde 20 min bei RT in Coomassie-Lösung geschüttelt und anschließend ca. 1 h durch häufiges Wechseln von Entfärbelösung entfärbt. Dabei bleibt die Bindung des Farbstoffes an den Proteinen erhalten, während der übrige Farbstoff aus dem Gel gewaschen wird.

Coomassie-Färbelösung		Entfärbelösung	
Coomassie Brilliant Blue R 250	0,15 %	Methanol	30 %
Methanol	45,5 %	Essigsäure _{konz.}	10 %
Essigsäure _{konz.}	9 %		

Der Coomassie Farbstoff (Sigma) wurde in Methanol gelöst und mit Wasser und Essigsäure gerührt. Färbe- und Entfärbelösung wurden bei RT lichtgeschützt aufbewahrt.

2.5.6.2 Ponceau S-Färbung

Die Ponceau S-Färbung eignet sich besonders gut zur raschen, unspezifischen Anfärbung von Westernblots und lässt sich durch Waschen mit Wasser und TBST wieder vollständig revidieren. So kann die Proteinmenge auf einem Westernblot vor der Immundetektion (s.2.5.5) überprüft werden. Die Nachweisgrenze der Ponceau S-Färbung liegt bei ca. 200 ng.

Der mit Methanol befeuchtete Westernblot wurde mit Wasser 2 min gewaschen, 2 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden gut zu erkennen waren.

Ponceau S-Lösung

Trichloressigsäure	3,0 %
Ponceau S	0,2 %

Die Ponceau S-Lösung wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

2.5.7 Autoradiogramm

Eine weitere Möglichkeit Proteine nach Auftrennung über SDS-PAGE und Transfer auf eine PVDF-Membran zu detektieren ist das Autoradiogramm. Hier können radioaktiv markierte Substanzen durch Schwärzung eines Films oder auf einer Phosphoimagerplatte sichtbar gemacht werden.

Nach Phosphorylierung der Proteine mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, SDS-PAGE und Elektroblot wurde die getrocknete Membran an 4 Stellen mit radioaktiver Tinte markiert, in Folie eingepackt und über Nacht eine Phosphoimagerplatte (Super Sensitive, Packard) aufgelegt. Die Platte wurde dann mit einem Phosphoimager der Firma Raytest ausgewertet, das Autoradiogramm auf eine Folie gedruckt und die radioaktiven Markierungspunkte mit dem Blot zur Deckung gebracht. Nach Immundetektion (s.2.5.5) konnte auf diese Weise der Einbau von radioaktivem Phosphat in Substrate der cGMP-Kinase gezeigt werden.

2.6 Spezielle Methoden zur Charakterisierung von Proteinen

2.6.1 Membranpräparation aus Rindertrachealmuskel

Um membrangebundene Proteine wie PLB, IRAG und den IP₃-Rezeptor anzureichern, kann durch Differenzialzentrifugation die sogenannte Mikrosomenfraktion (MiP) von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Die hier beschriebene Methode kann im entsprechenden Maßstab zur Isolierung der Mikrosomenfraktion aus allen Geweben oder aus Zelllysaten angewendet werden.

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, um proteolytischen Abbau zu vermeiden. Aus 5 frisch geschlachteten Rindern wurde die glatte Muskelschicht der Trachea präpariert, zerkleinert und in Puffer A aufgenommen. Das Gewebe wurde 2 x mit 250 ml Puffer A und 3 x mit 250 ml Puffer B gewaschen, gewogen und in 4 ml Puffer B pro Gramm Gewebe in einem Mixer (Waring Blender) homogenisiert. Diese Masse wurde portionsweise durch zwei Lagen Mull filtriert und das Filtrat einer ersten Zentrifugation (20 min, 4°C, 16 000 x g) unterzogen. Der vorgereinigte Überstand wurde erneut durch Mull filtriert und aus dem Filtrat durch Ultrazentrifugation (60 min, 4°C, 130 000 x g) das mikrosomale Pellet gewonnen. Die Mikrosomenfraktion wurde mit einem Teflon Potter in ca. 3 ml Puffer B pro Pellet homogenisiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Puffer A

MOPS/Tris, pH 7,4	5 mM
NaCl	155 mM
KCl	2,7 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucose	1 g/l

Proteaseinhibitoren

Benzamidin	1 mM
Leupeptin	0,5 µg/µl
PMSF	0,3 mM
EDTA	5 mM

Puffer B

MOPS/Tris pH 7,4	20 mM
Saccharose	80 g/l

Die Puffer wurden bei 4°C aufbewahrt, Zucker und Proteaseinhibitoren wurden immer frisch zugesetzt.

2.6.2 Co-Immunpräzipitation

Die stabile Interaktion eines Proteinkomplexes kann durch Co-Immunpräzipitation dieser Proteine gezeigt werden. Man macht sich hier die hohe, aber unspezifische Affinität von Protein A, einem Zellwandbaustein der Gattung *Staphylococcus*, oder Protein G, einem Zellwandbaustein der Gattung *Streptococcus*, zur Fc Domäne von Antikörpern zunutze. An Sepharosematrix gekoppeltes Protein A/G bindet an einen Antikörper, dieser bindet spezifisch sein Antigen und alle an das Antigen assoziierten Proteine, deren Affinität bei den gewählten Pufferbedingungen erhalten bleibt. Membranproteine wie der IP₃-Rezeptor, IRAG und PLB werden durch Inkubation mit einem Detergens solubilisiert, um sie für die Bindung an den Antikörper zugänglich zu machen. Nach Elution von der Säule kann der gereinigte Proteinkomplex über SDS-PAGE aufgetrennt und charakterisiert werden.

AK Bindung an Protein A/G-Sepharose (Sigma)

Die Protein A/G-Sepharose wurde 3 x mit 500 µl Lubrolpuffer equilibriert, 1:1 mit dem Puffer versetzt, 30 µl pro Ansatz abgenommen und mit Antikörperlösung in 400 µl Lubrolpuffer 1 h bei 4°C rotiert. Die gekoppelte Sepharose wurde 2 x mit 500 µl Lubrolpuffer gewaschen. Die anti-Calponin und anti-Rho A Antikörper wurden an Protein G-Sepharose gekoppelt, alle anderen verwendeten Antikörper an Protein A-Sepharose.

Solubilisierung

500 µg Proteinlösung (Zelllysate, s.2.4.2/MiP aus Rindertrachea, s.2.6.1) wurde mit Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) auf 50 µl aufgefüllt, mit 200 µl 2 % Lubrol versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde der Ansatz alle 5 min geschüttelt. Anschließend wurden nicht gelöste Bestandteile abzentrifugiert (10 min, 4°C, 11 000 x g) und der Überstand zur Präzipitation eingesetzt.

Präzipitation (Batchverfahren)

Die solubilisierten Proteine wurden mit 800 µl Lubrolpuffer versetzt, zur gekoppelten Protein-Sepharose gegeben und 2 h bei 4°C rotiert. Nach der Inkubation wurde 3 x mit 500 µl Lubrolpuffer gewaschen und nach vollständigem Entfernen des Überstandes mit 1 x Probenpuffer

(s.2.5.2) eluiert oder ein Phosphorylierungsmix (s.2.6.5) zugegeben. Der gereinigte Komplex wurde über SDS-PAGE aufgetrennt (s.2.5.2).

2 % Lubrol

Polyoxyethylen-23 Laurylether (= Lubrol PX = Brij 35, Sigma) wurde zu 2 % in Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Vor der Solubilisierung wurde die Lösung frisch mit Proteaseinhibitoren versetzt.

Lubrolpuffer		Proteaseinhibitoren	
Tris/HCl pH 8,0	20 mM	Benzamidin	1 mM
NaCl	80 mM	Leupeptin	0,5 µg/µl
Lubrol PX	0,1 %	PMSF	0,3 mM
		EDTA	2 mM

Der Lubrolpuffer wurde immer frisch aus Stammlösungen hergestellt und immer frisch mit Proteaseinhibitoren versetzt. Bei anschließender Phosphorylierung des Komplexes wurde nach der Präzipitation ohne EDTA gewaschen.

2.6.3 Affinitätsreinigung über cGMP-Agarose

Der an cGMP-Kinase assoziierte Komplex kann auch über eine mit cGMP gekoppelte Agarose-Matrix aufgereinigt werden. Die cGMP-Agarose der Firma BioLog bindet hochaffin an cGMP-Kinase und erlaubt eine sehr saubere Reinigung komplexgebundener Proteine ohne Verunreinigung durch Antikörper wie bei der Co-Immunpräzipitation. Allerdings ist die Spezifität einer Antikörperfällung hier nicht gegeben.

Die Affinitätsreinigung wurde wie die Co-Immunpräzipitation (s.2.6.2) durchgeführt. Zur Präzipitation wurden direkt 30 µl equilibrierte cGMP-Agarose (1:1 mit Lubrolpuffer) eingesetzt.

2.6.4 Vorreinigung über cGMP-Agarose und anschließende Immunpräzipitation

Die beschriebene Methode zur Reinigung über cGMP-Agarose kann auch als Vorreinigung von cGMP-Kinase assoziierten Proteinen dienen. Die Elution kann mit spezifischen oder unspezifischen Agenzien erfolgen. Eluiert man cGMP-Agarose mit 1 x Probenpuffer (s.2.5.2),

so werden alle gebundenen Proteine durch die hohe Konzentration an SDS vollständig denaturiert und eine weitere Bindung, zum Beispiel an einen Antikörper, ist unmöglich. Zur weiteren Aufreinigung des in dieser Arbeit untersuchten Komplexes wurde daher mit ca. 200fachem Überschuss an cGMP eluiert. Zur anschließenden Immunpräzipitation wurde das cGMP durch Dialyse wieder abgetrennt.

Durchführung:

Zur Vorreinigung wurden 2,5 mg mikrosomaler Membranen (s.2.6.1) mit 30 µl cGMP-Agarose inkubiert (s.2.6.3) und nach der Bindung an die Säule, der in 2.6.5 beschriebene Phosphorylierungs-Assay durchgeführt. Die Reaktion wurde mit EDTA in einer finalen Konzentration von 5 mM gestoppt, das Agarosepellet 2 x mit Lubrolpuffer gewaschen und mit 2 ml Elutionspuffer pro Pellet 1 h bei RT eluiert. Um das cGMP nach der Elution abzutrennen, wurde gegen Lubrolpuffer in 100fachem Volumen dialysiert (2 h, 12 h, 2 h, bei 4°C) und das Dialysat anschließend zur Immunpräzipitation (s.2.6.2) eingesetzt. Nach der Bindung an die mit Antikörper gekoppelte Protein A/G-Sepharose konnte der gereinigte Komplex direkt mit 1 x Probenpuffer (s.2.5.2) eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Elutionspuffer

Tris/HCl pH 8,0	20 mM
cGMP-Na	20 mM
NaCl	60 mM
Lubrol PX	0,1 %

Der Elutionspuffer wurde frisch aus Stammlösungen hergestellt und mit Proteaseinhibitoren (s.2.6.1) versetzt.

2.6.5 *In vitro* Phosphorylierung

cGMP-Kinase katalysiert nach Aktivierung durch cGMP die Übertragung der endständigen γ -Phosphatgruppe von ATP auf Substratproteine. So können Substrate über den cGMP-abhängigen Einbau von radioaktivem Phosphat identifiziert werden. Da die cGMP-Kinase auch nach Aufreinigung durch Co-Immunpräzipitation oder cGMP-Agarose noch biologisch aktiv ist, können assoziierte Proteine anschließend an der Matrix phosphoryliert werden.

Es wurden 30 µg Proteinlösung oder das Pellet nach Immunpräzipitation oder Affinitätsreinigung eingesetzt und auf Eis mit folgendem Reaktionsansatz versetzt:

Proteinlösung		Sepharose-Pellet	
5 x Mes	4 µl	5 x Mes	4 µl
DTT 100 mM	2 µl	Lubrol PX 2%	1 µl
PI	1 µl	PI	1 µl
H ₂ O	ad 16 µl	H ₂ O	10 µl

Die weiteren Schritte wurden im Isotopenbereich durchgeführt.

Der Ansatz wurde mit 2 µl 8-pCPT-cGMP (30 µM, BioLog) *oder* 2 µl H₂O versetzt, 2 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (1 mM, >1500 cpm/pmol) zugegeben und sofort 2 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 µl 4 x Probenpuffer (s.2.5.2) gestoppt, 3 min bei 95°C gekocht, über SDS-PAGE (s.2.5.2) aufgetrennt und in einem Autoradiogramm (s.2.5.7) detektiert.

5 x Mes		PI = Proteaseinhibitoren	
Mes, pH 6,9	250 mM	PMSF (200 mM in Ethanol)	1 µl
EGTA	2 mM	Benzamidin (1 M in H ₂ O)	1 µl
MgAc	5 mM	Leupeptin (2 mg/ml in Ethanol)	1 µl
NaCl	50 mM	H ₂ O	47 µl

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-Lösung (1 mM, >1500 cpm/pmol)

Die ATP-Lösung wurde aus 100 mM Na-ATP (Sigma) hergestellt, bei -20°C gelagert und vor Bedarf 1:50 verdünnt. Diese 2 mM ATP-Lösung wurde mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham) versetzt und mit Wasser zu einer 1 mM Lösung verdünnt. Die Menge $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP ist von der Aktivität abhängig, bei 10 µCi/µl (5000 Ci/mmol) wurde 1:10 verdünnt. Zur Überprüfung der fertigen Lösung wurde die Aktivität von 1 µl in einem Szintillationszähler (TriCarb 2100, Packard) durch Cerenkov Messung bestimmt.

2.6.6 MALDI-TOF-Analyse

Die MALDI-Analyse (matrix-assisted laser desorption ionization) ist eine massenspektrometrische Methode, um Proteine und Peptide zu identifizieren. Die Proteine können direkt aus einem gefärbten Polyacrylamidgel entnommen werden. Bei dieser Methode wird die Probe enzymatisch verdaut, die entstandenen Peptide ionisiert, die Ionen beschleunigt und detektiert. In einem MALDI-Spektrometer werden die Peptide mit einer organischen Säure gemischt und auf einem Metall-Target getrocknet. Dort werden sie von einem Laser ionisiert, durchlaufen eine Röhre und treffen am Detektor auf. Die Flugzeit der einzelnen Peptide (TOF = „time of flight“) ist umgekehrt proportional zu ihrer Masse und direkt proportional zu ihrer Ladung. Bei dem tryptischen Verdau eines Proteins entstehen Peptide bestimmter Massen, aus denen ein charakteristisches MALDI-Spektrum, der sogenannte „peptide mass fingerprint“ ermittelt wird. Durch Datenbankvergleich können so isolierte Proteine identifiziert werden.

Die MALDI-Analysen wurden in der Protein & Peptide Group am EMBL in Heidelberg von Keith Ashman durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des mikrosomalen Komplexes aus IP₃-Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I

Schon in den siebziger Jahren wurde die Phosphorylierung von Membranproteinen der glatten Muskelschicht nach Stimulation mit cGMP beschrieben und für die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich gemacht (Casnellie and Greengard, 1974). Es folgten weitere Arbeiten zur Aufreinigung dieser Phosphoproteine und Sarcevic et al. identifizierten Phospholamban als eines der cGMP-Kinase Substrate in der Mikrosomenfraktion der Aorta (Sarcevic et al., 1989). Im Jahr 2000 wurde schließlich ein stabiler Komplex aus den Substraten IP₃-Rezeptor Typ I und IRAG und der cGMP-Kinase I gereinigt (Schlossmann et al., 2000). Nach Co-Immunpräzipitation mit anti-cGMP-Kinase I und anti-IP₃-Rezeptor Typ I Antikörpern, postulierten Schlossmann et al. die Assoziation von zwei weiteren Substraten G3 und G4.

Um diese und andere an die cGMP-Kinase I gebundenen Proteine zu identifizieren, wurde der Komplex mit cGMP-Agarose aus Membranen des glatten Muskels der Rindertrachea isoliert. Nach der Reinigung über die Säule, wurde das Eluat in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, mit Coomassie-Blau angefärbt und die Banden ausgeschnitten. Durch anschließende MALDI-TOF-Analyse konnten die assoziierten Proteine identifiziert werden. Die Affinitätsreinigung über cGMP-Agarose erlaubt die Reinigung großer Proteinmengen und vermeidet die Kontamination mit den schweren und leichten Ketten eines Antikörpers. Im Gegensatz zur Co-Immunpräzipitation hat diese Methode allerdings den Nachteil, nicht so spezifisch zu sein. Die Säule bindet alle Proteine, die eine cGMP-Bindungsstelle besitzen und mit ihnen noch weitere Interaktionspartner. Daher müssen alle auf diese Weise identifizierten Komplexbestandteile durch wechselseitige Co-Immunpräzipitation des Komplexes bestätigt werden.

3.1.1 Reinigung und Identifizierung assoziierter Proteine

Die erneute Aufreinigung des Komplexes und die Identifizierung der putativen Substrate G3 (65 kD) und G4 (30 kD) ergab, dass es sich hierbei um Abbauprodukte von IRAG handelte.

Durch den Zusatz von 5 mM EDTA zu jedem Schritt der Aufreinigung und das Erhöhen der Konzentration der Proteaseinhibitoren (s.2.6.1), konnte dieser Abbau fast vollständig vermieden werden. Abb. 3–1 zeigt ein Autoradiogramm und eine Coomassie-Färbung des Komplexes nach Auftrennung durch SDS- und Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Verwendung von zwei Gel-Systemen erlaubt die Charakterisierung des Komplexes von 250 bis 5 kD. Im Autoradiogramm wird deutlich, dass die Anzahl der assoziierten Substratproteine im Größenbereich von 250-30 kD auf nur drei Banden reduziert werden kann. Diese ließen sich durch einen Immunoblot als IP₃-Rezeptor Typ I (240 kD), IRAG (130 kD) und cGMP-Kinase I (73 kD) identifizieren. Die Färbung mit Coomassie-Blau zeigt jedoch noch weitere Proteine der Größe 190 kD, 50 kD, 43 kD und 35 kD. Durch Datenbankvergleich des MALDI-Spektrums konnten diese als Bestandteile des Zytoskeletts und als die regulatorische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase identifiziert werden (Tabelle 3–1). Die Auftrennung der kleineren Proteine (30-5 kD) ergab die Assoziation zweier Phosphoproteine, die aber nicht durch Coomassie-Blau gefärbt werden können. Damit war auch eine Mengenabschätzung und ihre Identifizierung mit MALDI-TOF nicht möglich. Durch Westernblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern konnten diese Proteine als Phospholamban (5 kD) und die kleine GTPase Rho A (21 kD) identifiziert werden. Zudem ist eine nicht oder wenig phosphorylierte Bande bei 17 kD nach der Färbung des Komplexes zu sehen, die mit der Nucleosid-Diphosphat-Kinase B (NDKB) identisch ist. Nach Co-Immunpräzipitation mit anti-cGMP-Kinase I Antikörper stellte sich heraus, dass die Untereinheit der cAMP-Kinase und die NDKB nicht mit cGMP-Kinase I assoziiert sind, sondern mit dem zyklischen Nucleotid der Säule interagieren (nicht dargestellt). Phospholamban, Rho A, α -Aktin und Calponin H1 wurden auch nach Reinigung mit anti-cGMP-Kinase Antikörper detektiert. Die Assoziation von Rho A wurde nicht weiter untersucht, da der Rho A spezifische Antikörper den Komplex nicht präzipitiert und der an den Komplex assoziierte Anteil des Proteins sehr gering ist.

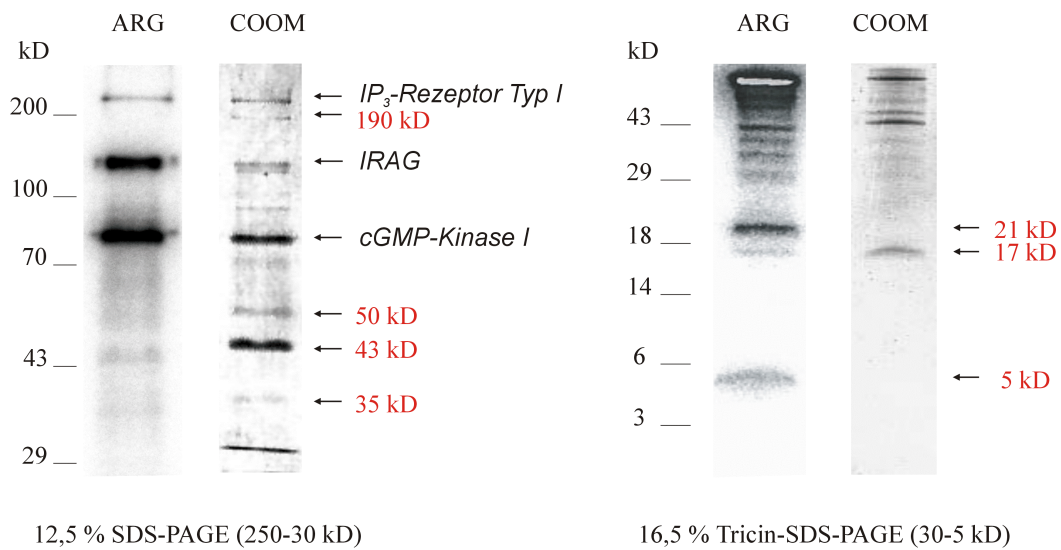


Abb. 3–1: Autoradiogramm und Coomassiefärbung des mit cGMP-Agarose gereinigten Komplexes

Mikrosomales Pellet aus Rindertrachea wurde mit cGMP-Agarose aufgereinigt, phosphoryliert und über SDS-PAGE (12,5 %) und Tricin-SDS-PAGE (16,5 %) aufgetrennt. Die linke Spur zeigt jeweils das Autoradiogramm (ARG), die rechte Spur die Coomassie-Färbung des Komplexes (COOM).

190 kD	Myosin, schwere Kette	MALDI
50 kD	cAMP-Kinase R I α	MALDI
43 kD	α -Aktin des glatten Muskels	MALDI
35 kD	Calponin H1 des glatten Muskels	MALDI
21 kD	Rho A	Westernblot
17 kD	NDKB	MALDI
5 kD	Phospholamban	Westernblot

Tabelle 3–1: Identifizierung der komplexassoziierten Proteine

Die Tabelle zeigt die weiteren, assoziierten Proteine, deren Molekulargewicht und die Methode ihrer Identifizierung. Durch MALDI-Analyse wurden Myosin, cAMP-Kinase, α -Aktin, Calponin H1 und NDKB identifiziert, durch Westernblot Rho A und Phospholamban.

3.1.2 Verbindung des Komplexes mit dem Zytoskelett

Die Interaktion des Komplexes mit den zytoskelettalen Proteinen α -Aktin und Calponin H1 konnte aus folgendem Grund nicht wechselseitig durch direkte Co-Immunpräzipitation überprüft werden. Präzipitiert man α -Aktin oder Calponin H1 aus den mikrosomalen Membranen mit spezifischen Antikörpern, so sind viele an das Zytoskelett assoziierte Proteine angeheftet

und es kann keine Aussage über eine echte Interaktion getroffen werden. Der Komplex wurde deshalb über cGMP-Agarose vorgereinigt, phosphoryliert, mit cGMP eluiert und das Eluat anschließend mit anti- α -Aktin und anti-Calponin H1 Antikörpern präzipitiert (s.2.6.4). Zur Kontrolle wurde eine Co-Immünpräzipitation des Eluats mit Antikörpern gegen IP₃-Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde mit Prä-Immunsersum und anti-Nucleosid-Diphosphat-Kinase B (NDKB) Antikörper gefällt.

In Abb. 3-2 ist ein Autoradiogramm der Co-Immünpräzipitationen mit den spezifischen Antikörpern dargestellt. Die Abb. 3-2 zeigt, dass der Komplex der Substratproteine der cGMP-Kinase I auch nach Fällung mit anti- α -Aktin und anti-Calponin H1 Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Führt man den gleichen Versuch mit Prä-Immunsersum oder einem weiteren unspezifischen Antikörper (NDKB) durch, so wird keines der Substratproteine präzipitiert. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Assoziation der zytoskelettalen Proteine α -Aktin und Calponin H1 um eine echte Interaktion und keine Verunreinigung handelt und diese zur Stabilisierung des Komplexes beitragen können.

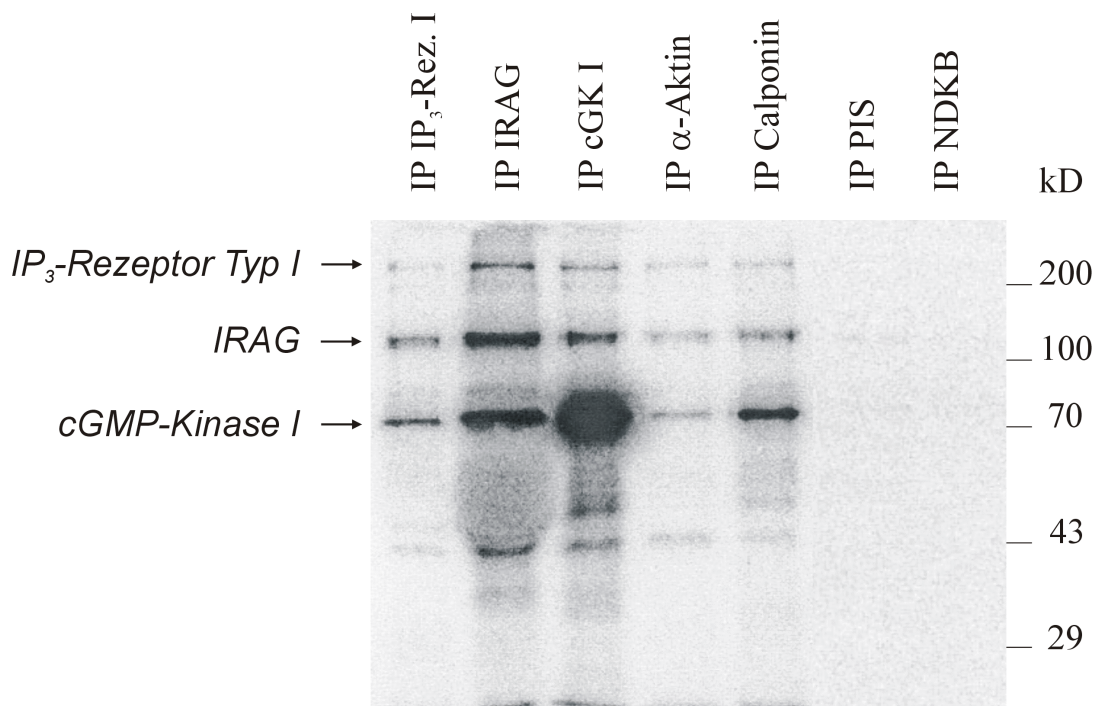


Abb. 3-2: Co-Immünpräzipitation von IP₃-Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I mit anti- α -Aktin und anti-Calponin H1 Antikörper nach Vorreinigung über cGMP-Agarose

2,5 mg Mikrosomales Pellet aus Rindertrachea wurden mit cGMP-Agarose gereinigt, mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP phosphoryliert, mit cGMP von der Säule eluiert und nach Dialyse mit den spezifischen Antikörpern co-immünpräzipitiert (IP). Gezeigt ist das Autoradiogramm nach Auftrennung des Komplexes über SDS-PAGE (12,5 %). Als Kontrolle wurde mit Prä-Immunsersum (PIS) eines Kaninchens präzipitiert.

3.2 Interaktion von Phospholamban mit cGMP-Kinase I im glatten Muskel

In 3.1.1 konnte gezeigt werden, dass Phospholamban an den Komplex aus IP₃-Rezeptor, IRAG und der cGMP-Kinase I assoziiert ist. Phospholamban ist schon lange als Substrat der cGMP-Kinase bekannt, jedoch wird der Einfluss des NO/cGMP/cGMP-Kinase Signalwegs auf die Funktion von Phospholamban im glatten Muskel kontrovers diskutiert. Daher sollte im folgenden die Interaktion von cGMP-Kinase I und Phospholamban und seine Phosphorylierung durch die Kinase genauer untersucht werden.

3.2.1 cGMP-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban

Die Phosphorylierung von Phospholamban durch cGMP-Kinase ist *in vitro* in kardialem Gewebe und in Membranen der glatten Muskulatur bereits untersucht worden. Membranvesikel wurden dazu mit exogener cGMP-Kinase oder cGMP erhöhenden Substanzen versetzt und phosphoryliertes Phospholamban nachgewiesen.

Um einen spezifischen, cGMP-abhängigen Effekt der endogenen Kinase im glatten Muskel zu zeigen, wurden in dieser Arbeit mikrosomale Membranen mit und ohne Zusatz von cGMP phosphoryliert. In Abb. 3-3 ist die Phosphorylierung der Mikrosomenfraktion aus dem glatten Muskel der Trachea von Rindern dargestellt. Die isolierten Membranen wurden nach Zugabe von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP zwei Minuten mit und ohne das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP phosphoryliert und nach Abstoppen der Reaktion in einem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Autoradiogramm sieht man, dass Phospholamban nur nach Zugabe von cGMP phosphoryliert ist. Die Detektion mit anti-Phospholamban Antikörper zeigt ein Signal auf gleicher Höhe und den Einsatz gleicher Proteinmengen.

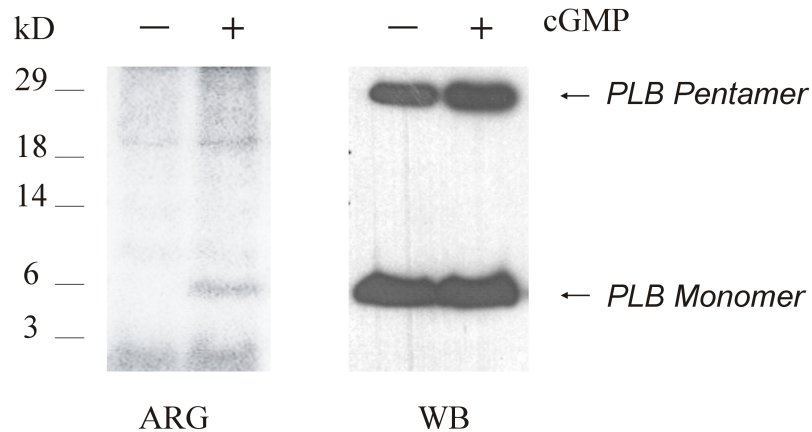


Abb. 3-3: cGMP-abhängige Phosphorylierung von PLB

30 µg Mikrosomale Membranen aus Rindertrachea wurden mit (+) und ohne (-) 8-pCPT-cGMP 2 min bei 30°C phosphoryliert und über Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm (ARG) und die Immundetektion (WB) des identischen Blots mit anti-PLB Antikörper.

3.2.2 Co-Immunpräzipitation von Phospholamban und cGMP-Kinase I

Durch gemeinsame Präzipitation mit einem spezifischen Antikörper kann die stabile Interaktion von Phospholamban und cGMP-Kinase I untersucht und die unspezifische Bindung an cGMP-Agarose ausgeschlossen werden. Membranproteine wie Phospholamban müssen dazu erst durch Solubilisation aus dem Verband der Doppellipidmembran gelöst und mit einem Detergens in Lösung gehalten werden. Die Wahl des Detergens muss so erfolgen, dass genügend Membranprotein frei zur Präzipitation zur Verfügung steht, aber die Assoziation der Interaktionspartner bestehen bleibt. Zur Auflösung der Membranstruktur wurde 2 % Lubrol eingesetzt und 0,1 % Lubrol, um das Protein anschließend in Lösung zu halten.

Unter diesen Bedingungen wurde nun die Interaktion von Phospholamban mit cGMP-Kinase I untersucht. Die mikrosomalen Membranen wurden dazu mit anti-cGMP-Kinase I Antikörper präzipitiert, anschließend durch Zusatz von 8-pCPT-cGMP phosphoryliert und in einem Tricin-SDS-Gel aufgetrennt. Im Autoradiogramm und nach Detektion mit anti-Phospholamban Antikörper ist zu sehen, dass eine stabile Interaktion von Phospholamban mit cGMP-Kinase I besteht (Abb. 3-4). Allerdings ist unter diesen Bedingungen nur ein Teil des im glatten Muskel exprimierten Phospholambans (Abb. 3-3) an cGMP-Kinase assoziiert.

Über die Verteilung von Mono- und Pentamer in der Immunpräzipitation kann keine Aussage getroffen werden, da die leichten Ketten des Antikörpers (25 kD) die Immundetektion stören.

Die gemeinsame Präzipitation von Phospholamban und cGMP-Kinase stellt zudem einen Reinigungsschritt dar, durch den bestätigt werden konnte, dass es sich bei dem phosphorylierten 5 kD Protein um Phospholamban handelt. Das Signal im Autoradiogramm der Abb. 3–4 ist deckungsgleich mit dem Signal des Immunoblots.

Zur Kontrolle der Reaktionsbedingungen für eine wechselseitige Co-Immunpräzipitation wurde Phospholamban aus mikrosomalen Membranen mit anti-Phospholamban Antikörper präzipitiert. In der linken Spur der Abb. 3–4 ist gezeigt, dass der hier verwendete anti-Phospholamban Antikörper zur Immunpräzipitation geeignet ist.

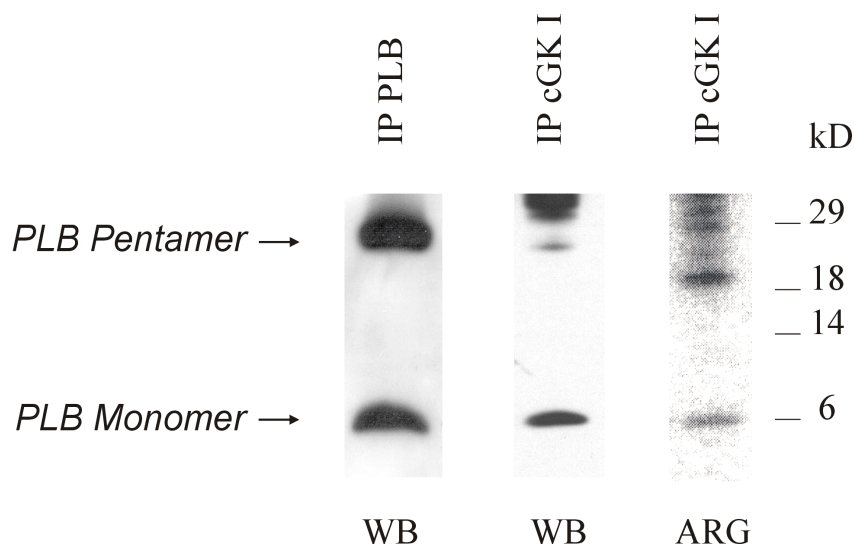


Abb. 3–4: Co-Immunpräzipitation von PLB mit anti-PLB und anti-cGK I Antikörper

Die linke Spur zeigt eine Fällung von PLB aus 500 µg mikrosomalen Membranen mit anti-PLB Antikörper (IP PLB). Rechts ist die Co-Immunpräzipitation von PLB aus 2,5 mg mikrosomaler Membranen mit anti-cGK I Antikörper (IP cGK I) im Westernblot (WB) und Autoradiogramm (ARG) nach Auftrennung über Tricin-SDS-PAGE dargestellt. Die Westernblots wurden mit anti-PLB Antikörper detektiert.

3.2.3 Assoziation weiterer Substrate der cGMP-Kinase I

Da Phospholamban mit cGMP-Agarose (s.3.1.1) und anti-cGMP-Kinase Antikörper (s.3.2.2) präzipitiert wird, sollte auch cGMP-Kinase mit anti-Phospholamban Antikörper gefällt werden können. Die wechselseitige Co-Immunpräzipitation bestätigte nicht nur die Assoziation von cGMP-Kinase I und Phospholamban, sondern auch der weiteren in 3.1.1 beschriebenen Substrate. Nach Phosphorylierung der Substrate und anschließender Immundetektion mit spezifischen Antikörpern konnte die Interaktion von IP₃-Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I mit Phospholamban gezeigt werden. Zum Vergleich wurde der Komplex mit anti-cGMP-Kinase I Antikörper gereinigt. Die Auswertung der Westernblots ist nur qualitativ zu betrachten, da verschiedene Detektionsmethoden angewendet wurden und die Titer der verschiedenen Antikörper nicht vergleichbar sind.

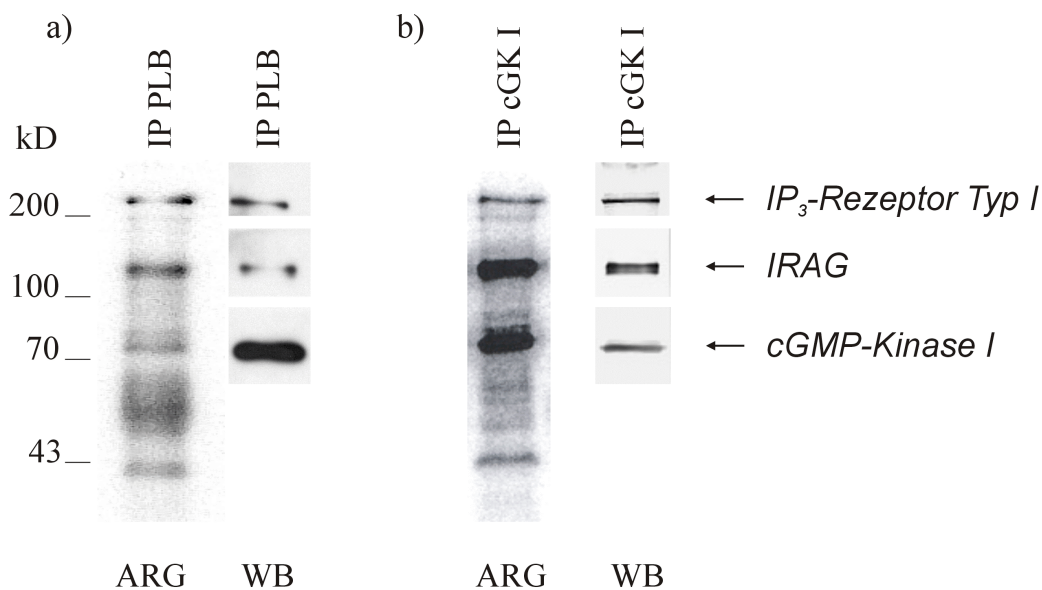


Abb. 3-5: Autoradiogramm und Westernblot der Co-Immunpräzipitationen mit anti-PLB und anti-cGK I Antikörper

a) Co-Immunpräzipitation von cGK I, IRAG und IP₃-Rez. Typ I mit anti-PLB Antikörper. Autoradiogramm (ARG) und Westernblot (WB, Detektion mit Meerrettich-Peroxidase).

b) Co-Immunpräzipitation von cGK I, IRAG und IP₃-Rez. Typ I mit anti-cGK I Antikörper. Autoradiogramm (ARG) und Westernblot (WB, Detektion mit alkalischer Phosphatase). Es wurden jeweils 2,5 mg mikrosomaler Membranen eingesetzt und durch 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt.

3.3 Interaktion von rekombinantem Phospholamban mit cGMP-Kinase I in COS 7 Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass im glatten Muskel aus Rindertrachea ein stabiler Komplex von Phospholamban, cGMP-Kinase I und zwei weiteren Substraten der Kinase besteht, sollte diese Assoziation durch heterologe Expression in COS 7 Zellen unabhängig von anderen Proteinen der glatten Muskulatur untersucht werden.

3.3.1 Klonierung von Phospholamban

Zur Expression in COS 7 Zellen wurde Phospholamban aus dem Herz einer Maus des Stammes C57/BL 6 kloniert. Aus cDNA, die alle im Herzen der Maus exprimierten Gene repräsentiert, konnte der gewünschte Genabschnitt über PCR amplifiziert werden. Die für das 5 kD große Protein codierende cDNA ist 159 bp groß und wurde über die Restriktionsschnittstellen *Eco RI/Bam HI* in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(-) kloniert. Vor das „Start-ATG“ wurde eine *Kozak*-Sequenz eingefügt, um die Initiation der Transkription an diesem ATG zu gewährleisten. Die *Kozak*-Sequenz stellt eine ideale eukaryontische Ribosomenbindungsstelle dar (Kozak, 1991) und verbessert dadurch die Proteinexpression in COS 7 Zellen. Die erhaltene Sequenz (Abb. 3–6) von Phospholamban entsprach der von Ganim 1992 (Ganim et al., 1992) veröffentlichten Sequenz der Maus.

```

1      ATGGAAAAAGTGCAATACCTCACTCGCTCGGCTATCAGGAGAGCCTCCACTATTGAAATG
1      M E K V Q Y L T R S A I R R A S T I E M

61     CCTCAGCAAGCACGTCAGAATCTCCAGAACCTATTTATCAATTTCTGCCTCATCTTGATA
21     P Q Q A R Q N L Q N L F I N F C L I L I

121    TGTCTGCTGCTGATCTGCATCATTGTGATGCTTCTGTGA
41     C L L L I C I I V M L L *

```

Abb. 3–6: Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Phospholamban aus dem Herz der Maus

Die Sequenz von PLB besteht aus 159 Basenpaaren, die für 52 Aminosäuren kodieren. Der zytosolische Bereich ist nicht unterstrichen (AS 1-30), die Transmembran-Domäne (AS 31-52) ist durch Unterstreichen gekennzeichnet. Die Phosphorylierungsstellen Ser¹⁰, Ser¹⁶ und Thr¹⁷ sind rot markiert.

3.3.2 Co-Expression von Phospholamban und cGMP-Kinase I in COS 7 Zellen

Phospholamban wurde mit cGMP-Kinase I α oder β in COS 7 Zellen heterolog exprimiert und die Anwesenheit der Proteine in einem Westernblot mit spezifischen Antikörpern überprüft (Abb. 3–7). Phospholamban kommt überwiegend als 25 kD großes Pentamer endogen in COS 7 Zellen vor. Trotz Denaturierung durch Aufkochen und den Zusatz von DTT war das Pentamer im Vergleich zu dem 5 kD großen Monomer immer im Überschuss vorhanden. Nach Überexpression von Phospholamban erhöhte sich der Anteil an Monomer und konnte im Westernblot detektiert werden. Allerdings ist die Detektierbarkeit eines so kleinen Proteins durch viele Faktoren begrenzt, was eine quantitative Beurteilung der Expression kaum möglich macht. Kleine Proteine lassen sich schlecht ohne Verlust auf eine Membran transferieren und sind auch in einem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel nicht immer auf eine scharfe Bande fokussiert. Abb. 3–7 zeigt die Expression von Phospholamban und von den beiden Isoformen α und β der cGMP-Kinase I in COS 7 Zellen.

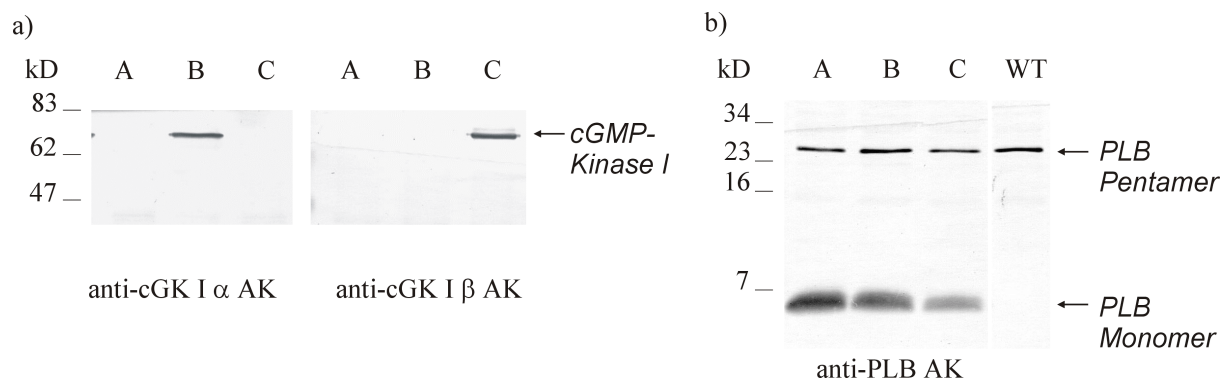


Abb. 3–7: Expression von PLB mit und ohne cGK I α oder cGK I β in COS 7 Zellen

COS 7 Zellen wurden mit A: PLB B: cGK I α + PLB C: cGK I β + PLB transfiziert und 20 μ g Lysat über a) SDS-PAGE (11 %) und b) Tricin-SDS-PAGE (16,5 %) aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 20 μ g Zelllysate von Wildtyp (WT) Zellen aufgetragen. Der Blot wurde mit anti-PLB, anti-cGK I α und anti-cGK I β Antikörpern (AK) detektiert.

3.3.3 Co-Immunpräzipitation von cGMP-Kinase I und Phospholamban

Die in 3.2.2 gezeigte Interaktion von Phospholamban mit cGMP-Kinase I sollte nun im isolierten System nach heterologer Expression der beiden Proteine untersucht werden. Zellen, die mit Phospholamban und cGMP-Kinase I α oder β transfiziert waren, wurden dazu zur Co-

Immunpräzipitation mit anti-Phospholamban Antikörper eingesetzt. Da die Menge an Ausgangsmaterial im Vergleich zu Gewebe begrenzt ist, wurde das gesamte Zellysate eingesetzt, ohne die zytosolische Fraktion vorher abzutrennen. Im Gesamtzellextrakt ist das membran-gebundene Phospholamban im Verhältnis zur teils zytosolischen und teils membranständigen cGMP-Kinase I nicht angereichert. Es wurden 500 µg Gesamtprotein zur Co-Immunpräzipitation der rekombinanten Proteine mit anti-Phospholamban Antikörper eingesetzt. Nach Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel konnte keine cGMP-Kinase detektiert werden (nicht dargestellt). Dieser Ansatz zeigte keine stabile Interaktion von cGMP-Kinase I mit Phospholamban in COS 7 Zellen und die in 3.2.2 gezeigte Assoziation konnte weder einer Isoform der Kinase zugeordnet, noch im isolierten System bestätigt werden.

3.3.4 Co-Expression von Phospholamban, cGMP-Kinase I , IRAGa und IP₃-Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen

In der Mikrosomenfraktion des glatten Muskels der Rindertrachea herrschen physiologische Bedingungen bezüglich Proteinzusammensetzung und Konzentration. Da in diesem *in vitro* System nicht nur die Interaktion von Phospholamban und cGMP-Kinase gezeigt wurde, sondern auch die Assoziation von weiteren Proteinen (s. 3.2.3), stellte sich die Frage, ob diese zur Stabilisierung des Komplexes beitragen. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden Phospholamban und cGMP-Kinase I α oder β mit und ohne IRAG und IP₃-Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen co-exprimiert. IRAGa wurde dazu über die Restriktionsschnittstellen *Eco RI/Xba I/Bam HI* aus IRAGa-EGFP und der Mutanten S1 (Ammendola et al., 2001) in pcDNA 3.1 kloniert. Die Verwendung des gleichen Vektors (pcDNA 3.1) sollte ein unterschiedliches Expressionsmuster der transfizierten Plasmide vermeiden. Zur Transfektion aller Komponenten haben sich die in Tabelle 2–3 angegebenen DNA-Mengen als geeignet erwiesen. Die Anwesenheit der Proteine wurde in einem Westernblot mit spezifischen Antikörpern überprüft. Abb. 3–8 zeigt die Co-Expression von Phospholamban, cGMP-Kinase I α bzw. β , IRAGa und IP₃-Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen. Nach Immundetektion von IRAGa ist ein starker Abbau des Proteins durch viele Nebenbanden im Westernblot zu sehen.

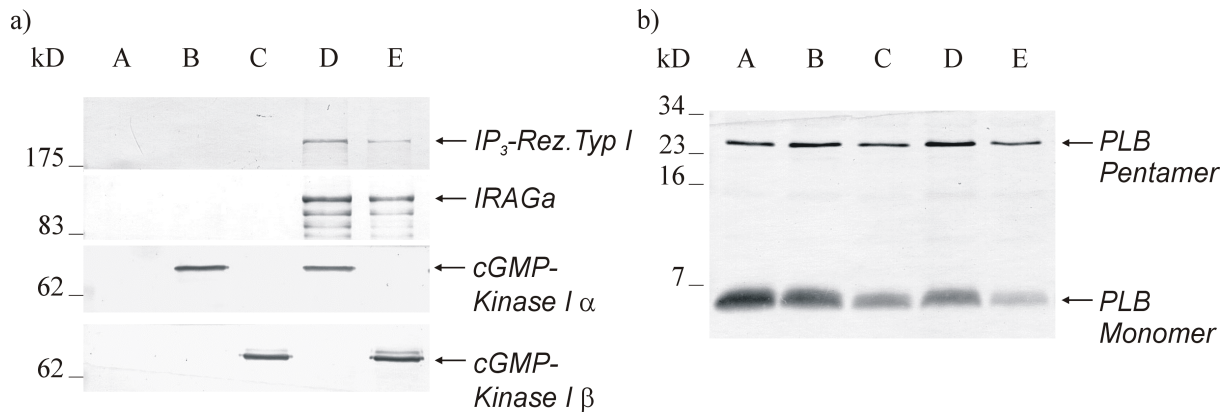


Abb. 3–8: Expression von PLB, cGK I α , cGK I β , IRAG und IP₃-Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen

COS 7 Zellen wurden mit A: PLB B: cGK I α + PLB C: cGK I β + PLB D: IP₃-Rez. Typ I + IRAGa + cGK I α + PLB E: IP₃-Rez. Typ I + IRAGa + cGK I β + PLB transfiziert und 20 μ g Lysat über a) SDS-PAGE (11 %) und b) Tricin-SDS-PAGE (16,5 %) aufgetrennt. Der Blot wurde mit anti-PLB, anti-cGK I α und anti-cGK I β , anti-IRAG und anti-IP₃-Rez. Typ I Antikörpern detektiert.

3.3.5 Co-Immunpräzipitation von Phospholamban, cGMP-Kinase I β , IRAGa und IP₃-Rezeptor Typ I, Vergleich zur Fällung aus Rindertrachealmuskel

In einem initialen Versuch wurde untersucht, ob der von Schlossmann et al. beschriebene Komplex aus cGMP-Kinase I β , IRAGa und IP₃-Rezeptor Typ I in COS 7 Zellen stabil ist und die Co-Expression von Phospholamban einen Einfluss auf diesen Komplex hat. Dazu wurden Zellen, die den Komplex mit und ohne Phospholamban exprimieren, mit anti-cGMP-Kinase I_c Antikörper präzipitiert. Dieser Antikörper ist gegen die konservierte Region der cGMP-Kinase I gerichtet und sollte daher die Interaktionsstelle zwischen IRAG und der Kinase, die im N-Terminus der β -Isoform liegt (Ammendola et al., 2001), nicht beeinflussen. Der Westernblot in Abb. 3–9a zeigt, dass in COS 7 Zellen nur ein sehr geringer Teil IRAGa mit cGMP-Kinase I β assoziiert ist. Der IP₃-Rezeptor konnte nicht detektiert werden, wobei die Co-Expression von Phospholamban keine Rolle spielt.

Weiterhin wurde mit anti-Phospholamban Antikörper immunpräzipitiert. Wie in Abb. 3–9b zu sehen ist, werden cGMP-Kinase I β und IP₃-Rezeptor Typ I mit Phospholamban präzipitiert und bilden eine stabile Interaktion. Der gebundene Anteil an cGMP-Kinase ist zwar im Vergleich zum Ausgangsmaterial und zur Fällung mit anti-cGMP-Kinase I Antikörper sehr gering, allerdings wird dabei auch die zytosolisch lokalisierte cGMP-Kinase I erfasst. Die Co-Immunpräzipitationen der rekombinanten Proteine wurden immer aus dem Gesamtzellextrakt

durchgeführt. Dabei konnte die Interaktion von Phospholamban mit IRAGa in COS 7 Zellen nicht bestätigt werden. Genauso verhielt es sich mit Zellen, die cGMP-Kinase I α anstatt β exprimieren. Hier ergab sich keinerlei Bindung an eines der komplexassoziierten Proteine (nicht dargestellt). Nach gemeinsamer Expression in COS 7 Zellen interagiert Phospholamban also nur mit der β Isoform der cGMP-Kinase I und dem IP₃-Rezeptor, nicht aber mit IRAGa.

Zum Vergleich wurde der beschriebene Komplex mit anti-Phospholamban, anti-cGMP-Kinase I und anti-IRAG Antikörpern aus mikrosomalen Membranen des glatten Muskels aus Rindertrachea präzipitiert. Auch hier interagieren cGMP-Kinase I und der IP₃-Rezeptor Typ I stabil mit Phospholamban, wie Abb. 3–9c zeigt. Die Co-Immunpräzipitation von IRAGa mit Phospholamban ist dabei eher schwach. Aufgrund der extremen Größenunterschiede von IP₃-Rezeptor Typ I (240 kD), cGMP-Kinase I (72 kD) und Phospholamban (5 kD) konnte der gesamte Komplex nicht in einem Gel aufgetrennt und dargestellt werden.

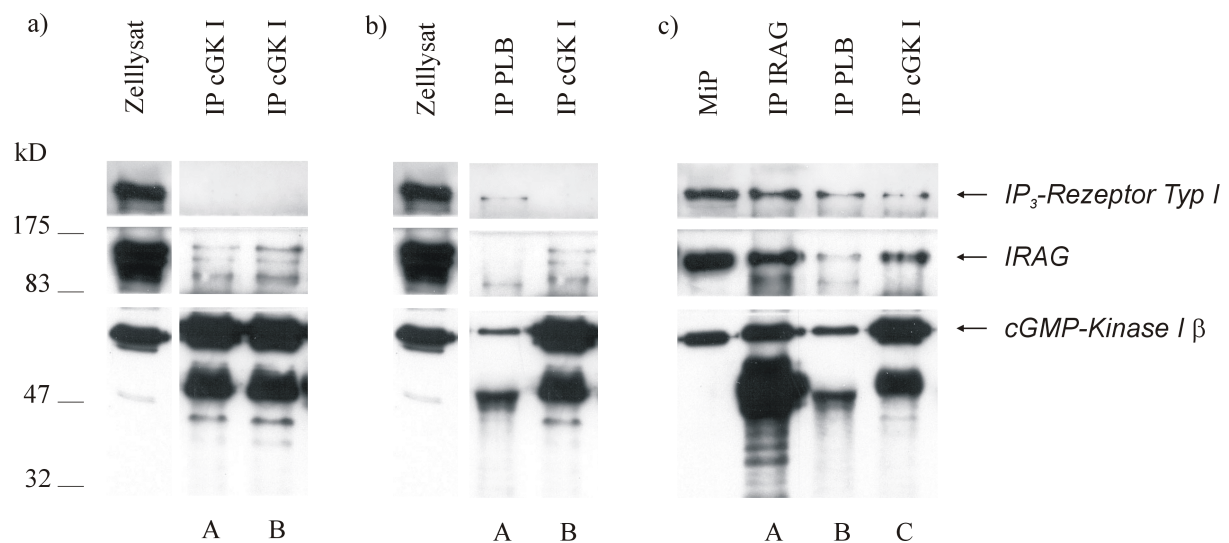


Abb. 3–9: Co-Immunpräzipitation von PLB, cGK I, IRAGa und IP₃-Rezeptor Typ I

a) COS 7 Zellen wurden mit A: IP₃-Rez. Typ I + IRAGa + cGK I β und B: IP₃-Rez. Typ I + IRAGa + cGK I β + PLB transfiziert und je 500 μ g Zelllysate mit cGK I α Antikörper immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden 20 μ g Zelllysate aufgetragen.

b) COS 7 Zellen wurden mit IP₃-Rez. Typ I + IRAGa + cGK I β + PLB transfiziert und je 500 μ g Zelllysate mit A: anti-PLB Antikörper und B: cGK I α Antikörper immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden 20 μ g Zelllysate aufgetragen.

c) 500 μ g Mikrosomales Pellet aus Rindertrachea wurde mit A: anti-IRAG B: anti-PLB und C: cGK I α Antikörper immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden 30 μ g des mikrosomalen Pellets (MiP) aufgetragen.

Die Westernblots wurden mit anti-cGK I α , anti-IRAG und anti-IP₃-Rez. Typ I Antikörpern detektiert.

3.4 Interaktion von Phospholamban und cGMP-Kinase I mit der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums

Eine Erhöhung der cGMP Konzentration in der Zelle führt zur Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums und zur Verminderung des intrazellulären Calciums (Twort and van Breemen, 1988). Die cGMP-abhängige Modulation der Ca^{2+} -ATPase ist dabei von der Phosphorylierung von Phospholamban abhängig. So stellte sich die Frage, ob Phospholamban, die Ca^{2+} -ATPase und cGMP-Kinase I miteinander assoziiert sind.

3.4.1 Interaktion von Phospholamban und SERCA 2

Phospholamban und SERCA bilden nicht nur eine funktionelle Einheit, sondern auch eine stabile Interaktion. In einem initialen Versuch konnte bestätigt werden, dass in Mikrosomen des glatten Muskels die Isoform SERCA 2 vorkommt und mit Phospholamban co-immunpräzipitiert werden kann. Abb. 3–10 zeigt das Präzipitat der Ca^{2+} -ATPase (110 kD) mit anti-Phospholamban Antikörper. Bei 55 und 25 kD sind die schweren und leichten Ketten des Antikörpers zu sehen sowie nicht dissoziierte SERCA 2 Moleküle oberhalb von 200 kD.

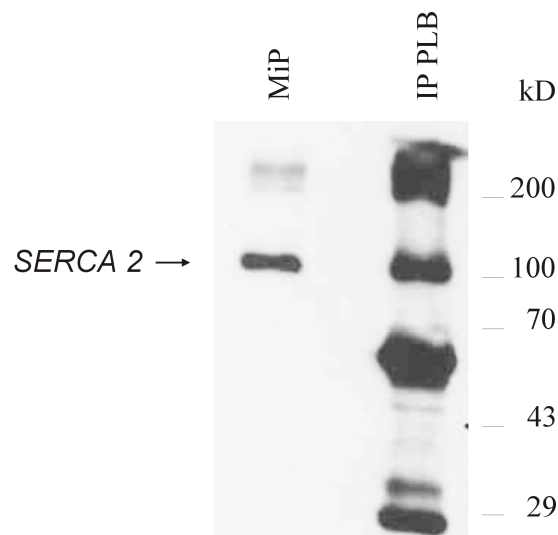


Abb. 3–10: Co-Immünpräzipitation von SERCA 2 mit anti-Phospholamban Antikörper aus mikrosomalen Membranen des glatten Muskels

2,5 mg der Mikrosomenfraktion wurden mit anti-Phospholamban Antikörper präzipitiert (IP PLB), über SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und der Westernblot mit anti-SERCA 2 Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurden 30 µg des Ausgangsmaterials (MiP) aufgetragen.

3.4.2 Assoziation von SERCA 2 an den Substrat-Komplex der cGMP-Kinase im glatten Muskel

Bei der Isolierung des Komplexes aus IP₃-Rezeptor, IRAG und cGMP-Kinase I mit anti-cGMP-Kinase I Antikörper konnten geringe Mengen der Ca²⁺-ATPase nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob SERCA 2 an diesen Komplex assoziiert ist oder ob an cGMP-Kinase I gebundenes Phospholamban gleichzeitig mit SERCA 2 interagiert, wurde der Komplex erneut an cGMP-Agarose vorgereinigt. Mikrosomale Membranen des glatten Muskels wurden über Affinitätschromatographie gereinigt, phosphoryliert und anschließend immunpräzipitiert. Nach der Auftrennung in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel wurde in einem Westernblot auf Anwesenheit von SERCA 2 getestet. In Abb. 3–11 ist gezeigt, dass die Ca²⁺-ATPase nicht an cGMP-Kinase I, IRAG, oder den IP₃-Rezeptor Typ I gebunden ist, sondern mit Phospholamban und den zytoskelettalen Proteinen interagiert. Der Zusammenhang der beiden Komplexe aus Phospholamban mit cGMP-Kinase I und deren Substrate IRAG und IP₃-Rezeptor sowie Phospholamban mit SERCA konnte nicht genauer geklärt werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass die Verbindung über das Zytoskelett zustande kommt.

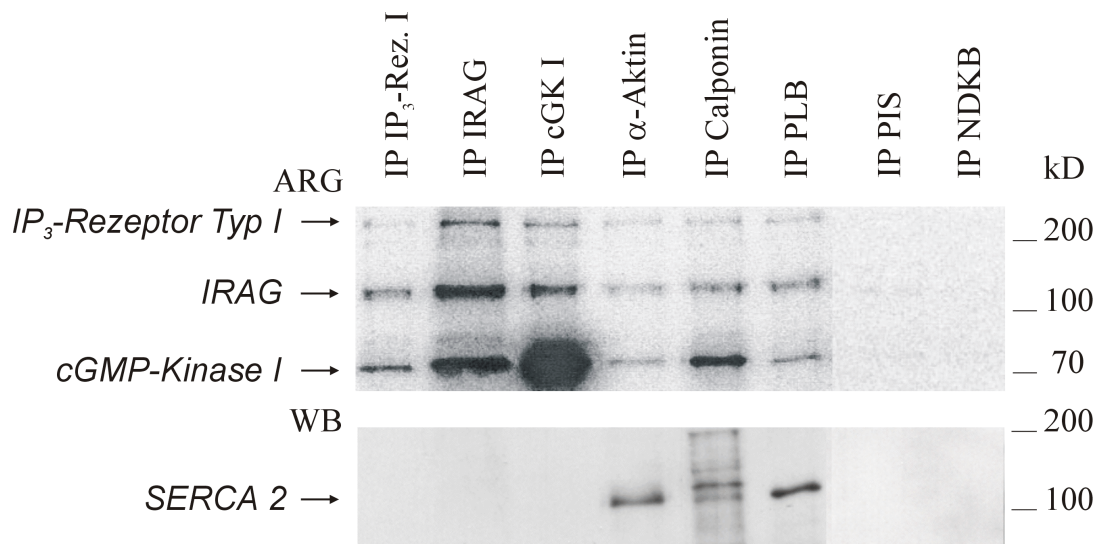


Abb. 3–11: Interaktion von SERCA 2 mit Phospholamban, α-Aktin und Calponin H1 nach Vorreinigung über cGMP-Agarose

2,5 mg Mikrosomales Pellet aus Rindertrachea wurden mit cGMP-Agarose gereinigt, phosphoryliert und anschließend mit Antikörpern gegen IP₃-Rez. Typ I, IRAG, cGK I, α-Aktin, Calponin H1, PLB, NDKB und Prä-Immunsereum (PIS) co-präzipitiert (IP). Nach Auftrennung über SDS-PAGE (12,5 %) wurde der Westernblot mit anti-SERCA 2 Antikörper detektiert. Oben ist das Autoradiogramm (ARG), unten die Immundetektion (WB) dargestellt.

4 Diskussion

Obwohl schon lange bekannt ist, dass die Aktivierung des NO/cGMP/cGMP-Kinase Signalwegs zur Vasodilatation führt, ist der damit verbundene Mechanismus immer noch unklar. Bisher sind einige Substrate der Kinase bekannt, deren Phosphorylierung einem hormonellen oder elektrischen Reiz folgt, jedoch konnte der genaue Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Kinase und ihrem Einfluss auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur noch nicht geklärt werden. Die vorliegende Arbeit gibt neue Hinweise zur Calcium abhängigen Regulation des Gefäßtonus durch das cGMP-Kinase I-Substrat Phospholamban und schafft damit eine neue Perspektive für weitere Untersuchungen.

4.1 Assoziation von Phospholamban mit cGMP-Kinase I β , IRAG und dem IP₃-Rezeptor Typ I am sarkoplasmatischen Retikulum

In der Membranfraktionen von glatten Muskelzellen verschiedener Spezies wurde mehrfach die Existenz von vier Substraten (225-240 kD, 130-132 kD, 85 kD und 11 kD) der cGMP-Kinase beschrieben (Casnellie and Greengard, 1974; Parks et al., 1987; Sarcevic et al., 1989). Neben dem IP₃-Rezeptor Typ I (Koga et al., 1994), IRAG (Schlossmann et al., 2000) und der autophosphorylierten cGMP-Kinase, wurde das 11 kD große Substrat aufgrund seines Laufverhaltens in SDS-Polyacrylamidgelen als Phospholamban identifiziert (Sarcevic et al., 1989). Während die lipophile Domäne II Phospholamban am sarkoplasmatischen Retikulum verankert, weist die cGMP-Kinase I eine zytosolische Struktur auf. Man weiß zwar, dass sie teilweise an Membranen assoziiert ist (Ives et al., 1980), jedoch gibt es keinen Hinweis darauf, warum die Kinase zytosolisch, wie auch partikulär vorliegt und welche Aufgaben mit der Lokalisation verbunden sind. Cornwell et al. führten immunzytochemische Untersuchungen mit konfokaler Lasermikroskopie durch und postulierten die Co-Lokalisation von cGMP-Kinase I und Phospholamban am sarkoplasmatischen Retikulum in der Umgebung des Zellkerns (Cornwell et al., 1991).

Diese Arbeit zeigt, dass Phospholamban mit cGMP-Kinase I, IRAG und dem IP₃-Rezeptor Typ I als stabiler Komplex in Membranen des glatten Muskels vorkommt. Untersuchungen in

COS 7 Zellen haben ergeben, dass diese Interaktion nur mit der cGMP-Kinase I β nach gemeinsamer Expression mit IRAG und dem IP₃-Rezeptor besteht. Die Stabilität des funktionellen Komplexes ist jedoch in COS 7 Zellen nach Co-Immunpräzipitation mit anti-cGMP-Kinase I Antikörper wesentlich geringer als in den mikrosomalen Membranen aus Rindertrachea. Das assoziierte Substrat IRAG interagiert in COS 7 Zellen zu geringen Teilen mit cGMP-Kinase, aber nicht mit dem IP₃-Rezeptor oder Phospholamban. Die stabile Interaktion von Phospholamban, cGMP-Kinase I β und IP₃-Rezeptor Typ I konnte nach Expression in COS 7 Zellen bestätigt werden (s. Abb. 3–9b).

Ein möglicher Grund für die schwache Assoziation nach Überexpression der Komplexbestandteile in COS 7 Zellen ist der Versuchsansatz. Aus dem Gewebe des glatten Muskels wurde im Gegensatz zu den Zellen eine Membranpräparation durchgeführt. Die Anreicherung der transmembranären Proteine kann dabei den stabilen Zusammenhalt des Komplexes bei der Aufreinigung verbessern. Eine wechselseitige Co-Immunpräzipitation aus Membranen von COS 7 Zellen ist zwar möglich, erfordert aber große Proteinmengen, die bei der gemeinsamen Expression von vier Komponenten schwierig zu erhalten sind. Zudem ist es möglich, dass wenige Zellen alle vier Bestandteile des Komplexes enthalten und dieser sich nur *in vivo* ausbilden kann.

Ein weiterer Grund für den mangelnden Zusammenhalt des Komplexes nach heterologer Expression in COS 7 Zellen kann die Abwesenheit anderer, stabilisierender Proteine der glatten Muskulatur sein. Diese Aufgabe können Bestandteile des Zytoskeletts in den Muskelzellen übernehmen und die Interaktion von Proteinen vermitteln. Die erneute Aufreinigung und genauere Untersuchung des Komplexes ergab die Assoziation von den für den glatten Muskel spezifischen Isoformen der zytoskelettalen Proteine α -Aktin und Calponin H1, die unter Umständen für den Zusammenhalt des Komplexes verantwortlich sind. Baltensperger et al. zeigten schon 1990 eine Interaktion des damals unbekanntes 130 kD Substrates (IRAG) mit Aktin und postulierten die Verbindung von Membranproteinen mit dem Zytoskelett als Aufgabe dieses Substrates im glatten Muskel (Baltensperger et al., 1990). Die von Schlossmann et al. beschriebene Assoziation weiterer Substratproteine G3 (65 kD) und G4 (30 kD) kann nach den vorliegenden Ergebnissen ausgeschlossen werden, wobei die Interaktion mit der GTPase Rho A nicht weiter untersucht wurde. Kürzlich wurde die Phosphorylierung und Inaktivierung des cAMP-Kinase Substrates Rho A durch cGMP-Kinase gezeigt

(Sauzeau et al., 2000; Sawada et al., 2001). Damit ergibt sich eine weitere Möglichkeit der cGMP-Kinase den Gefäßtonus über einen Calcium unabhängigen Weg zu steuern.

4.2 Phosphorylierung von Phospholamban durch die cGMP-Kinase I

Phospholamban wird durch cAMP-Kinase und cGMP-Kinase phosphoryliert (Raeymaekers et al., 1988). Beide Kinasen kommen in der glatten Muskulatur vor und vermitteln das Signal zyklischer Nukleotide. cGMP erhöhende Agenzien, wie natriuretische Peptide oder NO, können eine Kreuzaktivierung der cAMP-abhängigen Kinase bewirken (Cornwell et al., 1994; Sausbier et al., 2000). Die Aktivierung mit ANP oder NO führt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zur Erhöhung der cGMP Konzentration, zur Phosphorylierung von Phospholamban sowie einer verstärkten Aktivität der Ca²⁺-ATPase (Cornwell et al., 1991; Sarcevic et al., 1989). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte 1992, dass die Phosphorylierung von Phospholamban im glatten Muskel der Aorta durch endotheliales NO vermittelt wird und nach Entfernung des Endothels signifikant vermindert ist (Karczewski et al., 1992). Diese Versuchsansätze schließen jedoch eine Kreuzaktivierung der endogenen cAMP-Kinase nicht aus. In der hier vorgelegten Arbeit wurde Phospholamban durch das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP aktiviert, das ein hochspezifischer Ligand für cGMP-Kinase ist (Abb. 3–3). Nach Co-Immunpräzipitation von Phospholamban mit cGMP-Kinase I, durch einen cGMP-Kinase I spezifischen Antikörper, wurde PLB ebenfalls nach Zusatz von 8-pCPT-cGMP phosphoryliert (Abb. 3–4). Hierbei kann eine Aktivierung durch cAMP-Kinase ausgeschlossen werden, da die cAMP-Kinase nicht an den aufgereinigten Komplex assoziiert ist.

4.3 Funktion von Phospholamban in der glatten Muskulatur

Bisher wurde als einzige Funktion von Phospholamban die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration durch Modulation der Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums beschrieben. Phosphoryliertes Phospholamban erhöht die Affinität von SERCA für Calcium und aktiviert seine Aufnahme in das SR. Ca²⁺-freisetzende Stimulanzen bewirken daher in Phospholamban defizienten Tieren eine erhöhte Kontraktilität des Herzmuskels. Im Gefäßmuskel PLB defizienter Aorten fand man eine geringere Sensitivität gegenüber Phenylephrin und KCl und eine erhöhte Kontraktionsrate des Muskels (Lalli et al., 1997). In einer späteren Arbeit konnten die isometrischen Kraftmessungen mit der Messung der intra-

zellulären Calciumkonzentration korreliert werden (Lalli et al., 1999). Diese Effekte wurden auf die verstärkte Ca^{2+} -Beladung des SRs und die erhöhte Aktivität der Ca^{2+} -ATPase zurückgeführt. Die Hemmung der Ca^{2+} -ATPase mit Cyclopiazonsäure (CPA) erhöht die Sensitivität gegenüber elektrischen Reizen in PLB defizienten Tieren wieder. Daraus schloss die Arbeitsgruppe, dass diese Effekte ausschließlich auf die Ca^{2+} -ATPase zurückzuführen sind. Die funktionelle Inaktivierung des SRs durch CPA kann jedoch auch Auswirkungen auf andere Signalwege haben, die zum Beispiel die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern steuern. Entgegen der bisher veröffentlichten Ergebnisse, dass durch Deletion des Phospholamban-Gens die Kontraktilität des glatten Muskels und der Ausstrom von Calcium erhöht sind, zeigte die gleiche Arbeitsgruppe eine unterdrückte Carbachol Antwort des glatten Muskels der Harnblase in Phospholamban „knock out“ Tieren (Nobe et al., 2001). Diese widersprüchlichen Ergebnisse können darauf hin deuten, dass Phospholamban ein hormonelles Signal nicht nur über die Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase vermitteln kann.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass Phospholamban mit dem Mechanismus der Calciumfreisetzung durch einen stabilen Komplex in Verbindung steht. Obwohl nur ein geringer Teil des Phospholambans im glatten Muskel an die cGMP-Kinase I und den IP_3 -Rezeptor assoziiert ist, konnte diese Interaktion durch wechselseitige Co-Immunpräzipitationen und nach heterologer Expression der Proteine bestätigt werden. Die stabile Interaktion mit cGMP-Kinase I β besteht nur nach gemeinsamer Expression mit IRAG und dem IP_3 -Rezeptor und deutet auf eine funktionelle Einheit dieser Komponenten hin. Phospholamban könnte neben der Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase den Ausstrom von Calcium aus intrazellulären Speichern über den IP_3 -Rezeptor modulieren. Die Funktion von IRAG ist dabei unklar. Möglicherweise ist es an der Lokalisation der cGMP-Kinase I an der Membran beteiligt und bringt sie damit in die Nähe ihrer Substrate. Phospholamban kann die Rolle eines „sensitizer“ für die Wiederaufnahme und den Ausstrom von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum spielen.

4.4 Interaktion des mikrosomalen Komplexes mit SERCA 2

Nach Vorreinigung des beschriebenen Proteinkomplexes an cGMP-Agarose und anschließender Co-Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern wurde in Kapitel 3.4.2 die Assoziation der Ca^{2+} -ATPase an den mikrosomalen Komplex untersucht. Abb. 3–11 zeigt,

dass die SERCA 2 nur mit den zytoskelettalen Proteinen α -Aktin und Calponin H1 und mit Phospholamban interagiert, nicht aber mit der cGMP-Kinase I, dem IP₃-Rezeptor Typ I oder dem assoziierten Substrat IRAG. Die Co-Immunpräzipitation mit dem anti-Phospholamban Antikörper bestätigt aber die Verbindung von PLB mit der cGMP-Kinase I, dem IP₃-Rezeptor Typ I und IRAG im glatten Muskel. Der Versuch zeigt, dass Phospholamban einerseits mit der Ca²⁺-ATPase interagiert und dieser Komplex an das Zytoskelett assoziiert ist. Andererseits besteht eine Einheit aus Phospholamban, cGMP-Kinase I, IRAG und IP₃-Rezeptor, die ebenfalls über anhaftende zytoskelettale Proteine mit dem oben genannten Komplex in Verbindung steht. Phospholamban könnte also an zwei unabhängigen Regulationswegen beteiligt sein, die beide durch die cGMP-Kinase I aktiviert werden. Die Abb. 4–1 stellt diesen Zusammenhang schematisch dar.

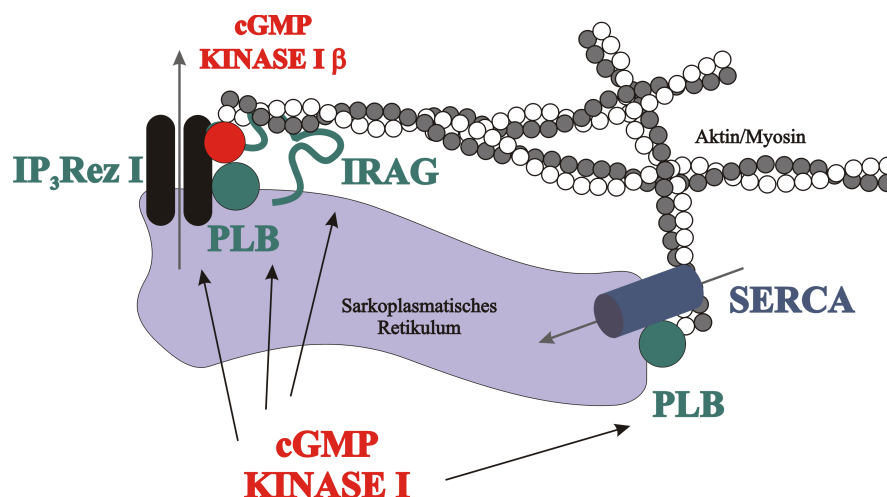


Abb. 4–1: Regulation der Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR durch Phospholamban

Nach Aktivierung durch cGMP-Kinase reguliert PLB einerseits die Ca²⁺-Aufnahme durch die Ca²⁺-ATPase des SR, andererseits ist es an den funktionellen Komplex aus IP₃-Rezeptor Typ I, IRAG und cGMP-Kinase I assoziiert und moduliert dort möglicherweise den Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR. Beide Komplexe sind über das Zytoskelett miteinander verbunden.

Der Zusammenhalt eines Proteinkomplexes ist von vielen Faktoren abhängig und unterliegt einem chemischen Gleichgewicht. Die Interaktion zwischen Phospholamban und SERCA 2 beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen und kann durch eine hohe Ionenstärke, Detergenzien und den pH-Wert beeinflusst werden. Veränderungen der Salzzusammensetzung treten hier zum Beispiel bei der Elution der Proteine von der cGMP-Agarose auf, wobei die

Salzkonzentration der verwendeten Puffer immer gleich war und somit die Stabilität des Komplexes gewährleistet ist. Die Abb. 3–10 zeigt, dass das Detergens in dem hier gewählten Ansatz die Interaktion von Phospholamban und der Ca^{2+} -ATPase nicht stört. Als funktionelles Gleichgewicht kann der Zusammenhalt des Komplexes auch durch die Phosphorylierung der Substratproteine nach der ersten Aufreinigung variieren und seine Komponenten danach in veränderter Zusammensetzung co-präzipitieren. Die physikalische Interaktion zwischen Phospholamban und SERCA 2 bleibt auch nach Phosphorylierung von Phospholamban durch cAMP-Kinase bestehen (Asahi et al., 2000), wobei im Herzmuskel ca. 40 % SERCA durch die Phosphorylierung von PLB reguliert werden (Brittsan et al., 2000). Erste Untersuchungen zur Stabilität des Komplexes aus IP_3 -Rezeptor, IRAG, cGMP-Kinase I und Phospholamban vor und nach Phosphorylierung haben keine Veränderung der Interaktionen gezeigt.

4.5 Ausblick

Der Aufklärung des molekularen Mechanismus, der zur Erschlaffung der glatten Muskulatur durch cGMP-Kinase führt, wird durch diese Arbeit eine neue Perspektive verliehen. Das Wissen um die Zielproteine der cGMP-Kinase und ihrer Bedeutung für den Tonus der glatten Muskulatur, ermöglicht die Entwicklung von Pharmaka mit gezieltem Angriffspunkt in dieser Kaskade. Zudem führt die Kenntnis des Signalweges NO freisetzender Arzneistoffe zu einer besseren Einschätzung ihrer Risiken und Nebenwirkungen.

Eine duale Funktion von Phospholamban führt zu einem neuen Weg des NO/cGMP vermittelten Signals, das die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum steuert. Bisherige Untersuchungen konnten eine komplexe Funktion des Signalproteins nicht aufschlüsseln und Kraftmessungen an der glatten Muskulatur verschiedener Gewebe ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Ein besseres Verständnis zur Funktion des in dieser Arbeit untersuchten Komplexes, kann die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration durch das sarkoplasmatische Retikulum anschaulicher machen. Weder die Aufgabe von IRAG, noch die von Phospholamban konnte bislang zufriedenstellend geklärt werden. Die Dynamik des beschriebenen Komplexes in Abhängigkeit von der Phosphorylierung der cGMP-Kinase Substrate ist dabei genauso interessant, wie die Assoziation von homo- oder multimeren Phospholamban Molekülen.

5 Zusammenfassung

Der Tonus der glatten Muskulatur wird einerseits direkt durch Aktivierung des kontraktiven Apparates und andererseits über Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration gesteuert. NO freisetzende Pharmaka aktivieren die lösliche Guanylylzyklase und führen über den cGMP/cGMP-Kinase abhängigen Signalweg zur Erschlaffung der glatten Muskulatur. Wie die Kinase dieses Signal vermittelt ist noch weitgehend unklar, wobei schon einige Substrate der cGMP-Kinase I bekannt sind. In der Mikrosomenfraktion glatter Muskeln wurde ein stabiler Komplex der cGMP-Kinase I und ihrer Substrate IRAG und IP₃-Rezeptor Typ I beschrieben, der für die Steuerung des Calciumausstroms aus Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte dieser mikrosomale Komplex genauer untersucht und die beteiligten Proteine gereinigt und charakterisiert werden. Dies geschah vor allem durch Co-Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern und Affinitätschromatographie mit cGMP-Agarose. Die Identifizierung der gereinigten Proteine erfolgte durch MALDI-TOF Analyse und Immunoblot, wobei Substrate der Kinase nach cGMP-abhängiger Phosphorylierung mit radioaktiv markiertem ATP detektiert wurden. Der Komplex wurde aus dem glatten Muskel der Trachea von Rindern aufgereinigt und seine Bestandteile isoliert. Dabei ergab sich die Assoziation von Phospholamban, einem Substrat der cGMP-Kinase, das den Calcium Rücktransport durch die Ca²⁺-ATPase in Speichervesikel des sarkoplasmatischen Retikulums moduliert. Die Interaktion von Phospholamban mit der cGMP-Kinase I β und dem IP₃-Rezeptor Typ I konnte nach heterologer Expression der Komponenten in COS 7 Zellen bestätigt werden. Dazu wurde Phospholamban aus cDNA des Herzens der Maus kloniert und mit je einer der beiden Isoformen der cGMP-Kinase I α und β , dem IP₃-Rezeptor Typ I und IRAG in COS 7 Zellen exprimiert.

Weiterhin konnte die Assoziation des Komplexes an die zytoskelettalen Proteine α -Aktin und Calponin H1 gezeigt werden. Das Zytoskelett kann einerseits zur Stabilisierung des Komplexes im glatten Muskel beitragen. Andererseits kann der Komplex Membranproteine mit

dem Zytoskelett verbinden und einen direkten Einfluss auf die Calcium unabhängige Kontraktion der Zelle haben.

Als einzige Funktion von Phospholamban ist bisher die Regulation der Ca^{2+} -ATPase beschrieben worden, daher wurde deren Assoziation an den funktionellen Komplex untersucht. Dazu wurde der Komplex an cGMP-Agarose gereinigt und nach Elution eine Co-Immünpräzipitation mit den spezifischen Antikörpern der Komplexbestandteile durchgeführt. Die differenzierte Auftrennung über zwei Säulen deckte die Existenz zweier Proteinkomplexe auf, die über das Zytoskelett miteinander verbunden sind. Einer besteht aus Phospholamban und der Ca^{2+} -ATPase und steuert die Aufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher, der andere enthält einen geringeren Teil Phospholamban, die cGMP-Kinase I β und ihre Substrate IRAG und den IP_3 -Rezeptor Typ I. Dieser zweite Komplex reguliert wahrscheinlich den Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum.

6 Anhang

6.1 Für Westernblot und Immunpräzipitation verwendete Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Hersteller/Firma	Organismus	Klassifizierung	Reinigungsgrad	Westernblot	Immunpräzipitation
α -Aktin, glatter Muskel, Klon 1A4	Sigma	Maus	monoklonal	Aszitesflüssigkeit	1:100 000	5 μ l
cAK RIa, P53620	PharMingen	Maus	monoklonal	?	1:250	?
Calponin H1, Klon hCP	Sigma	Maus	monoklonal	Aszitesflüssigkeit	1:10 000	5 μ l
cGK I _c	Schlossmann	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	1:200	25 μ l
cGK I _c , 81'2'1	Ruth	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	1:1000	7 μ l
cGK I _c , 81'2'2	Ruth	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	?	20 μ l
cGK I α	Schlossmann	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	1:80	?
cGK I β , 105'4	Schlossmann	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	1:2000	?
IP ₃ -Rez. Typ I, PA3-901	ABR	Kaninchen	polyklonal	Serum	1:1000	5 μ l
IRAG	Geiselhöringer	Kaninchen	polyklonal	Serum	1:1000	10 μ l
IRAG	Geiselhöringer	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	1:500	50 μ l
IRAG, 130-3	Gramsch	Kaninchen	polyklonal	Serum	1:500	20 μ l

NDKB, CBL 446	Dianova	Kaninchen	polyklonal	gereinigtes Serum	1:100	5 µl
PLB, Klon IID12	ABR	Maus	monoklonal	ger. Aszitesflüssigkeit	1:1000	5-10 µl
Rho A	Aepfelbacher (München)	Maus	monoklonal	?	1:1000	10 µl
SERCA 2, Klon IID8	Dianova	Maus	monoklonal	Aszitesflüssigkeit	1:2500	-----

Tabelle 6-1: Primäre Antikörper

Konjugat	Antigen	Katalognummer	Organismus
AP	Kaninchen IgG	711-055-152	Esel
AP	Maus IgG	715-055-150	Esel
HRPO	Kaninchen IgG	111-035-045	Ziege
HRPO	Maus IgG	715-035-150	Esel

Tabelle 6-2: Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper wurde von der Firma Dianova bezogen.

7 Literaturverzeichnis

- Alioua, A., Y. Tanaka, M. Wallner, F. Hofmann, P. Ruth, P. Meera, and L. Toro. 1998. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem.* 273:32950-6.
- Ammendola, A., A. Geiselhöringer, F. Hofmann, and J. Schlossmann. 2001. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem.* 276:24153-9.
- Asahi, M., E. McKenna, K. Kurzydowski, M. Tada, and D.H. MacLennan. 2000. Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases are dissociated by elevated Ca²⁺, but not by phospholamban phosphorylation, vanadate, or thapsigargin, and are enhanced by ATP. *J Biol Chem.* 275:15034-8.
- Autry, J.M., and L.R. Jones. 1997. Functional Co-expression of the canine cardiac Ca²⁺ pump and phospholamban in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells reveals new insights on ATPase regulation. *J Biol Chem.* 272:15872-80.
- Baltensperger, K., M. Chiesi, and E. Carafoli. 1990. Substrates of cGMP kinase in vascular smooth muscle and their role in the relaxation process. *Biochemistry.* 29:9753-60.
- Biel, M., A. Sautter, A. Ludwig, F. Hofmann, and X. Zong. 1998. Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 358:140-4.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brittsan, A.G., A.N. Carr, A.G. Schmidt, and E.G. Kranias. 2000. Maximal inhibition of SERCA2 Ca(2+) affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J Biol Chem.* 275:12129-35.
- Casnellie, J.E., and P. Greengard. 1974. Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent phosphorylation of endogenous substrate proteins in membranes of mammalian smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:1891-5.
- Chu, D.M., J.D. Corbin, K.A. Grimes, and S.H. Francis. 1997. Activation by cyclic GMP binding causes an apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 272:31922-8.
- Cook, E.A., J.P. Huggins, G. Sathe, P.J. England, and J.R. Piggott. 1989. The expression of canine cardiac phospholamban in heterologous systems. *Biochem J.* 264:533-8.
- Cornea, R.L., L.R. Jones, J.M. Autry, and D.D. Thomas. 1997. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry.* 36:2960-7.
- Cornwell, T.L., E. Arnold, N.J. Boerth, and T.M. Lincoln. 1994. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol.* 267:C1405-13.
- Cornwell, T.L., K.B. Pryzwansky, T.A. Wyatt, and T.M. Lincoln. 1991. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 40:923-31.
- de Jonge, H.R. 1981. Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 14:315-33.

-
- Ferguson, D.G., E.F. Young, L. Raeymaekers, and E.G. Kranias. 1988. Localization of phospholamban in smooth muscle using immunogold electron microscopy. *J Cell Biol.* 107:555-62.
- Ganim, J.R., W. Luo, S. Ponniah, I. Grupp, H.W. Kim, D.G. Ferguson, V. Kadambi, J.C. Neumann, T. Doetschman, and E.G. Kranias. 1992. Mouse phospholamban gene expression during development in vivo and in vitro. *Circ Res.* 71:1021-30.
- Garg, U.C., and A. Hassid. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 83:1774-7.
- Herzyk, P., and R.E. Hubbard. 1998. Using experimental information to produce a model of the transmembrane domain of the ion channel phospholamban. *Biophys J.* 74:1203-14.
- Hofmann, F., and G. Sold. 1972. A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3':5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 49:1100-7.
- Huang, P.L., Z. Huang, H. Mashimo, K.D. Bloch, M.A. Moskowitz, J.A. Bevan, and M.C. Fishman. 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 377:239-42.
- Huggins, J.P., E.A. Cook, J.R. Piggott, T.J. Mattinsley, and P.J. England. 1989. Phospholamban is a good substrate for cyclic GMP-dependent protein kinase in vitro, but not in intact cardiac or smooth muscle. *Biochem J.* 260:829-35.
- Ignarro, L.J., R.E. Byrns, G.M. Buga, and K.S. Wood. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 61:866-79.
- Ives, H.E., J.E. Casnellie, P. Greengard, and J.D. Jamieson. 1980. Subcellular localization of cyclic GMP-dependent protein kinase and its substrates in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 255:3777-85.

- Jones, L.R., H.K. Simmerman, W.W. Wilson, F.R. Gurd, and A.D. Wegener. 1985. Purification and characterization of phospholamban from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 260:7721-30.
- Jorgensen, A.O., and L.R. Jones. 1986. Localization of phospholamban in slow but not fast canine skeletal muscle fibers. An immunocytochemical and biochemical study. *J Biol Chem.* 261:3775-81.
- Kadambi, V.J., and E.G. Kranias. 1997. Phospholamban: a protein coming of age. *Biochem Biophys Res Commun.* 239:1-5.
- Kadambi, V.J., S. Ponniah, J.M. Harrer, B.D. Hoit, G.W. Dorn, 2nd, R.A. Walsh, and E.G. Kranias. 1996. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest.* 97:533-9.
- Karczewski, P., M. Kelm, M. Hartmann, and J. Schrader. 1992. Role of phospholamban in NO/EDRF-induced relaxation in rat aorta. *Life Sci.* 51:1205-10.
- Katsuki, S., W. Arnold, C. Mittal, and F. Murad. 1977. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 3:23-35.
- Keilbach, A., P. Ruth, and F. Hofmann. 1992. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem.* 208:467-73.
- Kimura, Y., M. Asahi, K. Kurzydowski, M. Tada, and D.H. MacLennan. 1998. Phospholamban domain Ib mutations influence functional interactions with the Ca²⁺-ATPase isoform of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 273:14238-41.

-
- Kimura, Y., K. Kurzydowski, M. Tada, and D.H. MacLennan. 1996. Phospholamban regulates the Ca^{2+} -ATPase through intramembrane interactions. *J Biol Chem.* 271:21726-31.
- Kimura, Y., K. Kurzydowski, M. Tada, and D.H. MacLennan. 1997. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem.* 272:15061-4.
- Kirchberber, M.A., M. Tada, and A.M. Katz. 1975. Phospholamban: a regulatory protein of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 5:103-15.
- Koga, T., Y. Yoshida, J.Q. Cai, M.O. Islam, and S. Imai. 1994. Purification and characterization of 240-kDa cGMP-dependent protein kinase substrate of vascular smooth muscle. Close resemblance to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 269:11640-7.
- Komalavilas, P., and T.M. Lincoln. 1996. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem.* 271:21933-8.
- Kovacs, R.J., M.T. Nelson, H.K. Simmerman, and L.R. Jones. 1988. Phospholamban forms Ca^{2+} -selective channels in lipid bilayers. *J Biol Chem.* 263:18364-8.
- Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol.* 115:887-903.
- Kuo, J.F., and P. Greengard. 1970. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 245:2493-8.
- Kurtz, A., and C. Wagner. 1998. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol.* 275:F849-62.

- Kuschel, M., P. Karczewski, P. Hempel, W.P. Schlegel, E.G. Krause, and S. Bartel. 1999. Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol.* 276:H1625-33.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lalli, J., J.M. Harrer, W. Luo, E.G. Kranias, and R.J. Paul. 1997. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle. *Circ Res.* 80:506-13.
- Lalli, M.J., S. Shimizu, R.L. Sutliff, E.G. Kranias, and R.J. Paul. 1999. $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol.* 277:H963-70.
- Li, H., J.P. Liu, and P.J. Robinson. 1996. Multiple substrates for cGMP-dependent protein kinase from bovine aortic smooth muscle: purification of P132. *J Vasc Res.* 33:99-110.
- Lohmann, S.M., A.B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter, and H.R. De Jonge. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 22:307-12.
- Lopez, M.J., S.K. Wong, I. Kishimoto, S. Dubois, V. Mach, J. Friesen, D.L. Garbers, and A. Beuve. 1995. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature.* 378:65-8.
- Luo, W., I.L. Grupp, J. Harrer, S. Ponniah, G. Grupp, J.J. Duffy, T. Doetschman, and E.G. Kranias. 1994. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res.* 75:401-9.

-
- Luo, W., B.M. Wolska, I.L. Grupp, J.M. Harrer, K. Haghghi, D.G. Ferguson, J.P. Slack, G. Grupp, T. Doetschman, R.J. Solaro, and E.G. Kranias. 1996. Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. *Circ Res.* 78:839-47.
- Massberg, S., M. Sausbier, P. Klatt, M. Bauer, A. Pfeifer, W. Siess, R. Fassler, P. Ruth, F. Krombach, and F. Hofmann. 1999. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* 189:1255-64.
- Mullis, K.B., and F.A. Faloon. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Nakamura, M., K. Ichikawa, M. Ito, B. Yamamori, T. Okinaka, N. Isaka, Y. Yoshida, S. Fujita, and T. Nakano. 1999. Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal.* 11:671-6.
- Nobe, K., R.L. Sutliff, E.G. Kranias, and R.J. Paul. 2001. Phospholamban regulation of bladder contractility: evidence from gene-altered mouse models. *J Physiol.* 535:867-78.
- Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524-6.
- Parks, T.P., A.C. Nairn, P. Greengard, and J.D. Jamieson. 1987. The cyclic nucleotide-dependent phosphorylation of aortic smooth muscle membrane proteins. *Arch Biochem Biophys.* 255:361-71.
- Pfeifer, A., A. Aszodi, U. Seidler, P. Ruth, F. Hofmann, and R. Fassler. 1996. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science.* 274:2082-6.
- Pfeifer, A., P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G.X. Wang, M. Korth, A. Aszodi, K.E. Andersson, F. Krombach, A. Mayerhofer, P. Ruth, R. Fassler, and F. Hofmann. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J.* 17:3045-51.

- Pfeifer, A., P. Ruth, W. Dostmann, M. Sausbier, P. Klatt, and F. Hofmann. 1999. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135:105-49.
- Raeymaekers, L., F. Hofmann, and R. Casteels. 1988. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J.* 252:269-73.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-4.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.
- Sarcevic, B., V. Brookes, T.J. Martin, B.E. Kemp, and P.J. Robinson. 1989. Atrial natriuretic peptide-dependent phosphorylation of smooth muscle cell particulate fraction proteins is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 264:20648-54.
- Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth, and F. Hofmann. 2000. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res.* 87:825-30.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski, S.M. Lohmann, J. Bertoglio, P. Chardin, P. Pacaud, and G. Loirand. 2000. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 275:21722-9.
- Sawada, N., H. Itoh, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, K. Masatsugu, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, and K. Nakao. 2001. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:798-805.

-
- Schägger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368-79.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G.X. Wang, H.D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature.* 404:197-201.
- Simmerman, H.K., J.H. Collins, J.L. Theibert, A.D. Wegener, and L.R. Jones. 1986. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem.* 261:13333-41.
- Simmerman, H.K., Y.M. Kobayashi, J.M. Autry, and L.R. Jones. 1996. A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. *J Biol Chem.* 271:5941-6.
- Slack, J.P., I.L. Grupp, W. Luo, and E.G. Kranias. 1997. Phospholamban ablation enhances relaxation in the murine soleus. *Am J Physiol.* 273:C1-6.
- Smith, J.A., S.H. Francis, K.A. Walsh, S. Kumar, and J.D. Corbin. 1996. Autophosphorylation of type Ibeta cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP. *J Biol Chem.* 271:20756-62.
- Sonnenburg, W.K., and J.A. Beavo. 1994. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol.* 26:87-114.
- Surks, H.K., N. Mochizuki, Y. Kasai, S.P. Georgescu, K.M. Tang, M. Ito, T.M. Lincoln, and M.E. Mendelsohn. 1999. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science.* 286:1583-7.

- Sutliff, R.L., J.B. Hoying, V.J. Kadambi, E.G. Kranias, and R.J. Paul. 1999. Phospholamban is present in endothelial cells and modulates endothelium-dependent relaxation. Evidence from phospholamban gene-ablated mice. *Circ Res.* 84:360-4.
- Suzuki, T., P. Lui, and J.H. Wang. 1986. The use of monoclonal antibodies for the species and tissues distribution of phospholamban. *Cell Calcium.* 7:41-7.
- Tada, M., and M.A. Kirchberger. 1976. Significance of the membrane protein phospholamban in cyclic AMP-mediated regulation of calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 11:265-72.
- Toyofuku, T., K. Kurzydowski, M. Tada, and D.H. MacLennan. 1994. Amino acids Glu2 to Ile18 in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 269:3088-94.
- Twort, C.H., and C. van Breemen. 1988. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 62:961-4.
- Vaandrager, A.B., E.M. Ehlert, T. Jarchau, S.M. Lohmann, and H.R. de Jonge. 1996. N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem.* 271:7025-9.
- Vaandrager, A.B., A. Smolenski, B.C. Tilly, A.B. Houtsmuller, E.M. Ehlert, A.G. Bot, M. Edixhoven, W.E. Boomaars, S.M. Lohmann, and H.R. de Jonge. 1998. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1466-71.
- Wagner, C., A. Pfeifer, P. Ruth, F. Hofmann, and A. Kurtz. 1998. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest.* 102:1576-82.

-
- Wegener, A.D., H.K. Simmerman, J.P. Lindemann, and L.R. Jones. 1989. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem.* 264:11468-74.
- Wernet, W., V. Flockerzi, and F. Hofmann. 1989. The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 251:191-6.

8 Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
AP	Alkalische Phosphatase	IP ₃ -Rez.	Inositoltrisphosphat Rezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat	IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes G-Kinase Substrat
ARG	Autoradiogramm	kb	kilo Basen
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	kD	kilo Dalton
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	Lubrol-PX	Polyoxyethylen-23-Lauryl-ether
BNP	Gehirn spezifisches natriuretisches Peptid	MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
bp	Basenpaar	Mes	Morpholinoethansulfonsäure
BSA	Rinderserumalbumin	MgAc	Magnesiumacetat
cAK	cAMP abhängige Proteinkinase	min	Minute
cAMP	zyklisches Adenosin - 3',5'-monophosphat	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
cDNA	komplementäre DNA	NBT	Nitrotetrazolblau
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase	NO	Stickstoffmonoxid
cGK I _c	cGK I "common" Region	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat	8-pCPT-cGMP	8-(4-Chlorophenylthio)-guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
Ci	Curie (1 Ci = 3,7x10 ¹⁰ Bq)	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CNG	durch zyklische Nukleotide aktiviert	PIS	Prä-Immunsrum
CNP	C-typ natriuretisches Peptid	PLB	Phospholamban
CPA	Cyclopiazon Säure	PMSF	Phenylmethansulfonyl-Fluorid
cpm	counts per minute	PVDF	Polyvinylidenfluorid
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid	RNAse	RNA spaltendes Enzym
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	Umdrehungen pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure	RT	Raumtemperatur
DNase	DNA spaltendes Enzym	SDS	Natriumdodecylsulfat
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	sek	Sekunde
ds	Doppelstrang	SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
DTT	Dithiothreitol	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

EDTA	Ethylendiamino- N,N,N',N'-tetraessigsäure	ss	Einzelstrang
EGTA	Ethylenglycol-bis(2- aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	TBST	Tris-NaCl-Tween20-Puffer
FCS	Fötales Kälberserum	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
h	Stunde	Tricin	Tris-(hydroxymethyl)- methylglycin
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-pipe- razin-1-ethansulfonsäure	Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
HRPO	Meerrettichperoxidase	UV	Ultraviolett
IEP	Isoelektrischer Punkt	WB	Westernblot
IP	Immunpräzipitation	x g	-fache Erdbeschleunigung

8.1 Buchstabencode der Nukleotide

A = Adenin

G = Guanin

T = Thymin

C = Cytosin

8.2 Drei- und Ein-Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Lebenslauf

Persönliche Daten:

geboren am 08. April 1972, in Nürnberg

Schule:

1978-1983 Grundschule an der Stuntzstrasse, München-Bogenhausen
1983-1984 Gymnasium Max-Josef-Stift, München-Bogenhausen
1984-1992 Gymnasium Starnberg, Starnberg
mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

April 1993 - Oktober 1997 Studium der Pharmazie an der LMU in München
1. Staatsexamen: September 1995
2. Staatsexamen: Oktober 1997
3. Staatsexamen: Dezember 1998
Approbation als Apothekerin: Dezember 1998

Praktika:

Famulatur:

September 1993 Nikolaus-Apotheke in Feldafing
Oktober 1994 HEXAL in Holzkirchen

Pharmazeutisches Praktikum:

November 1997-April 1998 Boehringer Mannheim in Penzberg
Mai 1998-November 1998 Salvator-Apotheke in München-Giesing

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit März 1999 wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der TU München bei Prof. F. Hofmann

Stipendium:

März 1999-Februar 2001 Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses
der TU München