

**Funktion von IRAG für cGMP-Kinase I-Komplexe
sowie für die InsP₃R-I-Phosphorylierung**



DISSERTATION

**Zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für
Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Katharina Salb
aus Memmingen
im Jahr 2011

**Funktion von IRAG für cGMP-Kinase I-Komplexe
sowie für die InsP₃R-I-Phosphorylierung**



DISSERTATION

**Zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für
Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Katharina Salb
aus Memmingen
im Jahr 2011

Dissertation eingereicht: November 2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. Wolfgang Wiegrebe
1. Gutachter (1. Prüfer):	Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann
2. Gutachter (2. Prüfer):	Herr Prof. Dr. Achim Göpferich
3. Prüfer:	Herr Prof. Dr. Jörg Heilmann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
A. Einleitung	1
A.1 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg	1
A.1.1 NO- und cGMP-Bildung.....	1
A.1.2 Pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten.....	3
A.1.3 Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen.....	4
A.1.4 Der trimere Signalkomplex.....	6
A.1.4.1 Identifikation des trimeren Makrokompleses.....	6
A.1.4.2 Die Inositoltrisphosphat-Rezeptoren.....	7
A.1.4.3 Funktion des trimeren Komplexes.....	9
A.1.5 Physiologische Funktionen von IRAG.....	10
A.1.5.1 Funktion von IRAG in Thrombozyten.....	10
A.1.5.2 Funktion von IRAG in der glatten Muskulatur.....	11
A.1.6 Weitere cGKI-Substrate und ihre Funktion.....	12
A.2 Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen	15
A.3 Ziele der Arbeit	17
B. Material und Methoden	18
B.1 Materialien	18
B.1.1 Geräte.....	18
B.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits.....	19
B.1.3 Chemikalien und Arzneistoffe.....	20
B.1.4 Verwendete Antikörper.....	22
B.1.5 Puffer und Lösungen.....	22
B.1.6 Gele für SDS-PAGE und Tricin-SDS-PAGE.....	23
B.1.7 Verwendete Oligonukleotide.....	24
B.2 Methoden	24
B.2.1 Versuchstiere.....	24
B.2.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	25
B.2.2.1 Gewinnung von Protein aus Mausgeweben.....	25
B.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
B.2.2.3 Proteinbestimmung nach Lowry.....	26
B.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
B.2.2.5 Coomassie-Färbung.....	28

B.2.2.6 Western Blot	28
B.2.2.7 Antikörperentfernung („Strippen“) zur Wiederverwendung der Western Blots	30
B.2.3 Affinitätschromatographie	30
B.2.3.1 Co-Immunpräzipitation	30
B.2.3.2 cGMP-, cAMP- und Heparin-Agarose	31
B.2.4 Phosphorylierungsexperimente	32
B.2.4.1 Isolierung von Thrombozyten aus Mausblut	32
B.2.4.2 Stimulation von Thrombozyten	33
B.2.4.3 Detektion der Proteinphosphorylierung mit Hilfe von Phosphoantikörpern	34
B.2.4.4 Densitometrie und Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung	34
B.2.4.5 <i>In-vivo</i> -Phosphorylierung mit ³³ P-H ₃ PO ₄ und Autoradiographie	36
B.2.4.6 Isolierung von Thrombozyten aus Humanblut	39
B.2.4.7 Aufschluss und Phosphorylierung von Aortengewebe	39
B.2.5 Messung der Thrombozytenaggregation	40
B.2.5.1 Isolierung von Thrombozyten	40
B.2.5.2 Messung der Thrombozytenaggregation mit dem Luminoaggregometer	40
B.2.5.3 Auswertung und Statistik	41
B.2.6 Molekularbiologische Methoden	41
B.2.6.1 RNA-Isolierung aus Thrombozyten	41
B.2.6.2 RT-PCR	42
B.2.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
B.2.6.4 Agarosegelelektrophorese	43
B.2.6.5 Generierung von IRAGΔInt in pcDNA3.1(-)	44
B.2.6.6 PCRs zur Generierung der IRAGΔInt-cDNA	45
B.2.6.7 Gelextraktion	46
B.2.6.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	46
B.2.6.9 Ligation	47
B.2.6.10 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation	48
B.2.6.11 Transformation	49
B.2.6.12 Miniprep, Maxiprep und Sequenzierung	50
B.2.6.13 Transfektion von COS-7-Zellen für die Interaktionsversuche	50
B.2.6.14 Transfektion und Immunzytochemie von COS-7-Zellen	52
B.2.6.15 Mikroskopie	54
B.2.7 Statistik	54
C. Ergebnisse	55
C.1 Untersuchung der Funktion der InsP₃R-I-Phosphorylierung	55
C.1.1 Untersuchung der InsP ₃ R-I-Phosphorylierung in murinen Thrombozyten	55
C.1.1.1 Nachweis des trimeren Makrokompleses in Thrombozyten	55
C.1.1.2 Die InsP ₃ R-I-Spleißvarianten in Thrombozyten	59

C.1.1.3 <i>In-vivo</i> -Phosphorylierung des InsP ₃ R-I in Thrombozyten.....	61
C.1.1.4 Bestimmung der Phosphorylierung des InsP ₃ R-I mittels ³³ P-Markierung und Autoradiographie.....	71
C.1.2 cGMP-stimulierte Hemmung der Thrombozytenaggregation.....	73
C.1.3 Phosphorylierung des InsP ₃ R-I in humanen Thrombozyten und in murinem Aortenlysat.....	75
C.1.4 Stimulation der PKA in Thrombozyten	77
C.1.4.1 Stimulation mit cBIMPS, Forskolin und Iloprost	77
C.1.4.2 Identifikation eines durch die PKA phosphorylierten, mit dem anti-P-InsP ₃ R-I-AK (Ser1755) detektierten unbekanntem Proteins.....	81
C.2 Untersuchung der IRAG-cGKIβ-Interaktion in COS-7-Zellen.....	86
C.2.1 Untersuchung der Interaktion zwischen IRAG Δ Int und cGKI β mit Hilfe von cGMP-Agarosefällungen.....	86
C.2.2 Untersuchung der Lokalisation heterolog exprimierter cGKI β in COS-7-Zellen nach Stimulation mit cGMP	87
C.3 Weitere cGKI-Komplexe in Thrombozyten und in Glattmuskelgewebe von WT- und IRAG-KO-Mäusen.....	89
C.3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen InsP ₃ R-II bzw. InsP ₃ R-III und IRAG in Thrombozyten und Colongewebe.....	89
C.3.1.1 Interaktion zwischen InsP ₃ R-II und IRAG.....	89
C.3.1.2 Untersuchung der Interaktion zwischen IRAG und InsP ₃ R-III in Thrombozyten und Colongewebe	90
C.3.2 Untersuchung der Interaktion zwischen der cGKI und Phospholamban in murinen Thrombozyten und Colongewebe.....	94
C.3.3 Ist die PDE5 ein Bestandteil des trimeren Makrokompleses in Thrombozyten und Colongewebe?.....	98
C.3.4 Untersuchung der Interaktion zwischen MYPT-1 und cGKI α in der glatten Muskulatur von Uterus und Colon	102
D. Diskussion.....	106
D.1 Die Bedeutung der cGMP-abhängigen InsP₃R-I-Phosphorylierung...	106
D.2 Die trimeren cGKIβ/IRAG/InsP₃R-Komplexe	110
D.3 Weitere cG-Kinase-Komplexe in Thrombozyten und Glattmuskelgewebe.....	113
E. Zusammenfassung.....	119

F. Literaturverzeichnis	121
F.1 Zitierte Veröffentlichungen	121
F.2 Eigene Veröffentlichungen	130
F.2.1 Poster	130
F.2.2 Vorträge	130
F.2.3 Originalarbeiten	130
G. Anhang.....	131
G.1 Abbildungsverzeichnis.....	131
G.2 Tabellenverzeichnis	133
G.3 Danksagung	134
G.4 Eidesstattliche Erklärung	135

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro 10 ⁻⁶
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKAP	A-Kinase Anker Protein
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BA	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BHK	Baby Hamster Kidney Cells
BSA	bovines Serumalbumin
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cc	coiled-coil
cGK	cGMP-abhängige Kinase, cG-Kinase
cGK α bzw. cGK β	cGMP-abhängige Kinase Typ α bzw. Typ β
cGKc	cGKI common
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNG	zyklisch-Nukleotid aktivierte Kationenkanäle
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CRP	collagen related peptide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraminsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Gramm bzw. Gravitationskonstante
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GKAP	G-Kinase Anker Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST-Tag	Glutathion-S-Transferase-Tag (Fusionsprotein)
GTPase	GTP-hydrolysierendes Enzym
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
InsP ₃	Inositoltrisphosphat
InsP ₃ R	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
IP	Immunpräzipitation
IRAG	Inositoltrisphosphat-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinasesubstrat
k	kilo 10 ³
K _a	Aktivierungskonstante

Einleitung

K _i	Inhibitionskonstante
kDa	kilo Dalton
KO	Knock Out
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharide
LZ+	Leuzin-Zipper positiv
m	milli 10 ⁻³ bzw. Meter
M	molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization; time of flight
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Myosin light chain; Myosin leichte Kette
mRNA	messenger RNA
MYPT-1	myosinbindende Untereinheit der Myosinleichtkettenphosphatase
n	nano 10 ⁻⁹
NANC	nicht-adrenerg nicht-cholinerg
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
p	p-Wert; Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
P-AK	Phospho-Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
pH	pH-Wert
PI	Proteaseinhibitor
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PPI	Proteinphosphataseinhibitor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REN	Restriktionsendonuklease
RGS	regulator of G-Protein signalling
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RNase	RNA hydrolysierendes Enzym
ROCK	Rho-Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute/rotations per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
SERCA	Sarko-/endoplasmatische Retikulum ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOB-Medium	super optimal broth medium
SOC-Medium	SOB-Medium + 20 mM Glucose
SPF	spezifisch pathogenfrei
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

TBST	Tris gepufferte Lösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRPC	transient receptor potential channel
UV	ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle; vascular smooth muscle cell
WT	Wildtyp
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen

A. Einleitung

Bereits Ende der 1970er Jahre erkannte man die wichtige physiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO), als seine gefäßdilatorische Wirkung entdeckt wurde. Für ihre wegweisenden Untersuchungen auf diesem Gebiet erhielten die Amerikaner Ferid Murad, Robert F. Furchgott und Louis J. Ignarro 1988 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Mittlerweile wurden die Signalwege, welche die physiologischen Wirkungen von NO vermitteln, intensiv erforscht. NO aktiviert, über einen Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), unter anderem sogenannte cGMP-abhängige Proteinkinasen (cG-Kinasen). Diese cG-Kinasen wiederum können eine Vielzahl von Targetproteinen phosphorylieren bzw. aktivieren, wodurch sich die mannigfaltigen Effekte von NO/cGMP in den verschiedensten Zelltypen ergeben.

Ein Substratprotein der cG-Kinasen ist IRAG, das InsP_3 -Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinasesubstrat. Dieses wird in zahlreichen Zellen und Geweben, unter anderem in glatter Muskulatur und in Thrombozyten, exprimiert und ist an der Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration beteiligt. Diese kann auch durch andere cG-Kinasesubstrate beeinflusst werden.

Obwohl in den letzten Jahren somit zahlreiche Erkenntnisse über das NO/cGMP-Signalling gewonnen werden konnten, sind dennoch viele Fragen immer noch offen, unter anderem der Aufbau und die Funktion bestimmter cG-Kinase-Proteinkomplexe. Die Wechselwirkungen zwischen den cG-Kinasen und ihren Substratproteinen waren auch der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Zur Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen werden bereits Pharmaka eingesetzt, deren Angriffspunkt die NO-Signalkaskade ist. Da auf diesem Gebiet aber ein Bedarf an neuen, noch potenteren und selektiveren Arzneistoffen besteht, ist es wichtig, den NO/cGMP-Weg weiter aufzuklären, um neue Targets für Arzneistoffe zu finden.

A.1 Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg

A.1.1 NO- und cGMP-Bildung

Stickstoffmonoxid (NO), früher als EDRF bezeichnet (Furchgott & Vanhoutte, 1989), kann endogen durch drei verschiedene Isoenzyme gebildet werden. Dies sind die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3), die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2) (Griffith & Stuehr, 1995). NOS1 und NOS3 werden konstitutiv exprimiert, während die Expression von NOS2 während einer

Immunantwort induziert wird (Villanueva & Giulivi, 2010). NOS1 wurde ursprünglich in zentralen Neuronen identifiziert, inzwischen aber in einer Vielzahl anderer Zellen nachgewiesen, unter anderem in peripheren NANC-Neuronen, aber auch in Skelettmuskelzellen oder in Macula Densa-Zellen der Niere. Die Expression von eNOS ist dagegen auf das vaskuläre Endothel beschränkt, durch Modifikationen dieser Isoform kommt es aber zu Kompartimentierungen innerhalb der Zellen. Ein Beispiel ist die Lokalisierung im Golgi-Apparat durch posttranslationale N-Myristoylierung des Enzyms (Villanueva & Giulivi, 2010). Durch inflammatorische Zytokine oder LPS wird die Expression von NOS2 in vaskulären Endothelzellen, in der Leber, im Myokard oder auch in Makrophagen induziert, was zu einer lokal sehr stark vermehrten NO-Freisetzung führt (Griffith & Stuehr, 1995).

Die Aktivität der beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthasen NOS1 und NOS3 wird durch Ca^{2+} /Calmodulin reguliert. Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung der eNOS ist die Phosphorylierung von Ser1177, welche zum Beispiel durch VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Bradykinin oder Scherstress induziert werden kann. Die phosphorylierende Kinase ist im Fall der Bradykininstimulation die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und nach Scherstress die Proteinkinase A (PKA). Im Gegensatz dazu ist die iNOS nach ihrer Expression konstant aktiviert (Forstermann & Sessa, 2011).

Alle NOS-Isoformen wandeln zur NO-Synthese L-Arginin in L-Citrullin und Stickstoffmonoxid um. Dabei benötigen sie neben L-Arginin als Substrat molekularen Sauerstoff und reduziertes NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) als Co-Substrate. NO ist ein hochreaktives radikalisches Gas und reagiert mit anderen Substanzen mit ungepaarten Elektronen, zum Beispiel mit Metallkomplexen, mit O_2 , oder mit Proteinradikalen. Bei Interaktion mit O_2^- kommt es zur Bildung von Peroxynitrit, welches Tyrosinreste nitriert und somit bestimmte Enzyme hemmen kann (Krumenacker *et al.*, 2004). Der wichtigste physiologische NO-stimulierte Signalweg ist aber die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und die nachfolgende Generierung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP).

Es sind zwei Klassen von Guanylatzyklaseenzymen bekannt, die aus intrazellulärem Guanosin-5'-triphosphat (GTP) den „second messenger“ zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) erzeugen: die partikuläre Guanylatzyklase (pGC) und die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Die pGCs sind membrangebundene Rezeptoren, die durch Ligandbindung an ihre extrazelluläre Domäne aktiviert werden. In Säugetieren wurden sieben pGC-Isoformen (GC-A – GC-G) identifiziert, wobei GC-A und GC-B die natriuretischen Peptide ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP (brain derived natriuretic peptide) und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid) binden und die GC-C die Guanyline (Krumenacker *et al.*, 2004). Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) ist ein

zytosolischer NO-Rezeptor, der als Heterodimer vorliegt und aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Es sind jeweils zwei Isoformen der α - und der β -Untereinheit bekannt (Poulos, 2006). Die Aktivierung des Enzyms erfolgt durch NO-Bindung an die Hämgruppe.

Das durch die Guanylatzyklase gebildete cGMP kann an diversen Zielstrukturen angreifen. Diese können in drei große Gruppen eingeteilt werden: cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (Lugnier, 2006), zyklisch-Nukleotid aktivierte Kationenkanäle (CNGs) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) (Hofmann *et al.*, 2006).

Phosphodiesterasen, die in 11 PDE-Familien eingeteilt werden, hydrolysieren zyklische Nucleotide und regulieren dadurch die intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel. Man unterscheidet PDEs, die allein cGMP spalten (PDE5, PDE6 und PDE9), von rein cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterasen und von PDEs, die sowohl cGMP als auch cAMP abbauen können (Lugnier, 2006).

Zyklisch-Nucleotid aktivierte Kationenkanäle sind Ionenkanäle, die durch cAMP- oder cGMP-Bindung aktiviert werden, und von welchen sechs verschiedene Homologe unterschieden werden. Ein funktionsfähiger Kanal ist ein Tetramer aus vier Untereinheiten und transportiert unspezifisch Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . CNGs spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Photorezeptoren und olfaktorischen Neuronen, in welchen sie ursprünglich identifiziert worden waren (Biel & Michalakakis, 2009).

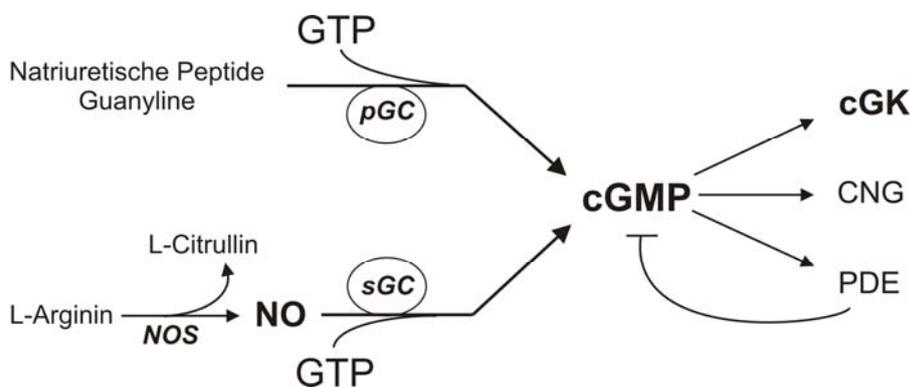


Abb. 1: NO/cGMP-Bildung und cGMP-Zielproteine

A.1.2 Pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten

In die beschriebene Signalkaskade kann in verschiedenster Art und Weise pharmakologisch eingegriffen werden: So wird das NO-freisetzende Glyceroltrinitrat (Nitrolingual[®]) wegen seiner gefäßerweiternden Eigenschaften als Pumpspray zur Behandlung des akuten Angina-pectoris Anfalls eingesetzt. Weitere NO-Donoren zur Prophylaxe von Angina-pectoris Anfällen sind Isosorbidmononitrat (ISMN; Corangin[®])

oder Molsidomin (Corvaton[®]). Dabei wird NO aus ISMN enzymatisch und aus Molsidomin nicht-enzymatisch freigesetzt, weswegen bei ISMN, nicht aber bei Molsidomin die Gefahr einer Nitratoleranz besteht (Schlossmann & Hofmann, 2005).

1998 wurde der PDE5-Inhibitor Sildenafil (Viagra[®]) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion des Mannes auf den Markt gebracht. Sildenafil erhöht den Blutspiegel von cGMP im Corpus cavernosum und führt über eine Vasodilatation zu einer verstärkten Erektion. Weitere PDE5-Hemmer sind Tadalafil (Cialis[®]) und Vardenafil (Levitra[®]). Eine gleichzeitige Einnahme von PDE5-Hemmern und NO-Donoren ist aufgrund der Gefahr eines lebensbedrohlichen Blutdruckabfalls kontraindiziert.

In der klinischen Prüfung befindet sich derzeit Riociguat, ein NO-unabhängiger, Häm-abhängiger Stimulator der sGC, welcher bei der Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie zum Einsatz kommen soll (Ghofrani *et al.*, 2010). Cinaciguat, ein NO- und Häm-unabhängiger sGC-Aktivator, soll ebenfalls positive Effekte bei pulmonaler Hypertonie aufweisen und auch bei durch Oxidation dysfunktionaler sGC wirksam sein (Chester *et al.*, 2011).

A.1.3 Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs) gehören zur Klasse der Serin/Threoninkinasen und konnten bei einer Vielzahl von Eukaryonten nachgewiesen werden. Bei Säugetieren werden zwei cGK-Gene unterschieden, *prkg1* und *prkg2*, welche für die Proteine cGKI und cGKII kodieren (Hofmann *et al.*, 2006). Der N-Terminus der cGKI (die ersten ca. 100 AS) wird durch zwei alternative Exons kodiert und ergibt die Isoformen cGKI α und cGKI β . Die cGKI ist ein lösliches, zytosolisches Protein, während die cGKII nach N-Myristoylierung in der Membran verankert vorliegt. Bei der cGK weist jedes Monomer eine regulatorische cGMP-bindende Domäne und eine katalytische Domäne auf. Im Gegensatz dazu besteht die heterotetramere Proteinkinase A aus zwei regulatorischen cAMP-bindenden Untereinheiten und zwei katalytischen Untereinheiten. Dennoch weist sowohl die regulatorische als auch die katalytische Domäne der cGKI eine größere Homologie zur PKA als zu den PDEs oder den CNGs auf, wovon sich die nahe Verwandtschaft der beiden Kinasen ableitet (Orstavik *et al.*, 1997).

Die regulatorische und die katalytische Domäne der cG-Kinasen können ihrerseits in verschiedene Bereiche gegliedert werden (s. Abb. 2) (Kim *et al.*, 2011). Die regulatorische Domäne besteht aus vier funktionellen Untereinheiten: dem N-terminalen Leuzin-Zipper, der autoinhibitorischen Domäne und den beiden cGMP-bindenden Domänen A und B. Der Leuzin-Zipper spielt eine Rolle bei der Homodimerisierung der Kinase und vermittelt die Bindung von G-Kinase Anker Proteinen (GKAPs). Da die beiden Isoformen sich in den

ersten ca. 100 Aminosäuren und somit in ihren Leuzin-Zippern bzw. N-Termini unterscheiden, zeigen sie unterschiedliche Kompartimentierungen in der Zelle und interagieren mit unterschiedlichen Substratproteinen (Casteel *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011).

Auf den Leuzin-Zipper folgt die autoinhibitorische Domäne, welche in Abwesenheit von cGMP eine Hemmung der Phosphotransferaseaktivität vermittelt. Dabei handelt es sich um eine substratähnliche Sequenz, die bei der cGKI α -Isoform die Autophosphorylierungsstelle Thr-59 beinhaltet. Bei der cGKI β -Isoform wird die Autoinhibition durch die Pseudosubstratsequenz K⁷⁵RQAI (Ein-Buchstaben-Code) verursacht (Ruth *et al.*, 1997).

Dann folgen die beiden cGMP-bindenden Domänen A und B, die sich in ihren cGMP-Affinitäten unterscheiden. Dabei ist Domäne A die hochaffine Bindungsstelle und Domäne B die niedrigaffine Bindungsstelle.

Die anschließende katalytische Domäne beinhaltet eine ATP-Bindungsstelle und eine Substratbindungsstelle.

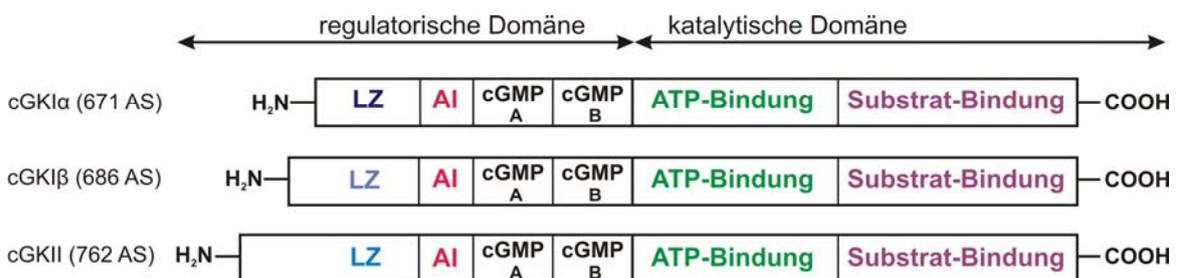


Abb. 2: Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

LZ: Leuzin-Zipper; AI: Autoinhibitorische Domäne; cGMP A/B: cGMP-bindende Domäne A/B; AS: Aminosäure

Die cGKI α -Isoform wird vor allem in Herz, Lunge und Cerebellum exprimiert, während in humanen Thrombozyten und im Bulbus olfactorius nur die cGKI β vorkommt. Beide Isoformen konnten dagegen in der glatten Muskulatur von Uterus, Blutgefäßen und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Hofmann *et al.*, 2006). Die cGKII wird in verschiedenen Bereichen des Gehirns (Hammelman *et al.*, 2011), in Chondrozyten, in der Niere, in der Lunge und in der intestinalen Mucosa exprimiert (Hofmann *et al.*, 2006). Funktionell ist sie im Dünndarm an der Sekretion von Chloridionen und Wasser beteiligt und ist außerdem bedeutend bei der CNP/cGMP-vermittelten endochondralen Ossifikation (Hofmann, 2005).

In Abwesenheit von cGMP ist die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinasen durch Wechselwirkungen zwischen den autoinhibitorischen und den katalytischen Domänen der

Kinasen gehemmt. Wichtige Aminosäuren dabei sind, wie bereits erwähnt, Thr-59 von cGKI α und die Sequenz K⁷⁵RQAI von cGKI β (Ruth *et al.*, 1997). Nach cGMP-Bindung an die beiden allosterischen cGMP-Bindungsstellen kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, damit zu einer Entfernung der autoinhibitorischen Domäne aus dem katalytischen Spalt und letztlich zu einer Enzymaktivierung (Zhao *et al.*, 1997). Eine Konformationsänderung des Enzyms wird auch durch Autophosphorylierung ausgelöst, welche nach cGMP-Bindung bei cGKI β an Ser-79 und Ser-63 und bei cGKI α an Thr-59 auftritt (Yuasa *et al.*, 2000). Schließlich steigert die Autophosphorylierung die Sensitivität der Kinase gegenüber cGMP und erleichtert die Aktivierung (Smith *et al.*, 1996).

Die maximale Aktivität des Enzyms ist bei Besetzung aller vier cGMP-Bindungsstellen der dimeren Kinase erreicht (Alverdi *et al.*, 2008).

Die beiden cGMP-Bindungsstellen unterscheiden sich in ihren cGMP-Affinitäten, Domäne A zeichnet sich durch eine langsame cGMP-Dissoziation bzw. eine hohe Affinität aus, Domäne B dagegen durch eine schnelle cGMP-Dissoziation. Die beiden Isoformen der cGKI wiederum haben ebenfalls unterschiedliche cGMP-Affinitäten, obwohl die Aminosäuresequenzen der cGMP-Bindungsstellen identisch sind (Reed *et al.*, 1997). Die K_a -Werte unterscheiden sich um den Faktor 10 und liegen in etwa bei 0,1 μ M für cGKI α und 1-1,2 μ M für cGKI β (Hofmann *et al.*, 1992). Die Selektivität der cGMP-Bindungsstellen für cGMP gegenüber cAMP liegt bei einem Faktor > 100.

Nach Aktivierung der Kinase wird das γ -Phosphat von ATP auf einen Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest eines Substratproteins übertragen. Die ideale Sequenz für eine Phosphorylierung durch die cGK lautet (R/K₂₋₃)(X/K)(S/T)X (Ein-Buchstabencode der AS, X kann jede AS sein). Die basischen Reste N-terminal der Phosphorylierungsstelle verbessern die Substrataffinität (Francis *et al.*, 2010).

Durch die cGMP-stimulierte Phosphorylierung der verschiedenen Substratproteine ergeben sich die mannigfaltigen intrazellulären Effekte von cGKI α und cGKI β .

A.1.4 Der trimere Signalkomplex

A.1.4.1 Identifikation des trimeren Makrokomplexes

Ein Substratprotein der cGKI β ist das InsP₃-Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinasesubstrat IRAG. Dieses wurde in den Membranen von glatten Muskeln der bovinen Trachea als ein durch die cGKI β phosphoryliertes neues cG-Kinasesubstrat nachgewiesen (Schlossmann *et al.*, 2000). Es konnten zwei Spleißvarianten identifiziert werden, IRAGa (130 kDa) und IRAGb, welches um 52 Aminosäuren bzw. 5 kDa kleiner als IRAGa ist. Die Expression des IRAG-Proteins konnte in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden, z.B. in den

glattmuskulären Geweben des Gastrointestinaltrakts, in der glatten Muskulatur der Blutgefäße, in der Lunge, im Herz, in Thrombozyten und im Gehirn (Schlossmann *et al.*, 2000; Geiselhoringer *et al.*, 2004a).

IRAG wurde – wie bereits der Name aussagt – in einem Makrokomplex mit der cGKI β und dem Inositoltrisphosphat-Rezeptor Typ 1 (InsP₃R-I) vorliegend entdeckt, was durch Co-Immunpräzipitation der drei Proteine mit den entsprechenden Primär-Antikörpern und durch cGMP-Agarosefällungen belegt wurde (Schlossmann *et al.*, 2000; Ammendola *et al.*, 2001). Es besteht zum einen eine direkte Interaktion zwischen IRAG und der cGKI β , genauer gesagt zwischen den Aminosäuren 152-184 des IRAG-Proteins und dem N-terminalen Leuzin-Zipper von cGKI β (Ammendola *et al.*, 2001; Casteel *et al.*, 2005). Diese Interaktion beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen sauren Aminosäuren von cGKI β (D26, E29, E31) und basischen Aminosäuren von IRAG (R124, R125) (Casteel *et al.*, 2005). Andererseits interagiert die C-terminale coiled-coil-Domäne von IRAG mit einer noch unbekannt Domäne des InsP₃R-I (Geiselhoringer *et al.*, 2004b). Eine Interaktion zwischen cGKI α und IRAG konnte nicht beobachtet werden (Ammendola *et al.*, 2001).

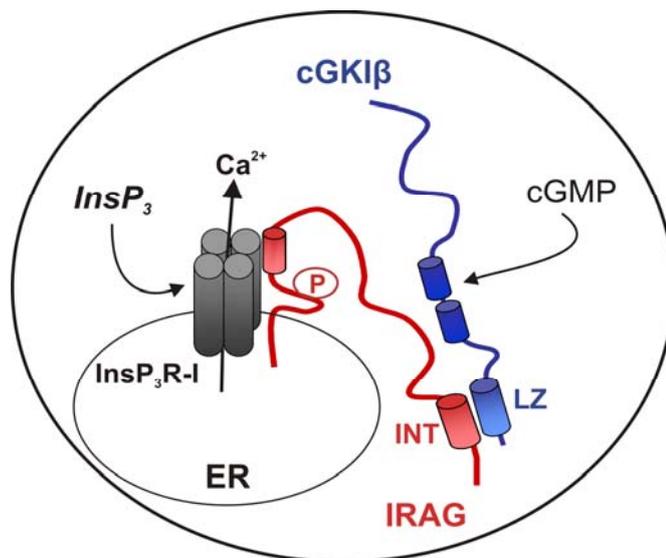


Abb. 3: Trimerer Komplex bestehend aus cGKI β , IRAG und InsP₃R-I

ER: endoplasmatisches Retikulum; INT: IRAG-Interaktionsstelle mit der cGKI β (AS 152-184); LZ: Leuzin-Zipper.

A.1.4.2 Die Inositoltrisphosphat-Rezeptoren

Inositoltrisphosphat-Rezeptoren (InsP₃R) sind durch ihren Liganden Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) aktivierte Calciumkanäle, die überwiegend in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert sind. Funktionelle Rezeptoren wurden

aber auch im Golgi-Apparat und in sekretorischen Vesikeln nachgewiesen (Taylor *et al.*, 2009). In Säugetieren wurden drei InsP_3R -Isoformen ($\text{InsP}_3\text{R-I/II/III}$) identifiziert, die durch drei verschiedene Gene kodiert werden, aus jeweils etwa 2700 Aminosäuren bestehen und zu ca. 70% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen (Serysheva *et al.*, 2003). Vom $\text{InsP}_3\text{R-I}$ wiederum sind zwei Spleißvarianten bekannt, eine neuronale, lange Form (S^{2+}) und eine periphere, kurze Form (S^{2-}) (Wagner *et al.*, 2004). In humanen Thrombozyten werden alle drei Isoformen exprimiert, dabei konnte der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in intrazellulären Membranen, der $\text{InsP}_3\text{R-III}$ in der Plasmamembran und der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ in beiden Membranarten detektiert werden (El-Daher *et al.*, 2000).

Funktionelle Kanäle bestehen aus vier Monomeren, die über ihre Transmembrandomänen und die zytosolischen C-Termini ein Homo- oder Heterotetramer ausbilden. Ein Monomer kann in fünf funktionelle Domänen eingeteilt werden: eine N-terminale Kopplungs- bzw. Suppressordomäne, eine InsP_3 -Bindungsdomäne, eine interne Kopplungsdomäne, eine Transmembran- bzw. kanalbildende Domäne und eine C-terminale „Gatekeeper“-Domäne (Uchida *et al.*, 2003; Mikoshiba, 2007). Die „Gatekeeper“-Domäne vermittelt die Öffnung des Kanals nach InsP_3 -Bindung. Dabei sind zwei Cysteinreste funktionell bedeutend: Cys2610 ist wichtig zur Erhaltung der C-terminalen Struktur und Cys2613 für die funktionelle Kopplung zwischen InsP_3 -Bindung und Kanalöffnung (Uchida *et al.*, 2003; Yule *et al.*, 2010). Der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach Aktivierung eines InsP_3 -Rezeptors kann verschiedenste Effekte auslösen, wie z.B. Glattnuskelkontraktion, Thrombozytenaktivierung oder -aggregation.

Die Aktivierung der InsP_3R erfordert sowohl InsP_3 als auch das zu transportierende Ion Ca^{2+} (Taylor & Tovey, 2011). Die Bildung von InsP_3 erfolgt nach Stimulation einer Tyrosinkinase oder eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR), der ein G-Protein der $G_{q/11}$ oder G_{16} Unterfamilie gebunden hat. Die α -Untereinheiten der G-Proteine aktivieren dann die Phospholipase C (PLC), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) katalysiert, was zur Bildung von InsP_3 und Diacylglycerol (DAG) führt. Diacylglycerol aktiviert anschließend die Proteinkinase C und InsP_3 bindet an den InsP_3 -Rezeptor (Tiruppathi *et al.*, 2002). Die InsP_3R -Subtypen unterscheiden sich in ihren Affinitäten für InsP_3 , dabei weist der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ die höchste und der $\text{InsP}_3\text{R-III}$ die geringste Sensitivität auf (Tu *et al.*, 2005). Die Bindung von InsP_3 an die InsP_3 -Bindungsdomäne führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, damit zu einer Öffnung der InsP_3R -Kanalpore und zum Ausstrom von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (Taylor & Tovey, 2011).

Die Effekte von Ca^{2+} sind vermutlich biphasisch, das heißt, dass ein geringer Anstieg des intrazellulären Calciums ($< 300 \text{ nM}$ für $\text{InsP}_3\text{R-I}$ (Tiruppathi *et al.*, 2002)) die Sensitivität gegenüber InsP_3 steigert und den InsP_3R aktiviert, während höhere Konzentrationen inhibitorisch wirken (Taylor & Tovey, 2011).

Außer durch InsP_3 und Ca^{2+} wird die Aktivität der InsP_3R auch durch ATP und verschiedene Proteinkinasen, unter anderem cGK und PKA, reguliert. Der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ enthält zwei PKA-Phosphorylierungsstellen, Ser1589 und Ser1755, wobei letztere auch die bevorzugte cGK-Phosphorylierungsstelle darstellt (Komalavilas & Lincoln, 1994). Eine PKA-Aktivierung in DT-40-Zellen, in welchen $\text{InsP}_3\text{R-I}$ exprimiert worden war, führte zu einer Steigerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung (Wagner *et al.*, 2003). Dabei waren bei Expression der S^{2-} -Form des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ beide Phosphorylierungsstellen, bei Expression der S^{2+} -Form jedoch nur Ser1755 funktionell bedeutend, was durch Untersuchung nicht-phosphorylierbarer Mutanten ermittelt wurde. Was den Effekt einer cGK-Aktivierung betrifft, so wurde festgestellt, dass die Calciumfreisetzung durch eine cGMP-stimulierte Phosphorylierung des S^{2+} - $\text{InsP}_3\text{R-I}$ gesteigert wird (Wagner *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004; Yule *et al.*, 2010). Andererseits hatte eine Aktivierung der cGK keinen Effekt in Zellen, in welchen die S^{2-} -Form exprimiert worden war (Wagner *et al.*, 2003). Es wurde angenommen, dass der S^{2-} - $\text{InsP}_3\text{R-I}$ nicht direkt durch die cGK phosphoryliert werden kann (Wagner *et al.*, 2003; Yule *et al.*, 2010).

A.1.4.3 Funktion des trimeren Komplexes

Die Funktion von IRAG bzw. des trimeren Signalkomplexes (IRAG/cGKI β / $\text{InsP}_3\text{R-I}$) wurde durch Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in COS-7-Zellen untersucht. Diese exprimieren endogen $\text{InsP}_3\text{R-I}$, wohingegen cGKI β und IRAG transient - nach Transfektion der entsprechenden Plasmide - exprimiert wurden (Schlossmann *et al.*, 2000). Es wurden zwei verschiedene Calciumsignale gemessen: ein erstes Bradykinin-induziertes und ein zweites, bei welchem vor dem Bradykinin-Stimulus mit cGMP vorinkubiert worden war. Bei gleichzeitiger Expression von IRAG und cGKI β konnte durch cGMP-Vorinkubation die zweite Calciumfreisetzung signifikant gehemmt werden. Der gleiche Effekt konnte durch direkte Zugabe von InsP_3 anstelle des Bradykinin erzielt werden (Schlossmann *et al.*, 2000). Nach Stimulation mit cGMP konnte darüber hinaus eine Phosphorylierung von IRAG beobachtet werden, die nur bei Expression von cGKI β und IRAG aber nicht bei Expression von cGKI α und IRAG auftrat (Ammendola *et al.*, 2001). Um die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von IRAG weiter zu untersuchen, wurde eine IRAG-KO-Maus generiert. Die agonistinduzierte Calciumfreisetzung konnte in IRAG-KO-VSMCs (vascular smooth muscle cells) im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen durch Vorinkubation mit cGMP nicht gehemmt werden (Desch *et al.*, 2010).

Zusammenfassend wird durch cGMP die cGKI β aktiviert, welche daraufhin IRAG phosphoryliert, wodurch die InsP₃-induzierte Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum gehemmt wird.

A.1.5 Physiologische Funktionen von IRAG

A.1.5.1 Funktion von IRAG in Thrombozyten

Die physiologische Funktion von IRAG in Thrombozyten wurde in Experimenten mit Blutplättchen von IRAG-KO-Mäusen und IRAG Δ 12-Mäusen, die das IRAG-Mutantenprotein IRAG Δ 12 ohne InsP₃R-I-Interaktionsdomäne exprimieren, untersucht.

Thrombozytenaktivierende und –hemmende Signalwege

Thrombozyten können durch Stoffe wie Collagen, Fibrinogen, ADP, Thrombin und Thromboxan aktiviert werden, während NO und Prostacyclin inhibitorisch wirken (Walter & Gambaryan, 2009). Die meisten Thrombozytenagonisten greifen an G-Proteingekoppelten Rezeptoren an und stimulieren über Aktivierung der Phospholipase C die InsP₃-vermittelte Calciumfreisetzung aus dem ER und den nachfolgenden kapazitiven Calciumeinstrom in die Thrombozyten. Der Anstieg von [Ca²⁺]_i führt zur Aktivierung der Thrombozyten, das heißt zu Adhäsion, „shape change“, Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und Granulasekretion, und schließlich zur Aggregation (Varga-Szabo *et al.*, 2009).

Endothelial gebildetes Stickstoffmonoxid dagegen aktiviert in Thrombozyten die lösliche Guanylatzyklase und führt dadurch zu einem Anstieg von cGMP, welches die cG-Kinase aktiviert. Thrombozyten exprimieren hohe Mengen cGKI, deren wichtige Rolle bei der Hemmung der Thrombozytenaktivierung anhand von cGKI-KO-Mäusen gezeigt werden konnte (Massberg *et al.*, 1999). Bei cGKI-KO-Thrombozyten konnten durch cGMP weder der „shape change“, noch die Aggregation oder die Serotoninsekretion gehemmt werden. Die cGKI-Effekte in Thrombozyten werden durch verschiedene Substrate vermittelt:

Das ans Zytoskelett assoziierte VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) kann sowohl durch die cGK als auch durch die PKA phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungen korrelieren mit einer Hemmung des Fibrinogenrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Horstrup *et al.*, 1994). Zudem zeigten VASP-KO-Mäuse eine erhöhte Thrombozyten-Adhäsion (Massberg *et al.*, 2004). An der Umorganisation des Zytoskeletts – welche eine Rolle bei der Aktivierung spielt – ist auch das Hitzeschockprotein 27 (HSP27) beteiligt (Butt *et al.*, 2001; Walter & Gambaryan, 2009).

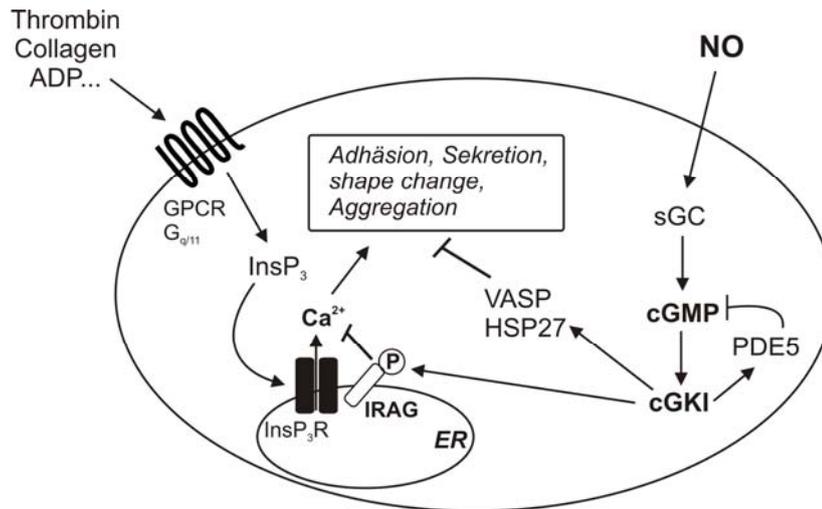


Abb. 4: Aktivierende und hemmende Signalwege in Thrombozyten

GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; ER: endoplasmatisches Retikulum; VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein; MLCK: Myosinleichtenkettenkinase; HSP27: Hitzeschockprotein 27; PDE5: Phosphodiesterase 5.

Rolle von IRAG in Thrombozyten

Auch IRAG ist in Thrombozyten ein Substrat der cGKI, durch dessen Phosphorylierung die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern gehemmt wird. Durch Vorinkubation mit NO/cGMP konnten deshalb in IRAG-KO-Thrombozyten im Vergleich zum Wildtyp die agonistinduzierte Thrombozytenaggregation, die Granulasekretion oder die Adhäsion nur wenig bzw. nicht gehemmt werden (Schinner *et al.*, 2011). Diese Dysfunktion der Thrombozyten könnte für die verlängerte Blutungszeit bei den IRAG-KO-Mäusen verantwortlich sein (Schinner *et al.*, 2011). Für die Hemmung der Calciumfreisetzung ist auch in Thrombozyten die Interaktion zwischen IRAG und dem InsP₃R-I erforderlich. Deswegen konnte die Aggregation in Thrombozyten von IRAG Δ 12-Mäusen, die ein mutiertes IRAG-Protein ohne die InsP₃R-I-Interaktionsstelle exprimieren, ebenfalls nicht durch NO/cGMP gehemmt werden (Antl *et al.*, 2007).

A.1.5.2 Funktion von IRAG in der glatten Muskulatur

Die Expression von IRAG konnte auch im Colon und in der Aorta nachgewiesen werden (Geiselhoring *et al.*, 2004a), weswegen mit diesen Geweben ebenfalls funktionelle Untersuchungen durchgeführt wurden. Sowohl Colon- als auch Aortensegmente von IRAG-KO-Mäusen zeigten, nachdem sie mit verschiedenen Agonisten vorkontrahiert worden waren, eine signifikant verminderte Relaxation auf die Gabe von NO oder cGMP (Desch *et al.*, 2010). In der Aorta konnte der gleiche Effekt auch durch Stimulation mit Acetylcholin, welches im Endothel zur NO-Freisetzung führt, und mit dem pGC-Aktivator

ANP erzielt werden (Desch *et al.*, 2010). Der basale Blutdruck von Wildtyp- und IRAG-KO-Mäusen war gleich (Desch *et al.*, 2010). Unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Sepsis nach LPS-Gabe konnte jedoch bei den IRAG-KO-Mäusen ein signifikant geringerer Blutdruckabfall als bei den WT-Mäusen beobachtet werden (Desch *et al.*, 2010). Der Blutdruckabfall wurde dabei durch eine vermehrte NO-Bildung durch die induzierbare NO-Synthase verursacht. Um die Funktion von IRAG im Magen-Darm-Trakt aufzuklären, wurden Untersuchungen mit IRAG Δ 12-Mäusen durchgeführt. Diese haben einen dilatierten Gastrointestinaltrakt und weisen eine verlangsamte Magen-Darm-Passage auf, die unter anderem durch eine Pylorusstenose verursacht sein könnte (Geiselhoring *et al.*, 2004b). Magensegmente von IRAG-KO-Mäusen zeigten darüber hinaus im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte cGMP-vermittelte Relaxation nach Vorkontraktion mit Carbachol (Ertl *et al.*, 2011). Bei elektrischer Feldstimulation nach Carbacholvorkontraktion zeigte der IRAG-KO-Magen eine langsamere Erholung von der Relaxation als der Wildtyp. Dies wurde mit einer Re-Kontraktion über einen Ca²⁺-unabhängigen Signalweg im IRAG-KO erklärt (Ertl *et al.*, 2011). Vor kurzem wurden in humanem gastrointestinalem Gewebe verschiedene mRNA-Varianten von IRAG identifiziert, die vermutlich durch alternatives Spleißen entstanden sind. Nach Expression einiger dieser Mutanten in primären humanen Colonglattmuskelzellen war keine cGMP-vermittelte Hemmung der Calciumfreisetzung mehr möglich. Die verschiedenen Spleißvarianten könnten deshalb eine Rolle bei der Entstehung gastrointestinaler Krankheiten spielen (von Werder *et al.*, 2011).

A.1.6 Weitere cGKI-Substrate und ihre Funktion

In glatten Muskelzellen wurden weitere cGKI-Substrate mit ihren jeweiligen Funktionen identifiziert:

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration spielt Phospholamban (PLB), ein 52 Aminosäure-Peptid, welches in der Membran des sarko-/endoplasmatischen Retikulums verankert ist. Unphosphoryliertes Phospholamban hemmt die Aktivität der Ca²⁺-ATPase SERCA II (**S**arcoplasmic/**e**ndoplasmic **r**eticulum **c**alcium **A**TPase), die Ca²⁺ aus dem Zytosol ins ER transportiert. Es besteht eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. Eine PLB-Phosphorylierung an Ser16 - durch die cGKI oder PKA - oder an Thr17 - durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) - verminderte die Interaktion mit der SERCA II (Tada & Toyofuku, 1998; Kim & Perrino, 2007; Glaves *et al.*, 2011). Durch die Phosphorylierung traten zusätzliche negative Ladungen im N-terminalen Bereich von PLB auf, die eine Konformationsänderung des Peptids verursachten (Tada &

Toyofuku, 1998). Die SERCA II liegt in zwei Konformationen vor, die unterschiedliche Affinitäten für Ca^{2+} haben. Nach Phosphorylierung von PLB konnte eine bevorzugte Umwandlung von SERCA in die „high-affinity“ Konformation nachgewiesen werden, wodurch die Enzymaktivität gesteigert wird (Tada & Toyofuku, 1998). Zusammenfassend wird durch die cGKI-vermittelte PLB-Phosphorylierung die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase SERCA II erhöht und damit die zytosolische Calciumionenkonzentration erniedrigt. Funktionell ist PLB ein wichtiger Regulator der Herzkontraktilität, was durch Untersuchungen mit PLB-KO-Mäusen gezeigt werden konnte (Zhang *et al.*, 2007). Versuche mit glatter Muskulatur zeigten, dass PLB-KO-Aorten weniger sensitiv gegenüber Phenylephrin als WT-Aorten waren. Beim Blutdruck war jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und PLB-KO zu beobachten (Lalli *et al.*, 1997).

Ein weiteres cG-Kinase-Substrat, das auch in einem Komplex mit IRAG nachgewiesen werden konnte, ist die PDE5. Die spezifisch cGMP-abbauende PDE5 wird vor allem in den glatten Muskelzellen der Gefäße, des Gastrointestinaltrakts aber auch in Thrombozyten, in der Lunge, im Cerebellum und im Herz exprimiert. Von der PDE5 sind 3 Isoformen beschrieben, PDE5A1, PDE5A2 und PDE5A3, die durch alternatives Spleißen des PDE5A-Gens entstehen und unter welchen die PDE5A2 die häufigste Isoform ist (Lin, 2004; Lin *et al.*, 2006). Die PDE5 wird nach cGMP-Stimulation durch die cGKI an Ser92 phosphoryliert, wodurch die Enzymaktivität und die Affinität der allosterischen Bindungsstellen für cGMP gesteigert werden (Rybalkin *et al.*, 2002; Francis *et al.*, 2010). Durch eine cGMP-unabhängige PKA-vermittelte Phosphorylierung der PDE5 wird die Affinität der katalytischen Domäne für den PDE5-Inhibitor Tadalafil erhöht, wodurch dessen Potenz gesteigert wird (Bessay *et al.*, 2008).

Eine Vielzahl von Agonisten, die an $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren angreifen, induziert neben der Phospholipase C-vermittelten InsP_3 -Produktion eine Ca^{2+} -Sensibilisierung über die kleine GTPase RhoA (Somlyo & Somlyo, 2003). Im inaktiven Zustand liegt RhoA an GDP gebunden im Zytosol vor, nach Rezeptoraktivierung und dem Austausch von GDP gegen GTP erfolgt eine Assoziation von RhoA-GTP an die Plasmamembran. Dort aktiviert RhoA die Rho-Kinase (ROCK), welche MYPT-1, die myosinbindende Untereinheit der Myosinleichtkettenphosphatase, an Thr696 phosphoryliert. Dadurch wird die Aktivität der Phosphatase gehemmt und die Myosin leichte Kette (MLC) bleibt phosphoryliert (Somlyo & Somlyo, 2003). Im Gegensatz dazu vermittelt cGKI eine Ca^{2+} -Desensibilisierung, indem sie RhoA an Ser188 phosphoryliert, wodurch der RhoA/ROCK-Signalweg durch eine Translokation von RhoA ins Zytosol gehemmt wird (Sauzeau *et al.*, 2000). MYPT-1 kann neben der Rho-Kinase auch durch die cGKI phosphoryliert werden (an Ser695), wodurch die ROCK-vermittelte hemmende Phosphorylierung reduziert wird (Gao *et al.*, 2008). Zusätzlich besteht eine Interaktion zwischen dem Leuzin-Zipper der cGKI α und dem Leuzin-Zipper von MYPT-1, die für die cGMP-vermittelte Dephosphorylierung der MLC

Voraussetzung ist (Surks & Mendelsohn, 2003). Mäuse mit einer Mutation des Leuzin-Zippers von cGKI α zeigten unter anderem eine veränderte Relaxation der Blutgefäße und einen erhöhten systemischen Blutdruck (Michael *et al.*, 2008). Der Leuzin-Zipper von MYPT-1 ist zwar für die Interaktion nicht essentiell, ein Leuzin-Zipper negatives MYPT-1-Protein war jedoch cGMP-resistent und zeigte keine Calciumdesensibilisierung (Payne *et al.*, 2006). Ein kompletter Knock-out des MYPT-1-Gens in Mäusen führte zu einer embryonalen Letalität, das heißt dass MYPT-1 für die Mausembryogenese wichtig ist (Okamoto *et al.*, 2005).

Ebenfalls ein Substrat der cGKI α ist RGS-2 (regulator of G Protein signalling 2). RGS-Proteine regulieren die Kinetik des G-Protein-Signalling, indem sie die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des trimeren G-Proteins erhöhen. RGS-2 wirkt als GAP (GTPase-activating protein) auf G $_{\alpha i}$ und G $_{\alpha q}$ und besitzt wie alle RGS-Proteine eine RGS-Domäne, die für die GAP-Aktivität erforderlich ist (Noe *et al.*, 2010). cGKI α kann RGS-2 N-terminal an Ser46 und Ser64 phosphorylieren, wodurch die GAP-Aktivität gesteigert wird (Tang *et al.*, 2003). Gleichzeitig besteht eine Interaktion zwischen dem Leuzin-Zipper von cGKI α und dem N-Terminus von RGS-2 (AS 1-79) (Tang *et al.*, 2003). RGS-2 ist erforderlich für eine normale Blutgefäßfunktion und für die Blutdruckregulation, da RGS-2 $^{-/-}$ -Mäuse hypertensiv waren und ihre Blutgefäße eine verminderte cGMP-vermittelte Relaxation aufwiesen (Tang *et al.*, 2003).

Der Ca $^{2+}$ -aktivierte und spannungsabhängige K $^{+}$ -Kanal (BK $_{Ca}$) ist der dominierende K $^{+}$ -Kanal in Arterien und ein wichtiger Regulator des Membranpotentials. Durch cGMP-stimulierte Phosphorylierung wird die Aktivität des Kanals erhöht, was zum Ausstrom von K $^{+}$ und damit zu einer Hyperpolarisation führt. In der Folge kommt es zum Schließen spannungsabhängiger Ca $^{2+}$ -Kanäle, damit zum Abfall von [Ca $^{2+}$] $_i$ und zur Glattmuskelrelaxation (Saqueton *et al.*, 1999; Schubert & Nelson, 2001). Mäuse mit einer Mutation des BK $_{Ca}$ -Kanals (Deletion der porenbildenden Untereinheit) waren hypertensiv und wiesen eine verminderte cGMP-vermittelte Vasorelaxation in kleinen Arterien auf (Sausbier *et al.*, 2005).

Die ubiquitär exprimierten TRPC-Kanäle (canonical transient receptor potential channels) sind ebenfalls wichtig bei der Regulation des Gefäßtonus. TRPC-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die in sieben Isoformen (TRPC1-7) eingeteilt werden können (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010). Nach G $_{\alpha q}$ -vermittelter Stimulation der Phospholipase C und der Bildung von InsP $_3$ /DAG kommt es nachfolgend zur Aktivierung der Kanäle, die auch am SOCE (store-operated calcium entry) in die Zelle beteiligt sind (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010). In HEK293-Zellen konnte der TRPC3 durch NO-Gabe cGK-abhängig an T11 und S263 phosphoryliert und dadurch gehemmt werden (Chen *et al.*, 2009). Die NO-induzierte Hemmung des TRPC-Kanals führte in Karotisarterien zu einer Vasorelaxation (Chen *et al.*, 2009).

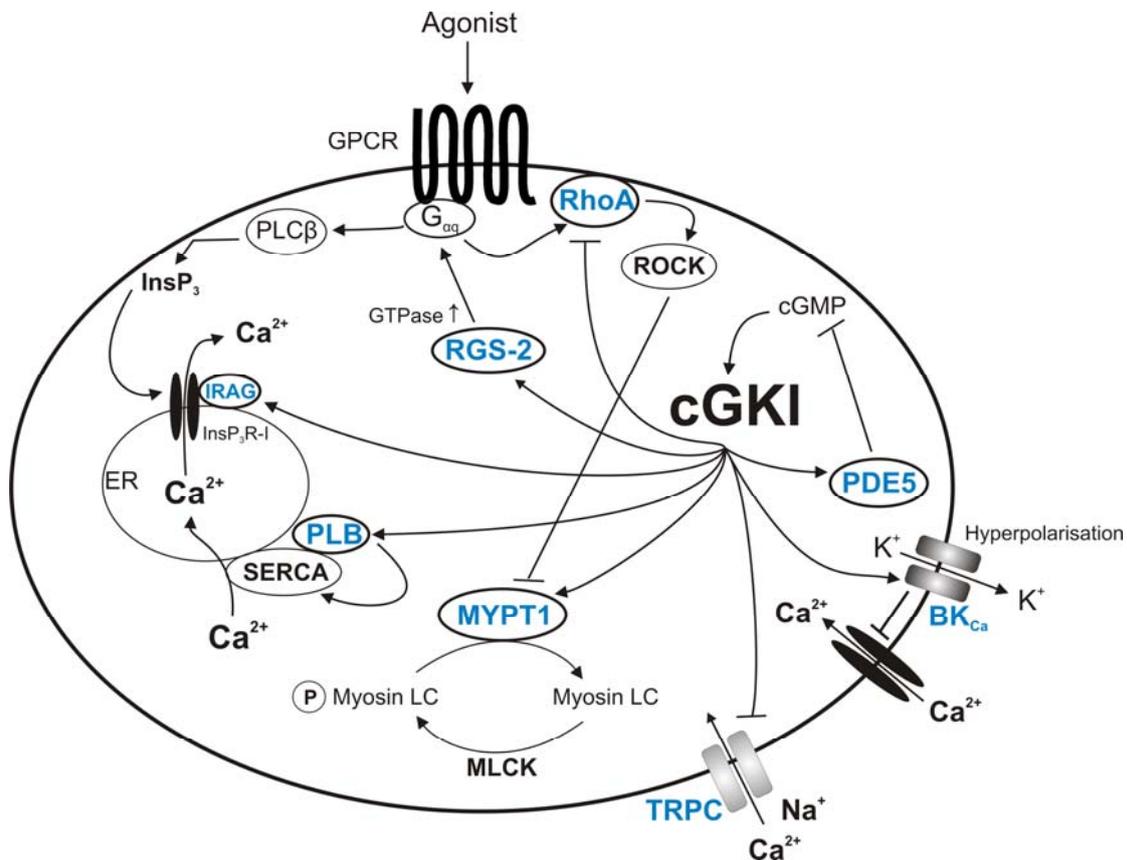


Abb. 5: Signalwege von cGKI-Substraten in einer glatten Muskelzelle

cGKI-Substrate sind in blau dargestellt, Abkürzungen s. Text; ER: endoplasmatisches Retikulum; Myosin LC: Myosin leichte Kette; MLCK: Myosinleichtkettenkinase; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor.

A.2 Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen

Proteininteraktionen, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehr Proteinen verursacht werden, beruhen auf Van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren.

Diese Interaktionen können mit Hilfe verschiedener - unter anderem chromatographischer - Methoden untersucht werden. Zur Chromatographie werden neben Co-Immunpräzipitationen auch Versuche mit GST- und His-getaggenen Fusionsproteinen und Experimente mit Agarosen, an welche zyklische Nukleotide gekoppelt wurden, eingesetzt. Bei Co-Immunpräzipitationen wird der primäre Antikörper gegen ein bestimmtes Protein an Protein A- oder Protein G-Sepharose gebunden. Protein A und Protein G sind Zellwandbestandteile von Staphylokokken bzw. Streptokokken und binden IgG (Immunglobulin G). Auf die Sepharose mit gekoppeltem Antikörper wird ein Proteingemisch (z.B. Zelllysat) gegeben und nach einer Inkubationsphase werden die gebundenen Proteine von der Matrix eluiert. Besteht eine Interaktion zwischen zwei oder

mehr Proteinen, können diese im Eluat detektiert werden, zum Beispiel mit Hilfe eines Western Blots. Stehen keine primären Antikörper für die zu untersuchenden Proteine zur Verfügung, können His- oder GST-getaggte Fusionsproteine hergestellt werden. Ein His-Tag besteht aus mindestens fünf aufeinanderfolgenden Histidinen, die am N- oder C-Terminus eines Proteins exprimiert werden. His-getaggte Proteine binden an Ni^{2+} oder Co^{2+} und können unter anderem mit Nickel-Sepharose aufgereinigt werden. Ein GST-getaggtetes Protein enthält das Enzym Glutathion S-Transferase und kann an eine Glutathion-Matrix gebunden werden. Mit zyklischen Nukleotiden kovalent vernetzte Agarosen werden verwendet, um Proteine anzureichern, die zyklische Nukleotide binden, z.B. wird cGMP-Agarose zur Bindung der cG-Kinasen eingesetzt.

Eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung von Proteininteraktionen ist auch das Hefe-Zwei-Hybrid-System, bei dem die Wechselwirkung zwischen einem sogenannten „Bait“-Protein und einem „Prey“-Protein mit Hilfe der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht wird. Besteht eine Interaktion, wird die Hefe zur Herstellung bestimmter Aminosäuren oder Nukleotide befähigt, was zum Beispiel durch einen Farbumschlag detektiert werden kann.

Weitere Methoden, die bereits im Zusammenhang mit cGK-Komplexen eingesetzt wurden, sind die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) oder das chemische „Crosslinking“ (Lee *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011).

A.3 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits der trimere Komplex aus cGKI β , IRAG und InsP₃R-I charakterisiert werden. Es sollte anhand eines mutierten IRAG-Proteins untersucht werden, ob durch Deletion der identifizierten cGKI β -Interaktionsdomäne die Wechselwirkung mit der Kinase tatsächlich aufgehoben wird. Zusätzlich sollte die Ankerfunktion dieser Mutante und die des WT-IRAG für die cGKI in COS-Zellen analysiert werden.

Mechanistisch war bereits bekannt, dass durch die cGKI β -vermittelte Phosphorylierung von IRAG die Ca²⁺-Freisetzung des InsP₃R-I aus dem ER gehemmt wird. Die Frage war nun, welche Funktion eine cGK-vermittelte InsP₃R-I-Phosphorylierung hat, da die Effekte der cG-Kinase auf den InsP₃R-I immer noch nicht vollständig geklärt sind. Dies sollte in Phosphorylierungsexperimenten mit WT- und IRAG-KO-Thrombozyten untersucht werden. Für die Versuche wurden Thrombozyten ausgewählt, da diese ein geeignetes Zellmodell für eine *in-vivo*-Phosphorylierung sind und außerdem die Funktion von IRAG bei der Aggregation und Aktivierung der Blutplättchen bereits gut charakterisiert war.

Schließlich wurden Thrombozyten und glattmuskuläre Gewebe wie Colon oder Uterus auf weitere cGK-Komplexe hin untersucht. Es werden in der Literatur immer wieder neue cG-Kinase-Interaktoren beschrieben, die eventuell auch in Thrombozyten oder im glatten Muskel funktionell bedeutend sind. Durch Untersuchung der Proteine von WT- und IRAG-KO-Mäusen sollte geklärt werden, ob IRAG ein essentieller Bestandteil der cGK-Komplexe ist und wie diese aufgebaut sind. Zur Interaktionsanalyse wurden methodisch vor allem Co-Immunpräzipitationen und cGMP-Agarosefällungen durchgeführt.

B. Material und Methoden

B.1 Materialien

B.1.1 Geräte

Geräte	Bezeichnung/Hersteller
Achatmörser mit Pistill	VWR International, Darmstadt, D
Aggregometer	Chrono-Log Corporation Aggregometer, Chrono-Log, Havertown, USA
Autoklaven	2540MK, Tuttnauer, Jerusalem, IL Varioklav H+P, Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
Blotting Apparatur	Semi-dry-Elektroblotter, VWR International, Darmstadt, D
Thermoschrank	Thermo Electron Corporation, Heraeus, Hanau, D
Densitometer	BioRad Quantity One Densitometer, Biorad, München, D
Eismaschine	AF 100, Scotsman, Mailand, IT
Elektrophoresekammer	Mini Protean Tetracell, Biorad, München, D Casting System Compact Biometra, Biometra, Göttingen, D
Iontauscher	Milli-Q water purification system, millipore, Schwalbach, D
Inkubator	für Bakterien: C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA für Zellen: Excella ECO-170, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Kamera	Polaroid GelCam, Polaroid GmbH, Offenbach, D
Kühltechnik	(-80°C) Ultra Low Temperature Freezer, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D (-20°C) Comfort, Liebherr, Salzburg, A (4-8°C) 9 6005 4, Liebherr, Salzburg, A
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments, Schwabach, D Hotplate/Stirrer, VWR International, Darmstadt, D
Mikroskop	Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena, D Axio observer Z1, Carl Zeiss, Jena, D
Operationsbesteck	FST, Bad Oeynhausen, D
PCR-Gerät	Biometra T1 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, D
pH-Meter	pH 526, WTW, Weilheim, D
Phospho-Imager	Fujifilm Image reader FLA 5000, Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, D
Photoentwickler	Cawomat 2000 IR, Cawo, Schrobhausen, D
Photometer	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, D
Schüttler	Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg, D IKA HS 260 basic, IKA Werke, Staufen, D Überkopfschüttler M 2000, Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilbank	Safeflow 1.2, nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D
Stromquellen	Power Pac 200, Biorad, München, D Whatman PS 305 T, Biometra, Göttingen, D Electrophoresis Power Supply-EPS 1001, amersham pharmacia biotech, Wien, A
Ultra-Turrax	IKA Werke, Staufen, D
UV-Transilluminator	UV-Transilluminator, UVP, Upland, California, USA Biometra Transilluminator TI 1, Biometra, Göttingen, D
Vortexer	VWR International, Darmstadt, D
Waagen	Sartorius BP 211 D (Analysenwaage), Sartorius, Göttingen, D Sartorius Extend (Feinwaage), Sartorius, Göttingen, D

Wasserbad	6 Liter Water Bath, Labnet International, Woodbridge, NJ, USA
Zentrifugen	Sorvall Super T21, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D Centrifuge 5424, eppendorf, Hamburg, D Multifuge 1L-R, Heraeus, Hanau, D Centrifuge + Vortex CM-70M, NeoLab, Heidelberg, D

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

B.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Produkt	Bezeichnung/Hersteller
Bio-RAD Dc Protein Assay (Lowry)	BioRad, München, D
Bio-RAD Protein Assay (Bradford)	BioRad, München, D
Distanzstücke	Pro-Chrono-Log Distanzstücke, Probe & Go Labordiagnostica, Leiden, NL
Falcontubes	15 ml, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Handschuhe	Latexhandschuhe rotiprotect, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Nitrilhandschuhe, VWR, Leuven, B
Kanülen	BD, Heidelberg, D Neolus 25G x 5/8, Terumo Europe, Leuven, B
Küvetten	10x10x45 mm, Sarstedt, Nümbrecht, D Uvette 50-2000 µl, Eppendorf, Hamburg, D Chrono-Log P/N 312 Cuvette, Chrono-Log, Havertown, USA
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH, Wertheim, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Photofilme	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, München, D
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, D pipet tips for gel loading, VWR international, USA
Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden, D
Plasmid Miniprep Kit	Peqlab, Erlangen, D
Platinum [®] Pfx DNA Polymerase	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Probenröhrchen	Probenröhrchen neutral 7 ml, Kabe Labortechnik, Nümbrecht, D PPTube 5 ml sterile, greiner bio-one, Frickenhausen, D
PVDF-Membran	Immobilon, Millipore GmbH, Schwalbach, D
QuiaQuick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, D
Reagiergefäß	1,5 ml, 2,0 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D Multiply - Pro Gefäß 0,2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Rührfisch	Chrono-Log Stir Bar, Chrono-Log, Havertown, USA
RNeasy mini Kit	Quiagen, Hilden, D
Serologische Pipetten	10 ml, 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpelle	Feather, Nr. 11, Feather Saftey Razor, Osaka, JP
Spritzen	1 ml, 2 ml, 5 ml und 10 ml, BD Plastikpak, BD, Heidelberg, D BD 3 ml Syringe Luer-Lok Tip, BD, Franklin Lakes, USA
Whatmanfilter	GB001 Gel blotting Papier, Whatman, Düsseldorf, D
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flask 25 und 75, Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, D

Zellschaber	BD Falcon cell scraper, BD Biosciences Europe, B
-------------	--

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

B.1.3 Chemikalien und Arzneistoffe

Produkt	Hersteller
6-Aminohexansäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
8-AEA-cAMP-Agarose	Biolog Life Science, Bremen, D
8-AET-cGMP-Agarose	Biolog Life Science, Bremen, D
8-Br-cGMP	Biolog Life Science, Bremen, D
8-pCPT-cGMP	Biolog Life Science, Bremen, D
15(R)-Iloprost	cayman chemical, ann arbor, USA
Acrylamid/Bisacrylamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Agar	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Saekem LE, Biozym, Oldendorf, D
Alsever's Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
APS	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
ATP (Adenosine 5`Triphosphate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Brilliant Blue G (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Brilliant Blue R (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Citronensäure	VWR International, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DMEM + GlutaMaX	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DNA Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
EGTA	Merck, Darmstadt, D
Entwickler/Fixierer	Ernst Christian GmbH, Planegg, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt, D
Ethanolaminagarose	Biolog Life Science, Bremen, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Forskolin	Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego, USA
Fugene HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Gene Ruler™, 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Gene Ruler™, 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Glucose, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycerol, 87%	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
H89	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Heparin-Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
HEPES	Merck, Darmstadt, D
HT Supplement 50 x	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D

KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
LB Broth, Miller	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lubrol: Nonaethyleneglycol monododecyl ether	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Luminolreagenzien: Lösung 1+2	Thermo Scientific, Rockford, USA
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg, D
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
MES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	VWR International, Darmstadt, D
NaF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
NaN ₃	Merck, Darmstadt, D
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
nichtessentielle AS	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Okadainsäure	Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego, USA
ortho-Phosphorsäure, 85%	Merck, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
PhosStop	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein G-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein Ladder (SM0669/0671)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Re-blot Plus (Stripping Solution)	Millipore, Temecula, USA
Rp-8-Br-PET-cGMPS	Biolog Life Science, Bremen, D
SDS	Merck, Darmstadt, D
Sp-5,6-Dichloro-cBIMPS	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, D
Sodiumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Thrombin	Probe & go Labordiagnostika GmbH, Osburg, D
Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Tris	USB Corporation, Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypton	BD, New Jersey, USA
Tween-20	Merck, Darmstadt, D
Yeast Extract	BD, New Jersey, USA

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Arzneistoffe

B.1.4 Verwendete Antikörper

Antikörper gegen	Art	Tier	Verdünnung im Western Blot	Herkunft
cGKI α	primär	rabbit	1:80	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKI β	primär	rabbit	1:1000	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKI γ	primär	rabbit	1:200	Lehrstuhlinterne Herstellung
Beta-Actin	primär	rabbit	1:2500	Abcam
Filamin-A	primär	rabbit	1:1000	Cell signaling
P-Filamin-A (Ser2152)	primär	rabbit	1:1000	Cell signaling
GAPDH	primär	rabbit	1:2500	Abcam
InsP ₃ R-I	primär	rabbit	1:1000	Dianova
InsP ₃ R-I	primär	goat	1:500	Santa cruz
InsP ₃ R-II	primär	goat	1:100	Santa cruz
InsP ₃ R-III	primär	mouse	1:1000	BD Biosciences
P-InsP ₃ R-I (Ser1755)	primär	rabbit	1:1000	Cell signaling
IRAG	primär	rabbit	1:500	Lehrstuhlinterne Herstellung
IRAG	primär	guinea pig	1:1000 (Immunzytochemie)	Lehrstuhlinterne Herstellung
P-IRAG (Ser664)	primär	rabbit	1:500	Lehrstuhlinterne Herstellung
PDE5A	primär	rabbit	1:500	Santa cruz
P-PDE5A (Ser92)	primär	rabbit	1:500	FabGennix
Phospholamban	primär	mouse	1:1000	Thermo scientific
VASP	primär	rabbit	1:2000	Alexis
P-VASP (Ser157)	primär	rabbit	1:500	Cell signaling
P-VASP (Ser239)	primär	mouse	1:200	Santa cruz
Mouse IgG HRP-conjugated	sekundär	donkey	1:50000	Dianova
Rabbit IgG HRP-conjugated	sekundär	goat	1:50000	Dianova
Sheep IgG HRP-conjugated	sekundär	donkey	1:50000	Dianova
Goat IgG HRP-conjugated	sekundär	rabbit	1:10000	Santa cruz
anti rabbit IgG Alexa 647	sekundär	donkey	1:200	Invitrogen
anti guinea pig Cy3	sekundär	donkey	1:1000	Dianova

Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

B.1.5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer 10 x	30 g/l Tris; 144 g/l Glycin; 10 g/l SDS; pH 8,3
Laemmli Proben-Puffer 2 x (27 ml)	28,8 g Urea; 1,5 g SDS; 1,8 g Dithiothreitol (DTT); 1,5 ml 1 M Tris pH 8,0; 6,0 ml Glycerol 50 %; 6,0 mg Bromphenolblau; ad 27 ml MQ-H ₂ O
Laemmli Proben-Puffer 6 x (10 ml)	7 ml 4 x Tris/SDS pH 6,8 (3,02 g Tris; 0,2 g SDS; ad 50 ml MQ-H ₂ O; pH 6,8); 3,6 ml Glycerin; 1 g SDS; 0,93 g DTT; 1,2 mg Bromphenolblau; ad 10 ml MQ-H ₂ O

TBS-Puffer 10 x	24,2 g/l Tris; 80 g/l NaCl; pH 7,6
TBST-Puffer	TBS; 0,05 % Tween-20
Tris-HCl Puffer 0,6 M	60 g/l Tris; 40 ml 10 % SDS; ad 1 l MQ-H ₂ O; pH 6,8
Tris-HCl Puffer 1,8 M	182 g/l Tris; 40 ml 10 % SDS; ad 1 l MQ-H ₂ O; pH 8,8
Gelpuffer Tricin-Gel	181,7 g Tris; 15 ml 10 % SDS; ad 500 ml MQ-H ₂ O; pH 8,45
Anodenpuffer Tricin-Gel	24,2 g/l Tris; ad 1 l MQ-H ₂ O; pH 8,9
Kathodenpuffer Tricin-Gel	12,1 g/l Tris; 17,9 g/l Tricine; 10 ml 10% SDS; ad 1 l MQ-H ₂ O; pH 8,25
Blotting Puffer A1	36,3 g/l Tris; 20 % MeOH; pH 10,4
Blotting Puffer A2	3,6 g/l Tris; 20 % MeOH; pH 10,4
Blotting Puffer K	3 g/l Tris; 5,8 g/l E-Aminocaprinsäure; 20 % MeOH; pH 7,6
PBS-Puffer	135 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; ad 1 l MQ-H ₂ O; pH 7,4
TAE-Puffer 50 x	242 g Tris-Base; 57,1 ml konz. Essigsäure; 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0); ad 1 l MQ-H ₂ O
5 x Gel-Loading-Puffer	50 mg Bromphenolblau; 6,0 g Glycerin; ad 20 ml MQ-H ₂ O
Proteaseinhibitoren (PI)	Endkonzentrationen: Benzamidin (1 mM), Leupeptin (0,5 µg/µl), PMSF (0,3 mM)
Proteinphosphataseinhibitoren (PPI)	Endkonzentrationen: Okadainsäure (120 nM), Natriumfluorid (50 mM), Na-orthovanadat (0,2 mM)
LB-Medium	Bacto-Trypton 10 g; Hefe-Extrakt 5 g; NaCl 10 g; ad 1 l MQ-H ₂ O; pH 7,5; Autoklavieren

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

B.1.6 Gele für SDS-PAGE und Tricin-SDS-PAGE

	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 11,5%	Sammelgel 5%
H ₂ O	8,75 ml	7,3 ml	6,5 ml	3,6 ml
30 % Acrylamid/ 0,2 % Bisacrylamid	4,25 ml	5,7 ml	6,5 ml	0,83 ml
Tris-HCl Puffer 1,8 M pH 8,8	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml	-
Tris-HCl Puffer 0,6 M pH 6,8	-	-	-	0,5 ml
10 % SDS	167 µl	167 µl	167 µl	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	10 µl
10 % APS	200 µl	200 µl	200 µl	50 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel (16,5 %)	Spacergel	Sammelgel
H ₂ O	-	1,3 ml	3,7 ml
24,25 % Acrylamid/ 0,75 % Bisacrylamid	5 ml	2 ml	1 ml
Glycerin	1 ml	-	-
Gelpuffer	2,5 ml	1,6 ml	1,55 ml
TEMED	7 µl	6 µl	12 µl
10 % APS	45 µl	20 µl	60 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung Polyacrylamidgele für Tricin-SDS-PAGE

B.1.7 Verwendete Oligonukleotide

Alle in der Tabelle aufgeführten Primer wurden von der Firma Entelechon (Regensburg) synthetisiert. Für eine PCR waren die Primer auf eine Konzentration von 25 pmol/µl eingestellt worden.

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
IP3RIm_for	GCT GGA GGA GAA TGA AGA GAA
IP3RIm_rev	GGG TCC TCC TGG TGA TAG TGG
AJ1	GGA ATT CAC CGC CAT GGT AAA AGC TCC CCA GAG T
AJ2	CGC GGA TCC CTA CTG CTC TGT AGG CTG CTC ATG
KSa1	GGG GAT CCA TCG ATG ATG CTG ATG TCT GGC AGC T
KSa2	GGG AAT TCA TCG ATC CCG GAG AGT CCT CAC CAG C

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

B.2 Methoden

B.2.1 Versuchstiere

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten aus dem Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) der Universität Regensburg. Hierbei gab es 2 Zuchten, eine in der konventionellen Haltung und eine in Barrierehaltung im SPF-Tierlaboratorium. Maximal 5 adulte Tiere wurden in Makrolon Typ II Käfigen oder maximal 12 adulte Tiere in Makrolon Typ III Käfigen nach Geschlechtern getrennt gehalten. Zur Zucht wurden jeweils 2 Weibchen, 12-30 Wochen alt, mit einem zuchtfähigen Männchen, ab 8 Wochen, in Typ III Käfigen verpaart, in welchen die Weibchen anschließend mit ihren Würfen verblieben. Als Einstreu in den Käfigen wurden autoklavierte Späne verwendet, welche bei Bedarf noch mit Nestlets ergänzt wurden. Die Futter- und Wasserversorgung der Tiere erfolgte ad libidum. Durch Heterozygoten-Verpaarung wurden zu 25% IRAG-KO-Mäuse und zu 25% WT-Mäuse erhalten, deren Genotypen mittels PCR aus Schwanzbiopsien bestimmt wurde. In

der Regel wurden für die Versuche Tiere beider Geschlechter im Alter von 8-30 Wochen verwendet, wobei idealerweise für jedes Experiment altersgleiche Tiere oder Geschwister eingesetzt wurden.

Folgende Mauslinien wurden für die Experimente eingesetzt:

- IRAG^{Δ12/Δ12}-Mutante: durch die Deletion von Exon 12 entsteht ein um ca. 5 kDa verkürztes Protein, welches nicht mehr mit dem InsP₃R-I interagieren kann.
- IRAG^{-/-}-Linie: IRAG-Gen komplett ausgeschaltet.

Alle Mauslinien wurden auf dem genetischen Hintergrund Sv/129 gezüchtet. Alle Versuche wurden gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen/Felasa (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) durchgeführt.

B.2.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

B.2.2.1 Gewinnung von Protein aus Mausgeweben

Nach zervikaler Dislokation der Mäuse wurden die Mausgewebe bzw. Organe entnommen, in PBS-Puffer gespült, um Speisereste, Blut und Kot zu entfernen, und Fremd- bzw. Fettgewebe mit einer Pinzette entfernt. Zur Hemmung der Proteolyse wurden die Gewebe schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Gewinnung des Lysates wurde das gefrorene Gewebe zuerst in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Achatmörser zerkleinert. Nach Überführen der Probe in ein PP-Röhrchen wurden 3 - 4 ml Extraktionspuffer (mit Proteaseinhibitoren (PI)) je 1 g Gewebe zugegeben und das Gemisch mit einem Ultra-Turrax homogenisiert (3 x 15 s auf Eis, dazwischen jeweils 20 s Pause). Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (18000 x g, 4 °C, 10 min) und der Überstand nach Aliquotieren bei - 80 °C tiefgefroren.

PBS-Puffer pH 7,4:

NaCl	100 mM
Na ₂ HPO ₄	80 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM

Extraktionspuffer:

Tris-HCl	20 mM; pH 8,0
NaCl	100 mM

Proteaseinhibitoren (PI):

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Benzamidin	10 mg/ml	1 mM
Leupeptin	1 mg/ml	0,5 µg/µl
PMSF	100 mM	0,3 mM

Tabelle 10: Konzentration der Proteaseinhibitoren**B.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bradfordproteinbestimmung (Bradford, 1976) ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration. Die in saurer Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 binden an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Da die Absorption bei 595 nm direkt proportional zur Proteinmenge ist, kann die Proteinkonzentration der Probe mittels einer Eichgerade mit BSA bestimmt werden. Störende Substanzen sind Detergenzien wie SDS, Denaturierungsmittel wie Harnstoff und Reduktionsmittel wie DTT.

Durchführung:

Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe (1-10 µg BSA in 100 µl MQ-H₂O) aus einer 2 mg/ml BSA-Stammlösung hergestellt. Je 1 ml Bradford-Reagenz wurde mit 100 µl der Proteinverdünnung gemischt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mit einem Biophotometer (Eppendorf BioPhotometer plus) die Absorption bei 595 nm vermessen und eine Eichgerade erstellt. Anhand dieser Eichgerade konnte die Proteinkonzentration der analog behandelten und vermessenen Proben bestimmt werden.

B.2.2.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Kann die Bradford-Proteinbestimmung zum Beispiel aufgrund von in der Probe enthaltenen Detergenzien nicht durchgeführt werden, ist die Lowry-Methode anzuwenden. Sie beruht auf zwei Reaktionen: Im ersten Schritt, der sogenannten Biuret-Reaktion, kommt es zur Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen von Proteinen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Im zweiten Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, welches das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz, bestehend aus Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren, zu Molybdänblau reduziert. Die resultierende intensive Blaufärbung kann photometrisch bei 595 nm vermessen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Bio-Rad Dc Protein Assay Kit für die Lowry-Proteinbestimmung verwendet.

Durchführung:

Jede Verdünnung einer BSA-Standardreihe (0,125 – 1,5 µg BSA in 20 µl MQ-H₂O) wurde zuerst mit 100 µl Reagenz A` (A` hergestellt aus 20 µl Reagent S + 1 ml Reagent A) und anschließend mit 800 µl Reagent B versetzt. Nach Mischen und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm vermessen und anschließend anhand der Eichgerade die Proteinkonzentration der parallel vermessenen Proben berechnet. Diese waren vorher dementsprechend mit MQ-H₂O verdünnt worden, dass ihre Extinktion innerhalb der Eichgerade lag.

B.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht. Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergens, bindet an die durch Hitze denaturierten Proteine, wobei die Anzahl der angelagerten SDS-Moleküle proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide ist. Somit ist im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich.

Durchführung:

Die in der SDS-PAGE verwendeten Gele wurden mit dem Mini-Protean-System von BioRad hergestellt, wobei zuerst ein Trenngel bis ca. zwei cm unter den Rand gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation (nach ca. 1 h) wurde das Sammelgel auf die mit Wasser gespülte Oberfläche des Trenngels gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurden die Gele zur Durchführung der Elektrophorese in Mini-Protean Tetra Cell-Kammern von BioRad eingesetzt. Die Geltaschen wurden mit 16-24 µl Probe bzw. mit 16 µl 1 x Laemmli befüllt. Dann wurde die Elektrophorese bei 150 Volt durchgeführt, bis der Proteinstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) bzw. SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (invitrogen)) das Trenngel in gewünschter Weise durchlaufen hatte.

Zur Auftrennung sehr kleiner Proteine (5-20 kDa) wurden Tricingele hergestellt, welche zwischen dem Trenngel (16,5% AA) und dem Sammelgel eine ca. 1 cm dicke Spacerschicht aufwiesen. In diesem Fall wurde die Elektrophorese die ersten 60 min bei 30 Volt, bis der Marker die Spacerschicht durchlaufen hatte, und dann bei 150 Volt durchgeführt.

B.2.2.5 Coomassie-Färbung

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau (s. auch Bradford-Proteinbestimmung) lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an und führt damit zu einer unspezifischen Blaufärbung der Proteine in einem Polyacrylamidgel.

Coomassie R-250-Färbereagenz:

Coomassie Blue R-250	1,5 g
Methanol	455 ml
konz. Essigsäure	90 ml
MQ-H ₂ O	ad 1 l

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das zu färbende Gel kurz in MQ-H₂O gewaschen und dann mit dem Färbereagenz ca. 20-30 min inkubiert. Anschließend wurde mit Entfärber (100 ml konz. Essigsäure, 300 ml Methanol, 600 ml MQ-H₂O) behandelt, bis der Hintergrund praktisch farblos war. Nach der Auswertung konnte das Gel mit etwas MQ-H₂O in Folie eingeschweißt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

B.2.2.6 Western Blot

Mit Hilfe eines Western Blots kann eine qualitative und auch quantitative Analyse ausgewählter Proteine in einem Proteingemisch durchgeführt werden. An eine SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine im Gel schließt sich der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) an. Diese kann anschließend mit den entsprechenden primären Antikörpern gegen die nachzuweisenden Proteine und danach mit sekundären Antikörpern behandelt werden. Die sekundären AK sind Peroxidasegekoppelt und ermöglichen die photochemische Detektion der Proteine.

Durchführung:

Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte mittels Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984). Hierfür wurden spezielle Filterpapiere, die auf Gelgröße zugeschnitten wurden, und eine PVDF-Membran (Millipore Immobilon[®], PVDF, 0,45 µm; Carl Roth, Karlsruhe) benötigt.

Auf der unteren Platte (Anode) der Semidry-Blotting-Apparatur wurde folgender „Stapel“ aufgeschichtet (Puffer s. B.1.5):

- 3 Filterpapiere in Anodenpuffer 1 getränkt
- 2 Filterpapiere in Anodenpuffer 2 getränkt
- PVDF-Membran in Methanol getränkt
- Gel in Anodenpuffer 2 getränkt
- 5 Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt

Vor dem Auflegen jeder neuen Schicht wurden die Luftblasen in den darunterliegenden Schichten vorsichtig ausgestrichen. Zuletzt wurde die Deckplatte der Blotting-Apparatur (Kathode) aufgesetzt und beschwert. Die Übertragung der Proteine erfolgte durch Anlegen einer Stromstärke von 60 mA pro Gel über einen Zeitraum von 60 Minuten. Tricingele wurden in gleicher Weise, nur über eine längere Zeit (75 min) geblottet.

Nach dem Blotten wurde die Membran ca. 60-90 min in 5 % Magermilchpulver (in TBST-Puffer (s. Puffer und Lösungen)) eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde 3 x mit TBST-Puffer gewaschen und die Membran anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Sollten mehrere Proteine auf derselben PVDF-Folie detektiert werden, wurde diese unter Zuhilfenahme des Proteinstandards entsprechend geschnitten und die einzelnen Abschnitte in die jeweiligen Antikörperlösungen eingelegt. Die primären AK waren mit einer Lösung aus 3 % BSA + 0,05 % NaN_3 in TBST zwischen 1:80 und 1:1000 verdünnt worden. Nach einem Waschschrift mit 1 % Milchpulver in TBST wurde mit den passenden sekundären Antikörpern (Herstellung des primären AK in Kaninchen → sekundärer AK: anti-rabbit) 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Diese waren mit 1 % Milchpulver in TBST entsprechend verdünnt worden (Verdünnungen s. Tab. 5). Nach abschließendem dreimaligem Waschen in TBST-Puffer konnte die Membran mit dem Luminolreagenz (bestehend aus Detection Reagent 1 (Peroxidlösung) und 2 (Luminol Enhancer Solution) von Thermo Scientific) behandelt werden. In Gegenwart von H_2O_2 oxidiert die an den sekundären AK gekoppelte Meerrettich-Peroxidase das Luminol, wodurch Photonen entstehen, die mit einem Röntgenfilm detektiert werden können. Es wurden gleiche Mengen der beiden Lösungen (jeweils ca. 800 μl) auf die Membran gegeben und diese etwa drei Minuten mit dem Gemisch inkubiert. Danach wurde die Membran zwischen zwei Kopierfolien in eine lichtundurchlässige Kassette (HypercassetteTM von AmershamLifeScience) gelegt und in der Dunkelkammer bei Rotlicht ein Chemolumineszenzfilm (Amersham HyperfilmTM ECL von GE Healthcare) aufgelegt, wobei die Belichtungszeit je nach verwendetem AK, vorhandener Proteinmenge und gewünschter Bandendicke zwischen 10 s und 30 min gewählt wurde. Zuletzt erfolgte die Filmentwicklung mit dem Cawomat 2000 IR.

B.2.2.7 Antikörperentfernung („Strippen“) zur Wiederverwendung der Western Blots

Die an eine Membran gebundenen primären und sekundären AK können wieder entfernt werden, um die Detektion eines zweiten Proteins auf derselben Membran zu ermöglichen. Dies geschieht durch das sogenannte „Strippen“, wobei die Re-Blot Plus Mild Solution (10 x) von Millipore verwendet wurde. Die 10 x-Lösung wurde mit Wasser verdünnt und die Membran 25 min auf dem Schüttler mit dieser Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde zuerst wieder mit Milchpulver blockiert und dann mit dem gewünschten zweiten Primär-AK behandelt. Der weitere Ablauf war wie bei der erstmaligen Immundetektion.

B.2.3 Affinitätschromatographie

B.2.3.1 Co-Immunpräzipitation

Die stabile Interaktion von Proteinen in einem Komplex kann durch Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. Dabei wird der primäre Antikörper gegen eines der zu analysierenden Proteine an eine Sepharose-Matrix gebunden und anschließend das Proteingemisch (z.B. Zelllysat oder Gewebelysat) zugegeben. Nach einer Inkubationsphase, während der das Protein und seine Interaktionspartner gebunden werden, werden die anhaftenden Proteine von der Matrix eluiert. Hierbei werden an Sepharose gekoppeltes Protein A bzw. Protein G verwendet, welche hohe Affinität zur Fc-Domäne von Antikörpern besitzen. Protein A wird aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* gewonnen und bindet sehr gut Human-IgG und in Kaninchen hergestellte Antikörper. Dagegen wird Maus-IgG₁ schwach, aber Maus-IgG₂ gut gebunden. Für die Bindung von Maus-IgG₁ und von goat- und sheep-Antikörpern ist Protein G besser geeignet (Kaboord & Perr, 2008), welches ein Zellwandprotein von Bakterien der Gattung *Streptococcus* ist.

Eine Immunpräzipitation kann unter denaturierenden oder nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Bei einer Fällung unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine zuerst durch SDS (0,5 - 1 %) und Hitze denaturiert und anschließend an die mit Antikörpern beladene Sepharose gebunden, wobei während der Proteinbindung die SDS-Konzentration nicht höher als 0,1 % sein darf. Eine Fällung unter nicht-denaturierenden Bedingungen wird in Anwesenheit von nicht-denaturierenden Detergenzien wie Lubrol (Nonaethyleneglycol monododecyl ether), Tween oder Triton X-100 oder ganz ohne Detergens durchgeführt. Außer den Fällungen für die Autoradiographie wurden alle in der Arbeit dargestellten Co-Immunpräzipitationen unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Ein wichtiger Faktor ist außerdem die

während der Proteinbindung im Puffer enthaltene Salzmenge, das heißt, dass die Bindung umso spezifischer wird, je mehr NaCl im Fällungspuffer enthalten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde als Bindungspuffer üblicherweise der 1 x Lubrolpuffer mit 150 mM NaCl eingesetzt.

Durchführung:

1 x Lubrolpuffer:

Tris-HCl, pH 8,0 20 mM
 Lubrol PX (v/v) 2 %
 NaCl 80 – 250 mM
 + Proteaseinhibitoren (PI)

Lubrolwaschpuffer:

Tris-HCl, pH 8,0 20 mM
 Lubrol PX (v/v) 0,4 %
 NaCl 150 mM

Für eine Immunpräzipitation wurden 35 µl der ethanolischen Lösung der Protein A-Sepharose (PAS) verwendet. Diese wurde im ersten Schritt 3 x mit 500 µl Lubrolwaschpuffer gewaschen. Anschließend wurde sie mit 500 µl einer Lösung von 3 % BSA in 1 x Lubrolpuffer 30 min bei 4 °C im Kühlraum auf dem Überkopfschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen an der Sepharose-Matrix zu blockieren. Danach wurde wiederum 3 x gewaschen und anschließend der primäre Antikörper (5 – 15 µl in 500 µl 1 x Lubrolpuffer) gegen das Protein, das präzipitiert werden sollte, auf die Sepharose gegeben. Die Bindung des AK erfolgte bei 4 °C zwischen 1 und 5 h auf dem Überkopfschüttler.

Währenddessen wurden die Proteine solubilisiert: Die benötigte Menge Gewebelysat wurde mit dem gleichen Volumen 2 x Lubrolpuffer wie das Lysat und mit 1 x Lubrolpuffer auf eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl verdünnt und dann 20 - 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dabei alle 5 min durch Invertieren gemischt. Nach dem Zentrifugieren (31000 x g, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand zur Präzipitation eingesetzt. Dazu wurde der Überstand (+ 1 x Lubrolpuffer mit PI ad 500 µl) auf die nach der Antikörperbindung 3 x gewaschene Sepharose gegeben und mit dieser über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Abschließend wurde die Sepharose wiederum 3 x gewaschen, um nichtgebundene Proteine zu entfernen. Die anhaftenden Proteine jedoch wurden durch Zugabe von 20 µl 1 x Laemmli von der Matrix eluiert, dann bei 95 °C 3 min denaturiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

B.2.3.2 cGMP-, cAMP- und Heparin-Agarose

Agarosen, an welche über einen sogenannten Linker zyklische Nukleotide wie z.B. cGMP oder cAMP gekoppelt wurden, ermöglichen die Aufreinigung von zyklische Nukleotide

bindenden Proteinen und deren Interaktionspartner aus Proteingemischen, z.B. Gewebelysaten. In den in der Arbeit beschriebenen Experimenten wurden die 8-AET-cGMP-Agarose, die 8-AEA-cAMP-Agarose und die Ethanolamin-Agarose, welche zur Kontrolle der unspezifischen Bindung von Proteinen an Agarose oder Linker eingesetzt wurde, verwendet. Alle Agarosen waren Produkte der Firma Biolog.

Außerdem wurden Versuche mit Heparin-Agarose (Sigma-Aldrich) durchgeführt, mit welcher unter anderem Inositoltrisphosphat-Rezeptoren aufgereinigt werden können, da Heparin ein InsP_3R -Antagonist ist.

Durchführung:

Von den Agarosen wurden jeweils 35 μl Suspension bzw. 15 μl sedimentierte Kügelchen („settled beads“) pro Fällung verwendet. Nach 3 x Waschen mit Lubrolwaschpuffer wurde mit dem Proteinüberstand (vorbereitet s. Co-Immunpräzipitation: in 1 x Lubrolpuffer, + PI) über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Stimulation mit cBIMPS (s. Abb. 30/31) wurden die Thrombozytenproteine zur Erhaltung der stimulierten Phosphorylierung jedoch nur 2 h bei 4 °C und 1 h bei RT mit der Heparin-Agarose inkubiert. Nach der Proteinbindung und wiederum 3 x Waschen folgten die Elution mit 20 μl 1 x Laemmli-Puffer, das Denaturieren der Proben bei 95 °C und die Auftrennung mittels SDS-PAGE.

Bei den Interaktionsversuchen wurde jeweils ein repräsentativer Western Blot ausgewählt und in der Arbeit abgebildet. Es waren aber immer mindestens drei vergleichbare Experimente, die das gleiche Ergebnis hatten, durchgeführt worden.

B.2.4 Phosphorylierungsexperimente

B.2.4.1 Isolierung von Thrombozyten aus Mausblut

Die Mäuse wurden mit Diethylether betäubt, bis der Herzschlag gerade noch wahrnehmbar war. Anschließend wurde der Thorax durch Abschneiden des Fells freigelegt und das Blut durch Herzpunktion - zwischen zweiter und dritter Rippe - entnommen. Hierzu wurden 3 ml-Spritzen mit Einmalkanülen (0,5 x 16 mm) verwendet, in denen 100 μl Alsever's Solution (Sigma-Aldrich) zur Gerinnungshemmung vorgelegt waren. Beim Herausziehen der Spritze wurde auf einen geringen Aspirationszug geachtet, um ein vorzeitiges Aggregieren der Thrombozyten zu vermeiden. Nach der Entnahme wurde das Blut in sterile PP-Röhrchen (5 ml; greiner bio-one) überführt, in denen 500 μl Puffer B (s. Tab. 11) enthalten waren. Danach wurde zentrifugiert (RT, 70 x g, 15 min, acceleration 9, deceleration 1), um das plättchenreiche Plasma (PRP) zu gewinnen. Der PRP-Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und zentrifugiert (RT, 5 min,

600 x g, acceleration 9, deceleration 1). Die Thrombozyten im Pellet wurden anschließend mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in Hepespuffer C (ca. 50 - 100 µl pro 2 Mäuse) resuspendiert. Das vorsichtige Resuspendieren war erforderlich, um ein Lysieren der Thrombozyten zu vermeiden. Zur Bestimmung der Proteinausbeute wurde anschließend eine Bradfordproteinbestimmung (s. B.2.2.2) durchgeführt.

Substanz	Hepespuffer B (pH 6,2)/ Hepespuffer C (pH 7,4)
Hepes	20 mM
NaCl	138 mM
KCl	2,9 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
NaH ₂ PO ₄	0,36 mM

Tabelle 11: Zusammensetzung Hepespuffer B/C

B.2.4.2 Stimulation von Thrombozyten

Die Stimulation erfolgte in 1,5 ml Eppendorf Cups bei 37 °C in einem Eppendorf Thermomixer comfort unter Schütteln bei 300 rpm. Zur Phosphatase-Hemmung wurde ein Phosphatase-Inhibitor-Mix (PhosStop von Roche) zugegeben und die Phosphorylierung am Ende der Inkubationszeit durch Zugabe von 6 x Laemmli gestoppt.

Stimulationsansatz:

Thrombozyten	50 µg
PhosStop (Roche) 20 x	0,9 µl
Inhibitor/H ₂ O 10 x	1,8 µl
Stimulans/H ₂ O	1,8 µl
HEPES pH 7,4 + PI	ad 18 µl

Wurde ein Inhibitor wie Rp-8-Br-PET-cGMPS oder H89 eingesetzt, wurde der Ansatz mit diesem 20 min lang vorinkubiert, dann erst erfolgte die Zugabe der cGMP/cAMP-Analoga. Die Menge an Proteaseinhibitoren wurde so berechnet, dass im Gesamtansatz (18 µl) die in Tabelle 10 angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden.

B.2.4.3 Detektion der Proteinphosphorylierung mit Hilfe von Phosphoantikörpern

Zur Untersuchung der Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ wurde der Phospho- InsP_3 -Rezeptor Ser1756 Antikörper von Cell Signaling (#3760) verwendet. Dieser polyklonale Kaninchen-AK erkennt laut Datenblatt nur humanen, Maus- und Ratten- $\text{InsP}_3\text{R-I}$, wenn dieser an Ser1756 phosphoryliert ist, wobei im Maus- und Ratten- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ die Aminosäure Serin an Position 1755 liegt. Deshalb wird im Folgenden – wie auch in Veröffentlichungen (z.B. Masuda et al.; 2010) - Ser1755 als $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierungsstelle genannt.

Zur Kontrolle der cGKI- und der Proteinkinase A-Aktivität wurde die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) untersucht. VASP ist ein Substrat sowohl der PKA als auch der cG-Kinase und kann an drei Stellen phosphoryliert werden: Ser157, Ser239 und Thr278. Die bevorzugte PKA-Phosphorylierungsstelle ist Ser157, während die cGK *in vitro* überwiegend Ser239 und *in vivo* beide Stellen phosphoryliert. Thr278 wird durch beide Kinasen phosphoryliert, aber erst nach der Phosphorylierung von Ser157 und Ser239 (Wentworth et al., 2006). Eine Phosphorylierung an Ser157 führt zu einem „shift“ von 46 auf 50 kDa in der SDS-PAGE, weshalb dieser als Marker der Phosphorylierung von Ser157 betrachtet wird. VASP wird normalerweise auf Höhe der 46-kDa-Bande im Polyacrylamidgel detektiert. Eine PKA-vermittelte Phosphorylierung an Ser157 führt zu einer Konformationsänderung und zu einer veränderten SDS-Bindungskapazität des Proteins (Butt et al., 1994). Dies resultiert in einer verringerten Beweglichkeit bzw. in einem veränderten apparenten Molekulargewicht in der SDS-PAGE. Das an Ser157 phosphorylierte Protein zeigt nun einen „mobility shift“ und ein apparentes Molekulargewicht von 50 kDa.

Für die Untersuchung der IRAG-Phosphorylierung wurde der P-IRAG Ser664 Antikörper verwendet. Dieser Antikörper wurde lehrstuhlintern hergestellt, nachdem analysiert worden war, dass nach cGMP-Stimulation in humanen Thrombozyten Ser664 und Ser677 durch die cGKI phosphoryliert werden (Antl et al., 2007).

B.2.4.4 Densitometrie und Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung

Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge auf den Western Blots erfolgte mit dem BioRad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer und der BioRad Quantity One 4.0.3 Software. Zuerst wurden die Western Blots am Densitometer eingescannt, dann wurden die zu vermessenden Proteinbanden durch Einzeichnen definierter, gleich großer Flächen um jede Bande eingegrenzt (s. Abb. 7 A). Zusätzlich wurde auf jedem Western Blot eine

gleich große Hintergrundfläche markiert, die als „Background“ von allen Werten vor der weiteren Auswertung abgezogen wurde. Nach dem Eingrenzen der Western Blot-Banden wurde die sog. „Volume OD/mm²“ ermittelt, die optische Dichte der eingegrenzten Fläche. Die direkte Proportionalität dieses Werts zur vorhandenen Proteinmenge wurde durch Vermessen einer Kalibriergerade (s. Abb. 6) nachgewiesen. Dabei wurden definierte Mengen einer cGMP-stimulierten Thrombozytenprobe auf ein Gel aufgetragen und die P-InsP₃R-I-Banden des Western Blots densitometrisch vermessen.

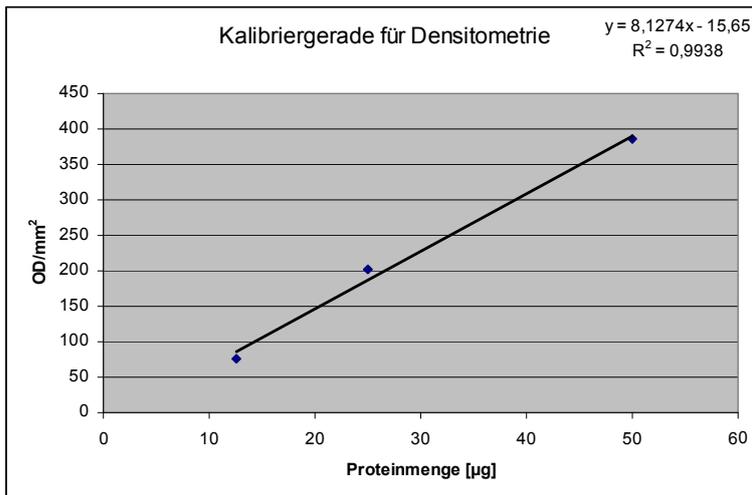


Abb. 6: Kalibriergerade für die Densitometrie

Auf ein 11,5 %-Polyacrylamidgel wurden 12,5, 25 und 50 µg einer cGMP-stimulierten Probe aufgetragen. Der Western Blot wurde mit dem P-InsP₃R-I-AK inkubiert und die Banden densitometrisch vermessen.

Die Zunahme der Phosphorylierung des InsP₃R-I und weiterer Proteine nach Stimulation wurde folgendermaßen bestimmt: Zuerst wurde von allen OD-Werten der zu untersuchenden Banden eines Western Blots der Hintergrundwert abgezogen. Dann wurde der Quotient aus dem Wert der stimulierten Probe und dem der unstimulierten Probe gebildet. Hatte eine Phosphorylierung durch die Kinase stattgefunden, musste der Wert größer 1 sein. Zuletzt wurde dieser Wert auf den Gehalt an Gesamtprotein in jeder Probe, das heißt die Summe aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein, bezogen. Dies war erforderlich, da es möglich sein kann, dass die Menge an phosphoryliertem Protein nur größer war, weil auch mehr Gesamtprotein in dieser Probe enthalten war. Dafür musste der Western Blot gestrippt und mit dem jeweiligen Gesamt-AK inkubiert werden. Anschließend wurden die mit dem Gesamt-AK detektierten Banden ebenfalls densitometrisch vermessen. Wichtig war, dass immer ein „Pärchen“ gemeinsam vermessen wurde, also eine stimulierte und eine unstimulierte Probe.

A**B**

$$\text{Zunahme der Phosphorylierung} = \frac{\frac{\text{Wert stimulierte Probe (Phospho-AK)}}{\text{Wert unstimulierte Probe}}}{\frac{\text{Wert stimulierte Probe (Gesamt-AK)}}{\text{Wert unstimulierte Probe}}}$$

Abb. 7: Bestimmung der Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation

A) Es wurden gleich große Flächen um die Banden von stimulierter (3) und unstimulierter Probe (2) eingezeichnet. Zusätzlich wurde eine gleich große Hintergrund-Fläche (1) auf jedem Western Blot markiert. Der Hintergrundwert wurde von den OD-Werten der stimulierten und der unstimulierten Probe abgezogen. Mit den dadurch erhaltenen Werten wurde die Zunahme der Phosphorylierung berechnet.

B) Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation einer Probe: Es musste zusätzlich der Gehalt an Gesamtprotein in jeder Probe miteinbezogen werden.

Aus den Phosphorylierungswerten von WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten wurde jeweils der Mittelwert (+/- SEM) bestimmt. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen allen drei Mauslinien wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way Anova) mit nachfolgendem Bonferroni-Test durchgeführt und zum Vergleich zweier Gruppen der Student t-Test. Signifikante Unterschiede: $p < 0,05$ /*; hoch signifikant: $p < 0,01$ /**; höchst signifikant: $p < 0,001$ /**.

B.2.4.5 *In-vivo*-Phosphorylierung mit $^{33}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ und Autoradiographie

Die *in-vivo*-Phosphorylierung mit ^{33}P wurde mit Thrombozyten durchgeführt, welche wie bereits vorher beschrieben isoliert und dann in HEPES-Puffer C + Proteaseinhibitoren aufgenommen wurden und deren Proteingehalt anschließend durch eine Bradfordbestimmung ermittelt wurde. Pro Probe wurden 420 μg Thrombozyten und 200 μCi $^{33}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ (Konzentration: 20 mCi/ml; Hartmann Analytik) pro 100 μg Protein eingesetzt.

Durchführung:

RIPA-Correction-Puffer:

Igepal CA-630	1,25 %
Natriumdesoxychololat	1,25 %
Natriumphosphat pH 7,2	12,5 mM
EDTA	2 mM

SDS-Lysepuffer (1 x):

SDS	0,5 %
Tris/HCl pH 8,0	0,05 M
DTT (frisch dazu)	1 mM

Phosphataseinhibitoren (PPI):

Okadainsäure (Calbiochem)	120 nM
Natriumfluorid (Sigma-Aldrich)	50 mM
Na-orthovanadat (Sigma-Aldrich)	0,2 mM

Vorbereiten der Protein A-Sepharose für die Fällung:

- 35 µl Protein A-Sepharose-Suspension (bzw. 15 µl sedimentierte Kügelchen) pro Probe
- 3 x Waschen mit RIPA-Puffer (= 4 Teile RIPA-Correctionpuffer + 1 Teil SDS-Lysepuffer)
- Antikörperbindung: 5 µl InsP₃R-I-AK in 500 µl RIPA-Puffer → mindestens 2,5 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert
- PAS 3 x mit RIPA-Correctionpuffer gewaschen, um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen

In-vivo-Phosphorylierung:

- Inkubation der Thrombozyten mit Phosphorsäure (200 µCi/100 µg Protein, Konz. der Stammlösung 20 mCi/ml) und dem gleichen Volumen 2 x HEPES (+PI): 1,25 h bei 37 °C ohne Schütteln
- Zentrifugation: 2 min, 1000 x g, RT; Überstand verworfen
- Pellet vorsichtig in 1 x HEPES (+PI) resuspendiert: 27 µl Puffer pro Probe
- Zugabe von 3 µl 10 x cGMP (10 mM 8-Br-cGMP, 2 mM 8-pCPT-cGMP): Stimulation 30 min bei 37 °C unter Schütteln mit 300 rpm
- Abstoppen der Phosphorylierung durch Zugabe von 1,5 x SDS-Lysepuffer (+PI/+PPI)
- Denaturieren der Proteine: 3 min 95 °C
- Abnahme der VASP-Kontrolle (20 µg Gesamtprotein)
- Zugabe des 4-fachen Volumens RIPA-Correctionpuffer (+PI/+PPI) zur Probe
- Solubilisieren auf Eis: 10 min, dabei mehrmals invertiert
- Zentrifugation: 25 min, 15000 rpm, 4 °C

Immunpräzipitation und Western Blot:

- Überstand auf vorbereitete Protein A-Sepharose gegeben
- Proteinbindung: 2,5 h Inkubation bei 4 °C auf Überkopfschüttler
- Dreimaliges Waschen der Protein A-Sepharose mit je 500 µl RIPA-Correctionpuffer (+PPI)
- Elution der gebundenen Proteine mit 20 µl 1 x Laemmli
- SDS-PAGE (10 %-Acrylamidgel), Blotten (PVDF-Membran, 1 h bei 60 mA pro Gel)

Bestimmung der Phosphorylierung durch Autoradiographie:

- Über Nacht (ca. 15 h) wurde eine Imaging Plate (Fujifilm Life Science) auf die Membran aufgelegt
- Auslesen der Imaging Plate mit dem Fujifilm Image reader FLA 5000 (im Modus IP) und Auswerten der Daten mit dem Programm Aida Analyzer v.4.27
- Bestimmung der optischen Dichte der InsP₃R-I-Banden: Vermessen einer gleich großen Fläche um jede InsP₃R-I-Bande und zusätzlich Vermessen einer gleich großen Hintergrundfläche
- Die Zunahme der Phosphorylierung des InsP₃R-I wurde folgendermaßen bestimmt (s. auch B.2.4.4):
 - Von jedem Intensitätswert wurde zuerst der Hintergrundwert abgezogen
 - Die Zunahme der Phosphorylierung ergab sich aus dem Verhältnis von Wert stimulierte Probe/Wert unstimulierte Probe
 - Anschließend wurde dieser Wert auf die jeweilige Menge an Gesamtprotein bezogen (nicht-phosphorylierter + phosphorylierter InsP₃R-I in der Probe): dafür musste die Membran gestriipt, mit anti-InsP₃R-I-AK inkubiert und anschließend die Chemolumineszenz detektiert werden. Die Dichte der InsP₃R-I-Banden wurde densitometrisch bestimmt (s. B.2.4.3/4).
- Zur Kontrolle der Aktivität der cGKI wurde die VASP-Phosphorylierung an Ser239 bestimmt (s. B.2.4.3).

B.2.4.6 Isolierung von Thrombozyten aus Humanblut

Es wurden pro Versuchsreihe jeweils 30 ml Humanblut von gesunden männlichen Probanden abgenommen, wobei pro 10 ml-Spritze (Becton Dickinson) je 1 ml Citratpuffer vorgelegt war, wodurch die vorzeitige Thrombozytenaggregation gehemmt werden sollte.

Citratpuffer: sterilfiltriert

Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	85 mM
Citronensäure	70 mM
Glucose	110 mM

Anschließend wurde das Blut in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (300 x g, RT, 20 min). Das Pellet wurde jeweils verworfen und der Überstand bei 300 x g 10 min zentrifugiert. Die daraus resultierenden Überstände wurden vereinigt und nochmals 15 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Das nun erhaltene Thrombozytenpellet wurde 1 x in ca. 5 ml Hespuffer C gewaschen und dann in Hespuffer plus Proteaseinhibitoren aufgenommen (ca. 100 µl pro 30 ml Blut). Nach der Proteinbestimmung wurden die Thrombozyten auf die gleiche Weise wie die Mausthrombozyten stimuliert.

B.2.4.7 Aufschluss und Phosphorylierung von Aortengewebe

Für eine Versuchsreihe wurden die Aorten von 2-3 Mäusen entnommen und nach Entfernen von Blut und Fettgewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Gegensatz zum Colongewebe wurden die Aorten aufgrund der geringen Gewebemenge mit Detergens aufgeschlossen, und zwar mit dem nicht-denaturierenden Detergens Lubrol. Sie wurden zuerst gefroren mit dem Skalpell zerkleinert und dann in 1 x Lubrolpuffer (s. Co-Immunpräzipitation, 150 mM NaCl) lysiert. Dafür wurde das Gewebe in einem Eppendorff-Cup mit dem Lysepuffer versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zum Tauen mit einem Metallstößel homogenisiert, was 3- bis 4-mal wiederholt wurde. Nach dem Abzentrifugieren (18000 x g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand für die Stimulation eingesetzt. Die Stimulation des Aortenlysates erfolgte in Anwesenheit von MES-Puffer 10 x und erforderte außerdem die Zugabe von ATP als Phosphatquelle. Ansonsten wurde sie in gleicher Weise wie die Thrombozytenstimulation durchgeführt.

Phosphorylierungsansatz:		MES-Puffer 10 x:	
Gewebe	30 – 50 µg	MES pH 6,9	500 mM
MES-Puffer 10 x	1,8 µl	NaCl	100 mM
ATP 10 mM	1,8 µl	MgAc ₂	10 mM
PhosStop 20 x	0,9 µl	EGTA	4 mM
cGMP/H ₂ O	1,8 µl		
H ₂ O mit PI ad	18 µl		

B.2.5 Messung der Thrombozytenaggregation

B.2.5.1 Isolierung von Thrombozyten

Die Isolierung der Mausthrombozyten erfolgte in gleicher Weise wie in B.2.4.1, allerdings wurden die Thrombozyten in etwa 1 ml Hepespuffer C pro Maus aufgenommen.

B.2.5.2 Messung der Thrombozytenaggregation mit dem Luminoaggregometer

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte durch Messung der Lichttransmission einer Thrombozytensuspension mit dem Zwei-Kanal-Aggregometer von Chrono-Log. An die Probenröhrchen (Chrono-Log P/N 312 Cuvette) wurden Distanzstücke geklebt, damit das geringe Probenvolumen von 250 µl anstatt von 500 µl vermessen werden konnte. Es wurden immer zwei Proben gleichzeitig vermessen: eine Kontrolle in Kanal 1 und in Kanal 2 eine Probe, die mit cGMP vorinkubiert wurde. Die Thrombozyten wurden zuerst 5 min bei 37 °C equilibriert, dann wurde für 10 bzw. 30 min mit 1 mM 8-Br-cGMP bzw. in der Kontrolle mit dem cGMP-Solvens H₂O vorinkubiert. Für die Messung der Aggregation wurden die Küvetten in eine Öffnung zwischen Lichtquelle und Photodetektor gestellt. Um die physiologischen Scherbewegungen nachzuahmen, wurde die Thrombozytensuspension während der Messung mit einem Rührstäbchen (1000 rpm) in Bewegung gehalten. Nach dem Absorptionsabgleich beider Proben wurde die Aggregation durch Zugabe des Agonisten gestartet. Die am Anfang sehr fein verteilte Thrombozytensuspension hatte eine geringe Lichtdurchlässigkeit, welche nach Agonistzugabe durch den „shape change“ der Thrombozyten (Übergang von einer flachen Form in Kugelgestalt) zuerst noch weiter abnahm. Anschließend nahm die Transmission durch die Zusammenlagerung der Thrombozyten zu größeren Aggregaten jedoch immer mehr zu, was sich in einem Abfall der kontinuierlich aufgezeichneten Kurve bemerkbar

machte. Dabei wurde im Diagramm auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse die Transmission von 100 – 0 % dargestellt. Der Kurvenverlauf wurde für jedes Experiment über ca. 5 min aufgezeichnet, bevor die Auswertung erfolgte.

B.2.5.3 Auswertung und Statistik

Die Aufzeichnung der Aggregation und die Auswertung erfolgten mit dem Programm Aggrolink (Aggro/Link control software für windows Version 5.2.2). Als Parameter für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Kurve (slope) verwendet, welche ein Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit und somit für die maximale Aggregationsrate ist. Die Steigungen für Kontrolle und cGMP-stimulierte Probe wurden aus einem 3-Minuten-Abschnitt der Kurve nach dem „shape change“ bestimmt. Die Hemmung der Aggregation nach cGMP-Gabe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hemmung der Aggregation [\%]} = \left(1 - \frac{\text{Steigungswert: + cGMP}}{\text{Steigungswert: - cGMP}} \right) \times 100\%$$

Abb. 8: Formel zur Berechnung der Aggregationshemmung

Aus den WT- und den IRAG-KO-Werten wurde jeweils der Mittelwert (+/- SEM) berechnet und signifikante Unterschiede mittels Student t-Test ermittelt, wobei signifikant ($p < 0,05$) mit *, hoch signifikant ($p < 0,01$) mit ** und höchst signifikant ($p < 0,001$) mit *** angegeben wurde.

B.2.6 Molekularbiologische Methoden

B.2.6.1 RNA-Isolierung aus Thrombozyten

Zur Bestimmung der in Thrombozyten vorkommenden $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Spleißvarianten (s. Abb. 13) wurde aus humanen Thrombozyten und aus Mausthrombozyten RNA isoliert, welche anschließend durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt wurde.

Zuerst wurden aus 40 ml humanem Vollblut und aus murinem Blut die Thrombozyten nach bereits beschriebenem Protokoll isoliert. Anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen, in welchem alle benötigten Pufferlösungen und Säulen enthalten waren, nach der beiliegenden Anleitung aufgereinigt. Zur Elution von der Säule wurde DEPC- H_2O verwendet, welches zur Inaktivierung von RNasen Diethylpyrocarbonat (DEPC) enthält. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C , da RNA sehr instabil ist.

Nach der Isolierung wurde mit dem Eppendorff Biophotometer die RNA-Konzentration, welche für die RT-PCR bekannt sein muss, bestimmt. Dazu wurden die RNA-Proben 1:20 mit H₂O verdünnt und die Absorption bei 260 nm vermessen. Dabei entspricht – bei einer Schichtdicke von 1 cm - eine OD₂₆₀ von 1.0 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Bei DNA entspricht eine OD₂₆₀ von 1.0 einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit von RNA/DNA ergibt sich aus dem Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀, da bei 280 nm das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Der Wert sollte größer 1,7 sein, sonst besteht eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen.

B.2.6.2 RT-PCR

Mit der isolierten RNA wurde eine Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Dabei synthetisiert eine reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) cDNA (complementary DNA) aus der RNA:

Es wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt, die mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 9 µl verdünnt wurden. Anschließend wurde 1 µl oligo dT (0,5 µg/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) dazugeben und der Ansatz zum Primer-Annealing 5 min auf 65 °C erhitzt. Währenddessen wurde der Mastermix für die Reverse Transkription hergestellt:

Bestandteil	Menge [µl]	Herkunft
dNTP (2,5 mM)	4,0	Fermentas
5 x first strand Puffer	4,0	invitrogen
DEPC-H ₂ O	2,5	
RNAsin	0,5	Promega
RT (M-MLV)	1,0	invitrogen

Tabelle 12: Mastermix für die Reverse Transkription

Pro Probe wurden 12 µl Mix dazugegeben, der Ansatz gemischt und kurz abzentrifugiert. Dann wurde im Blockcycler zuerst 1 h bei 37 °C und anschließend 2 min bei 95 °C, wodurch das Enzym inaktiviert wurde, inkubiert. Die erhaltene cDNA diente als Template für die nachfolgende PCR.

B.2.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) können unter Verwendung spezifischer Primer – die als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen - ausgewählte DNA-Abschnitte einer Template-DNA (Matrize) vervielfältigt bzw.

angereichert werden. Ein PCR-Prozess verläuft in einer Reihe von Zyklen (20 - 40), die aus drei Reaktionsschritten bestehen: der Denaturierung bei 94 - 96 °C zur Trennung des Doppelstranges in zwei Einzelstränge, der Primerhybridisierung bei 55 - 65 °C und schließlich der Elongation des komplementären Stranges durch die Polymerase bei 68 - 72 °C.

Für die PCR zur Identifizierung der InsP₃R-I-Splicevarianten wurde ein Primerpaar verwendet, welches die im S²-InsP₃R-I deletierten Exons flankiert und mit welchem die beiden Varianten detektiert und unterschieden werden können:

IP3RIm_for: 5`-GCT GGA GGA GAA TGA AGA GAA-3`

IP3RIm_rev: 5`-GGG TCC TCC TGG TGA TAG TGG-3`

Es wurden PCR-Reagenzien von Promega (aTaq DNA Polymerase (5u/µl), Thermophilic DNA Polymerase 10 x Puffer, MgCl₂ 25 mM) und Fermentas (dNTP Mix, 10 mM each) verwendet.

PCR-Ansatz:

MgCl ₂ 25 mM	5 µl
Mg-freier Puffer 10 x	5 µl
DMSO	5 µl
dNTP (10 mM)	2,5 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
aTaq	0,25 µl
DNA	5 bzw. 7 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl

PCR-Programm:

94 °C	2 min
95 °C	30 s
53 °C	30 s
72 °C	30 s 35 Zyklen
4 °C	Pause

B.2.6.4 Agarosegelelektrophorese

DNA besitzt einen negativ geladenen „Backbone“ aus Zucker und Phosphat und kann deshalb im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Masse aufgetrennt werden. Dies erfolgt mittels der Agarosegelelektrophorese, wobei die Sichtbarmachung der DNA durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid ermöglicht wird. Der Phenanthridin-Farbstoff Ethidiumbromid ist ein DNA- bzw. RNA-Interkalator. Durch die Einlagerung zwischen einzelne Basen eines DNA-Stranges wird sein Anregungsspektrum verändert, wodurch die Fluoreszenz der Substanz nach Anregung mit UV-Licht stark erhöht wird.

Durchführung:

Zur Herstellung der Agarosegele wurde zunächst Agarose (Biozym LE Agarose) in 1 x TAE-Puffer mittels Erwärmen in der Mikrowelle aufgelöst. Anschließend wurden 2 µl Ethidiumbromid-Lsg. (10 mg/ml in H₂O) pro 100 ml Gel in die flüssige aber etwas abgekühlte (ca. 60 °C) Agaroselösung gegeben, welche dann in die Compact-Gelkammern von biometra ausgegossen wurde. Daraufhin wurde ein Kamm für den Probenauftrag eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurden die PCR-Proben, welche zuvor mit 5 x Gel-Loading-Puffer versetzt worden waren, in die Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich der PCR-Fragmente wurden zwei verschiedene DNA-Standards eingesetzt, die 1 kb und die 100 bp protein ladder von Fermentas. Die Auftrennung der Proben erfolgte in Elektrophoresekammern von biometra in 1 x TAE-Puffer unter Anlegen einer Spannung von 120 Volt über ca. 60 min.

B.2.6.5 Generierung von IRAG Δ Int in pcDNA3.1(-)

Der die IRAG Δ Int-cDNA enthaltende Vektor wurde in zwei Schritten hergestellt: Bei der Interaktionsstelle, die im IRAG deletiert werden sollte, handelt es sich um eine Sequenz innerhalb des Proteins, die Aminosäuren 152-184. Deshalb wurden zuerst die beiden Abschnitte, die für den N-terminalen (als 1-x bezeichnet) und den C-terminalen (x-3) Bereich kodieren, jeweils getrennt über EcoRI/BamHI in die „multiple cloning site“ eines pcDNA3.1(-)-Vektors kloniert. Die für den C-terminalen Bereich kodierende Sequenz enthielt zusätzlich ein Stop-Codon. An beide Fragmente wurde eine ClaI-Schnittstelle angefügt, bei 1-x lag diese am 3`-Ende und beim x-3-Fragment am 5`-Ende. Anschließend wurden beide Vektoren mit den Restriktionsenzymen BamHI/ClaI geschnitten, wodurch ein Einfügen des x-3-Fragments in den (1-x) enthaltenden pcDNA3.1(-)-Vektor möglich wurde. Der fertige Vektor enthielt dann die Abschnitte 1-x und x-3, welche durch eine ClaI-Schnittstelle miteinander verbunden waren (s. Abb. 9). Der verwendete pcDNA3.1(-)-Vektor ist für eine „high-level“ konstitutive Expression von cDNA in einer Vielzahl von Säugetierzellen, zum Beispiel COS-Zellen oder HEK-Zellen, besonders gut geeignet.

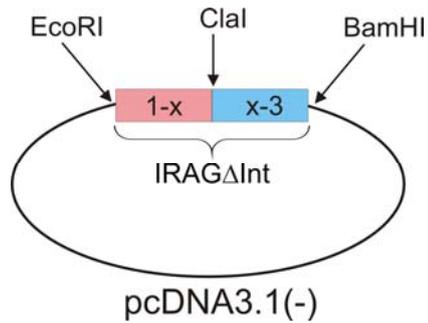


Abb. 9: Darstellung von IRAG Δ Int im pcDNA3.1(-)-Vektor

Zur Generierung des Vektors wurden die drei Restriktionsenzyme EcoRI, Clal und BamHI verwendet.

B.2.6.6 PCRs zur Generierung der IRAG Δ Int-cDNA

Als erster Schritt bei der Herstellung der IRAG Δ Int-cDNA wurden die beiden PCRs zur Generierung von 1-x und x-3 durchgeführt, wobei als Template die bovine IRAGa-DNA in pcDNA3.1(-)-Vektor (invitrogen) diente.

Name	Sequenz und Schnittstellen
AJ1	5'-GGA ATT CAC CGC CAT GGT AAA AGC TCC CCA GAG T-3' (N-terminaler Primer zur Generierung von 1-x mit einer synthetischen EcoRI Restriktionsschnittstelle)
AJ2	5'-CGC GGA TCC CTA CTG CTC TGT AGG CTG CTC ATG-3' (C-terminaler Primer zur Generierung von x-3 mit einer synthetischen BamHI Restriktionsschnittstelle und einem Stop-Codon)
KSa1	5'-GGG GAT CCA TCG ATG ATG CTG ATG TCT GGC AGC T-3' (C-terminaler Primer zur Generierung von 1-x mit je einer synthetischen BamHI und Clal Restriktionsschnittstelle)
KSa2	5'-GGG AAT TCA TCG ATC CCG GAG AGT CCT CAC CAG C-3' (N-terminaler Primer zur Generierung von x-3 mit je einer synthetischen EcoRI und Clal Restriktionsschnittstelle)

Tabelle 13: Verwendete Primer zur Herstellung der IRAG Δ Int-cDNA

Für die PCRs im Rahmen der Klonierung von IRAG Δ Int in pcDNA3.1(-) wurden die Platinum Pfx DNA Polymerase, der Pfx Amplifikations Puffer 10 x, die MgSO₄- und die Enhancer-Solution 10 x von Invitrogen verwendet.

PCR-Ansatz:		PCR-Programm:	
Template-DNA	10 ng	94 °C	5 min
Pfx Amplifikations Puffer 10 x	5 µl	95 °C	30 s
dNTP (25 mM)	0,7 µl	55 °C	30 s
MgSO ₄	1 µl	72 °C	1 min/2 min 30 x
Enhancer Solution 10 x	5 µl	4 °C	Pause
Primer forward (25 pmol/µl)	1 µl		
Primer reverse (25 pmol/µl)	1 µl		
Pfx-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl		
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl		

Nach der PCR wurde der Ansatz mit 5 x Gel-Loading Puffer versetzt, auf ein 2 %-Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese bei 120 V durchgeführt (s. B.2.6.4).

B.2.6.7 Gelextraktion

Die mittels PCR generierte DNA wurde aus dem Agarosegel isoliert, indem zuerst unter UV-Licht mit dem Skalpell Gelstücke ausgeschnitten wurden, welche die gewünschte DNA enthielten. Anschließend wurde diese daraus mit Hilfe des QIAquick Gel extraction kit von Qiagen, in welchem alle benötigten Pufferlösungen und Säulen enthalten waren, aufgereinigt. Dabei wurde zuerst das Gelstück unter Erwärmen in einem Hochsalzpuffer aufgelöst, der einen pH-Indikator enthielt, um einen optimalen pH-Wert gewährleisten zu können. Dann wurde die DNA an eine spezielle Säule, eine Silicamembran, gebunden, von welcher sie mit H₂O wieder eluiert wurde. Zuletzt wurde mit dem Biophotometer die DNA-Konzentration des Eluats bestimmt.

B.2.6.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen (REN) sind Bakterien-Enzyme, die DNA an bestimmten Positionen schneiden. Die Erkennungsstellen der REN sind meist palindromische Sequenzen von sechs oder acht Basenpaaren, wobei der Schnitt gerade (blunt ends) oder versetzt (sticky ends) sein kann. An den Enden ist nach dem Schneiden jeweils eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe vorhanden, was eine nachfolgende Ligation ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum Klonieren der IRAG Δ Int-cDNA die Enzyme EcoRI, BamHI und ClaI, sowie die entsprechenden Puffer- und BSA-Lösungen von New England Biolabs (NEB) verwendet. Bei einem präparativen Restriktionsverdau wurden 2 µg DNA,

bei einem analytischen zur Vektorkontrolle ca. 0,5 µg in einem Gesamtvolumen von 15 - 50 µl geschnitten. Der für den jeweiligen Verdau passende 10 x-Puffer wurde nach einer NEB-Tabelle ausgewählt, die auch anzeigt, ob BSA im Ansatz erforderlich war.

Die Proben wurden 2 h unter Schütteln auf dem Eppendorff thermomixer bei 37 °C inkubiert und anschließend der Verdau durch Zugabe von DNA-Loading Puffer abgestoppt. Dann wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Bei einem präparativen Restriktionsverdau wurden die Banden anschließend ausgeschnitten und die DNA mit dem „Gel extraction kit“ aufgereinigt.

B.2.6.9 Ligation

Bei einer Ligation werden zwei DNA-Segmente durch das Enzym Ligase an ihren Enden durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Zur Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3, was sich auf die Anzahl der DNA-Moleküle bezieht, eingesetzt und die entsprechenden Mengen in ng nach folgender Formel berechnet:

$$x \text{ ng Insert} = (3 \times \text{Anzahl Basenpaare Insert} \times 100 \text{ ng Vektor}) / \text{Anzahl Basenpaare Vektor}$$

Ligationsansatz:

T4 DNA Ligase-Buffer 10 x	2,0 µl
Vektor-DNA	x µl
Insert-DNA	x' µl
H ₂ O	ad 20 µl → 20 min bei 45 °C inkubiert

Dann wurde 1 µl T4 DNA Ligase (Konzentration: 400 Units/µl) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 15 °C im Kühlraum auf dem Schüttler ligiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde die Probe anschließend 10 min bei 65 °C erhitzt.

Der verwendete T4 DNA Ligase-Buffer 10 x und die T4 DNA Ligase waren Produkte der Firma New England Biolabs (NEB).

B.2.6.10 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die Transformation

Bei einer Transformation wird rekombinante Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen, das heißt zur Aufnahme von DNA befähigte Zellen, eingeschleust. *E.coli* besitzen keine natürliche Kompetenz, weshalb Hitzeschock-kompetente TOP10-Zellen hergestellt wurden. Dabei wurden die Zellen durch Behandlung mit RbCl, MnCl₂ und CaCl₂ für DNA durchlässiger gemacht (Hanahan, 1983).

Durchführung:

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert bzw. autoklaviert. SOB-Medium (Super Optimal Broth Medium) wurde mit einer TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 - 0.7 inkubiert. Dann wurde die Kultur 15 min auf Eis gestellt und danach abzentrifugiert (15 min/4 °C/4000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet in RF1-Puffer suspendiert, 1 h auf Eis gekühlt und danach abzentrifugiert (15 min/4 °C/4000 x g). Abschließend wurde das Pellet in kaltem RF2-Puffer aufgenommen und Aliquots der kompetenten Bakterien bei -80 °C tiefgefroren.

SOB-Medium pH 7,0:

Bacto-Trypton	20 g
Hefe	5 g
NaCl	0,5 g
KCl-Lsg. 1 M	2,5 ml
MQ-H ₂ O	ad 990 ml → autoklaviert

Vor Benutzen wurden 10 ml einer sterilen 1 M MgCl₂-Lösung zugegeben.

RF1-Puffer pH 5,8 (mit 0,2 M Essigsäure eingestellt):

1 M Kaliumacetat (pH 7,5)	30 ml
CaCl ₂	1,5 g
MnCl ₂	9,9 g
RbCl	12,0 g
Glycerol	15 % (w/v)
MQ-H ₂ O	ad 1,0 l

RF2-Puffer pH 6,8 (mit 0,2 M Essigsäure eingestellt):

0,5 M MOPS (pH 6,8)		20 ml
CaCl ₂		11,0 g
RbCl		1,2 g
Glycerol		15 % (w/v)
MQ-H ₂ O	ad	1,0 l

B.2.6.11 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente TOP10 *E.coli* in der Hand erwärmt, bis die Zellsuspension zu tauen anfangt, und dann 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde die DNA (2 - 10 ng, mehr ist toxisch für die Bakterien) zu 100 µl Zellsuspension dazugegeben und dieser Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 60 s bei 42 °C erhitzt und dann wieder für 3 min auf Eis gestellt. Danach wurde 900 µl SOC-Medium (20 ml sterile 1 M Glucose in 1 l SOB-Medium) zugegeben und die Cups 1 h bei 37 °C unter Schütteln liegend inkubiert. Danach wurden die Bakterien zur Selektion der tatsächlich transformierten Zellen auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Der pcDNA3.1(-)-Vektor enthält wie alle zum Klonieren verwendeten Vektoren ein Antibiotikaresistenzgen, damit die Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, selektiv vermehrt werden können.

Herstellung ampicillinhaltiger Agarplatten:

Zur Herstellung des LB-Mediums (Lysogeny Broth) für die Agarplatten wurde eine fertige Mischung, nämlich LB Broth, Miller (FisherScientific) verwendet. Für 1000 ml LB-Medium wurden 25 g LB Broth eingesetzt, worin 10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl enthalten waren. Zusätzlich wurden für die Agarplatten 15 g Agar eingewogen, dann 1000 ml MQ-H₂O zugegeben und die Mischung erwärmt, bis alles gelöst war. Anschließend wurde bei 121 °C autoklaviert und danach pro Liter Lösung unter sterilen Bedingungen 1 ml einer sterilfiltrierten Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml in EtOH 50 %) zugegeben, wodurch eine Antibiotikakonzentration von 100 µg/ml erreicht wurde. Die Lösung wurde unverzüglich in Petrischalen ausgegossen (ca. 20 ml pro Platte).

100 µl der transformierten Zellsuspension wurden mit einem in Ethanol abgeflamten Glasspatel auf einer Agarplatte, welche zuvor auf 37 °C erwärmt worden war, ausgestrichen. Die restlichen 900 µl des Transformationsansatzes wurden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, vom Überstand wurden 800 µl abgenommen und verworfen und das Pellet in den verbliebenen 100 µl Medium suspendiert. Diese 100 µl wurden ebenfalls auf einer Agarplatte ausgestrichen, um eine höhere Dichte an Kolonien

auf der Platte erzielen zu können. Nach dem Ausstreichen wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert, wobei der Agarteil nach oben zeigte.

B.2.6.12 Miniprep, Maxiprep und Sequenzierung

Nach der Inkubation wurden mehrere Bakterienklone einer Agarplatte mit einer abgeflamnten Metallöse gepickt und für die Minipreps je 4 ml steriles LB-Medium (+ Ampicillin) mit einer Kolonie angeimpft. Das LB-Medium wurde in gleicher Weise wie das LB-Medium für die Agarplatten hergestellt, nur wurde kein Agar zugegeben. Die Antibiotikakonzentration war ebenfalls gleich (Endkonzentration: 100 µg/ml). Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C unter starkem Schütteln kultiviert. Anschließend wurde zuerst von jedem Ansatz eine Glycerinkultur für die spätere Maxiprep hergestellt. Dazu wurden zu 300 µl einer 50 %-igen wässrigen Glycerinlösung (v/v) 700 µl der Übernachtskulturen gegeben und die Mischung bei -80 °C tiefgefroren. Dann wurde aus dem Rest der kultivierten Bakterien mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I von peqlab, welches ebenfalls alle benötigten Puffer und Säulen enthielt, die Vektor-DNA nach Protokoll isoliert. Dabei wird nach alkalischer Lyse der Bakterien die Vektor-DNA an eine Membran gebunden und nach mehreren Waschschrinen wieder von dieser eluiert.

Mit der erhaltenen DNA wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt, um nachzuweisen, dass das richtige Insert im Vektor enthalten war.

Von einem der passenden Klone wurde schließlich eine große Kultur für eine Maxiprep angesetzt. Dafür wurden 250 ml steriles LB-Medium (mit Ampicillin) mit einem Teil der Glycerinkultur von der Miniprep angeimpft und der Ansatz über Nacht bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde zuerst wiederum eine Glycerinkultur hergestellt und dann die DNA aus dem restlichen Medium mit Hilfe des Maxiprep-Kits von Qiagen isoliert. Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration der Probe wurde die Vektor-DNA zur Sequenzanalyse bei der Firma Entelechon eingeschickt.

Die erhaltene DNA-Sequenz wurde mittels des Programms GeneRunner mit der gewünschten Sequenz verglichen.

B.2.6.13 Transfektion von COS-7-Zellen für die Interaktionsversuche

Bei COS-7-Zellen handelt es sich um eine von Nierenfibroblasten der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) abgeleitete Zelllinie, die mit einer Mutante des Affenvirus SV40 behandelt wurde. COS-7-Zellen werden häufig für die Expression rekombinanter Proteine in der Molekularbiologie verwendet.

Zellkultur

COS-7-Zellen wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit einer Mischung aus 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep), 10 % fötalem Kälberserum (FCS Gold), 1 % nichtessentiellen Aminosäuren und 2 % 50 x HT-Serum (Hypoxanthin/Thymidin; Gibco) kultiviert. FCS gewährleistet die Versorgung mit bestimmten Wachstumsfaktoren und Hormonen und PenStrep verhindert das Wachstum von Bakterien und Pilzen in der Zellkultur. COS-7-Zellen wachsen in adhärenenten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Kulturgefäßen aus Polystyrol (Tissue Culture Flask 25-75 cm² von Sarstedt). Die Zellen wurden bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert, um einen konstanten pH-Wert des Mediums zu gewährleisten.

Transfektion von COS-7-Zellen zur Untersuchung der Proteininteraktion

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNA (rekombinante Plasmide) in eukaryontische Zellen. Bei einer transienten Transfektion wird das fremde Plasmid unabhängig vom Genom der Wirtszelle transkribiert, also episomal. Allerdings sind die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Werden gleichzeitig mehrere Gene in die Wirtszellen eingebracht, spricht man von Co-Transfektionen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Calciumphosphat-Transfektion nach Chen & Okayama durchgeführt und das Fugene Transfektions-Reagenz von Roche verwendet.

Calciumphosphat-Methode

Bei der Calciumphosphat-Transfektion werden Calciumphosphat-DNA-Präzipitate gebildet, die sich an der Oberfläche der Zellen anlagern und durch Endozytose in diese aufgenommen werden. Pro 75cm²-Kulturflasche wurden dazu insgesamt 15 µg Plasmid-DNA in 210 µl MQ-H₂O verdünnt und tropfenweise mit 30 µl 2 M CaCl₂-Lösung versetzt. Dieses DNA-CaCl₂-Gemisch wurde tropfenweise in 240 µl 2 x HBS pipettiert und dabei gut gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT (nach 15 min kurz vorgetext) wurde das Präzipitat tropfenweise zu den Zellen ins Medium gegeben. Die Proteinexpression erfolgte bei Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2-3 Tage.

2 x HBS (HEPES gepufferte Saline); pH 7,05; sterilfiltriert

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

Fugene-Transfektion

Zusätzlich zur Calciumphosphat-Methode wurden COS-7-Zellen mit dem Fugene HD Transfektionsreagenz von Roche transfiziert, welches als Multikomponenten-Reagenz Komplexe mit der DNA bildet, die von den Zellen aufgenommen werden.

Pro 75cm²-Kulturflasche mit 15 ml Medium wurden insgesamt 4,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Zu 436,5 µl DMEM ohne Zusätze wurden zuerst 13,5 µl Fugene HD-Reagenz pipettiert, gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die DNA zugegeben, der Ansatz gut gemischt und 30 min inkubiert. Pro 1 ml Medium wurden dann 25 µl des Mix zu den Zellen in die Kulturflasche pipettiert und diese 2 - 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Ernten der Zellen

Zwei bis drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, wobei nach zweimaligem Waschen (mit je 10 ml PBS-Puffer) die Zellen in 2,5 ml kaltem PBS-Puffer (mit Proteaseinhibitoren) vom Kulturflaschenboden abgeschabt wurden. Nach Zentrifugation (700 x g, 4 °C, 10 min) und 1 x Waschen in PBS (+ PI) wurde das Zellpellet in hypotonem 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) + 2 mM EDTA + PI lysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Nach Homogenisation der Zellen durch Scheren mit einer 22G-Kanüle wurde das aliquotierte Zellysate bei -80 °C tiefgefroren. Nach einer Bradfordproteinbestimmung wurde eine cGMP-Agarosefällung durchgeführt.

B.2.6.14 Transfektion und Immunzytochemie von COS-7-Zellen

Immunzytochemische Techniken wurden eingesetzt, um die Lokalisation von Proteinen nach der Transfektion und cGMP-Stimulation in COS-7-Zellen zu untersuchen. Bei der Immunfluoreszenz-Markierung bindet der primäre unkonjugierte AK in den fixierten Zellen an das jeweilige Antigen. Danach wird mit einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und gegen den Fc-Teil des jeweiligen primären Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Durch Anregung des Fluorophors mit Licht bestimmter Wellenlänge kann der Antigen-Antikörper-Komplex mit dem Mikroskop detektiert werden.

Transfektion und Stimulation der COS-7-Zellen

Für die Transfektion, Stimulation mit cGMP und nachfolgende Immunzytochemie wurden COS-7-Zellen in sterile Kulturobjektträger („Culture Slides“) mit einem 8-Kammeraufsatz (8 Chamber Polystyrene Vessel von BD Biosciences) ausgesät, jeweils 10000 Zellen pro Kammer. Durch den Aufsatz konnten die Zellen in den einzelnen Kammern mit

verschiedenen Vektoren transfiziert und anschließend mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden. Nach dem Aussäen wurden die Zellen einen Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit sie am Gefäßboden anwachsen konnten.

Anschließend wurden für die Transfektion pro Kammer zuerst 500 µl frisches DMEM und dann 12,5 µl des folgenden Mix zugegeben, wobei dieser wie unter B.2.6.13 beschrieben hergestellt wurde:

DMEM ohne Zusätze	97 µl
Fugene HD	3 µl
DNA	1 µg

Die Zellen wurden danach 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ zur Expression der Proteine inkubiert. Zur Aktivierung der cG-Kinase wurden die Zellen 1 h bei 37 °C mit 250 µM 8-pCPT-cGMP in Medium stimuliert.

Immunzytochemie der transfizierten COS-7-Zellen

Nach der Stimulation mit 8-pCPT-cGMP wurden die Zellen zum Erhalt des „Status Quo“ mit Paraformaldehyd fixiert. Dazu wurden die „Culture Slides“ 15 min bei 4 °C im Kühlraum auf dem Schüttler mit einer zweiprozentigen PFA-Lösung in PBS-Puffer inkubiert. Dann wurde wie zwischen allen folgenden Schritten 3 x 5 min mit PBS-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert, um die Antigene freizulegen und für die Antikörper zugänglich zu machen. Hierfür wurde eine 0,2 %-ige Lösung von Triton X-100 in PBS-Puffer hergestellt, mit welcher die Zellen 10 min behandelt wurden. Dann wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 10 % BSA in PBS-Puffer blockiert (1 Stunde bei Raumtemperatur). Die primären Antikörper wurden mit der 10 % BSA-Lösung entsprechend verdünnt (s. Tabelle 14). Von diesem Mix wurden 140 µl pro Kammer auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Danach konnte mit den fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern behandelt werden. Diese wurden 1:200 bis 1:400 mit 1 % BSA in PBS-Puffer verdünnt und dann eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss auf den Zellen belassen. Um ein Ausbleichen des Fluorophors zu verhindern wurde ab diesem Schritt überwiegend im Dunkeln gearbeitet. Zuletzt wurden die gefärbten Zellen mit einem Deckgläschen (24 x 50 x 0,13 mm; VWR) und einem fluoreszenzfreien Glycergel (Dako Glycergel Mounting Medium; Dako, Hamburg) versiegelt. Die Objektträger wurden bis zum Mikroskopieren bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Primärer AK	Verdünnung	Sekundärer AK	Konjugat	Verdünnung
cGKI β	1:50	anti rabbit	Alexa 647	1:200
IRAG	1:1000	anti guinea pig	Cy3	1:400

Tabelle 14: Verwendete Antikörper für Immunzytochemie

B.2.6.15 Mikroskopie

Die Präparate der transfizierten Zellen wurden mit einem aufrecht inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Axio Observer Z1, Zeiss) unter Verwendung des Fluar 40 x/1.3 Öl Objektiv (Zeiss) ausgewertet. Als Lichtquelle diente ein externer Metall-Halogenid-Brenner (HXP120, Zeiss). Dieser strahlte kein monochromatisches Licht ab, sondern ein komplettes Spektrum, weshalb verschiedene Filter zum Einsatz kamen, die eine spezifischere Fluorophoranregung ermöglichten (DSred für Cy3: Exzitation [nm]: 537,5 – 562,5; Emission [nm]: 570-640; Cy5 für Alexa 647: Exzitation [nm]: 625-655; Emission [nm]: 665-715). Als Detektor diente eine CCD Kamera (AxioCam MRm, Zeiss) mit 1.4 Mega Pixel, als Software wurde AxioVision von Zeiss eingesetzt.

B.2.7 Statistik

Alle Ergebnisse der Arbeit wurden als Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen zwei Gruppen (z. B. WT und IRAG-KO) wurden mittels Student t-Test bestimmt. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen (z.B. WT, IRAG-KO und IRAG Δ 12) wurde eine One-way Anova (einfaktorielle Varianzanalyse) mit nachfolgendem Bonferroni-Test durchgeführt. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant bezeichnet, wenn ein p-Wert von $< 0,05$ erreicht wurde. Als hochsignifikant wurde ein p-Wert von $< 0,01$ und als höchstsignifikant ein p-Wert von $< 0,001$ bezeichnet. Diese Signifikanzniveaus wurden in den Abbildungen mit 1, 2 oder 3 Sternen (*) dargestellt. Nicht signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert $> 0,05$ wurden mit „ns“ gekennzeichnet.

C. Ergebnisse

C.1 Untersuchung der Funktion der InsP₃R-I-Phosphorylierung

C.1.1 Untersuchung der InsP₃R-I-Phosphorylierung in murinen Thrombozyten

Der InsP₃R-I liegt – wie bereits in der Einleitung erwähnt - in einem Makrokomples mit dem InsP₃-Rezeptor-assoziierten cGMP-Kinasesubstrat IRAG und der cGKI β -Isoform vor. Durch cGKI β -vermittelte Phosphorylierung von IRAG wird die InsP₃-induzierte Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER gehemmt (Ammendola *et al.*, 2001). Laut Literatur kann auch der InsP₃R-I *in vivo* cGMP-stimuliert durch die cG-Kinase phosphoryliert werden (Murthy & Zhou, 2003). Als bevorzugte cGK-Phosphorylierungsstelle wurde die Aminosäure Ser1755 beschrieben (Murthy & Zhou, 2003). Die Bedeutung einer cGKI-vermittelten InsP₃R-I-Phosphorylierung ist jedoch immer noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle spielt die vorliegende InsP₃R-I-Spleißvariante. Eine Aktivierung der cGK in Zellen, welche die neuronale S²⁺-Form des InsP₃R-I exprimierten, führte zu einer Steigerung der Ca²⁺-Freisetzung. In Zellen, die den peripheren S²⁻-InsP₃R-I enthielten, hatte die Stimulation der cG-Kinase keinen Effekt (Yule *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der InsP₃R-I-Phosphorylierung mit Hilfe von Phosphorylierungsexperimenten mit WT- und IRAG-KO-Thrombozyten untersucht. In IRAG-KO-Thrombozyten konnte im Gegensatz zum Wildtyp keine cGMP-stimulierte Hemmung der Thrombozytenaggregation beobachtet werden (Schinner *et al.*, 2011). Ein Vergleich der InsP₃R-I-Phosphorylierung in WT- und IRAG-KO-Blutplättchen sollte deshalb Rückschlüsse auf die Funktion der Phosphorylierung ermöglichen.

Zuerst wurden aber die Expression diverser Proteine und das Vorliegen des trimeren Signalkomplexes in den Thrombozyten analysiert. Außerdem wurde zunächst untersucht, welche der beiden Spleißvarianten in den murinen Thrombozyten vorkommt.

C.1.1.1 Nachweis des trimeren Makrokomples in Thrombozyten

Als Erstes wurde die Expression verschiedener Proteine in den Thrombozyten von WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Mäusen untersucht. Im Western Blot wurden dazu beide cGKI-Isoformen, der InsP₃R-I, IRAG, das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert. GAPDH ist wie

β -Aktin eines der sog. „Housekeeping“-Proteine, welche unabhängig von Zelltyp und Zellstadium exprimiert werden und deren Proteinmenge häufig als interne Ladungskontrolle in einem Western Blot betrachtet wird. Dabei zeigte sich, dass der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in WT-, IRAG-KO- und auch in IRAG Δ 12-Thrombozyten in etwa gleichem Ausmaß vorhanden ist (s. Abb. 10). Was die cGKI betrifft, so war die Expression von cGKI β im IRAG-KO sehr stark reduziert, aber in den IRAG Δ 12-Thrombozyten etwa gleich wie im Wildtyp. Im IRAG-KO war eine sehr schwache cGKI β -Bande erst nach langer Belichtung des Chemolumineszenzfilms zu sehen (Daten nicht gezeigt). Die Expression von cGKI α war im Wildtyp und in den IRAG Δ 12-Thrombozyten gleich, während im IRAG-KO eine leichte Hochregulation, das heißt eine größere Proteinmenge, zu beobachten war. Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), dessen Phosphorylierung zur Kontrolle der cGKI-Aktivität in den Phosphorylierungsexperimenten untersucht wurde, war in allen drei Fällen in gleicher Menge vorhanden, wenn die Proteinmenge auf den Gehalt an GAPDH bezogen wurde. Der IRAG-AK zeigte eine Kreuzreaktivität und detektierte im Western Blot im IRAG-KO und in der IRAG Δ 12-Probe knapp über der IRAG-Bande ein zusätzliches Protein. Diese unspezifische Bande wurde im WT vermutlich von der eigentlichen IRAG-Bande überlagert.

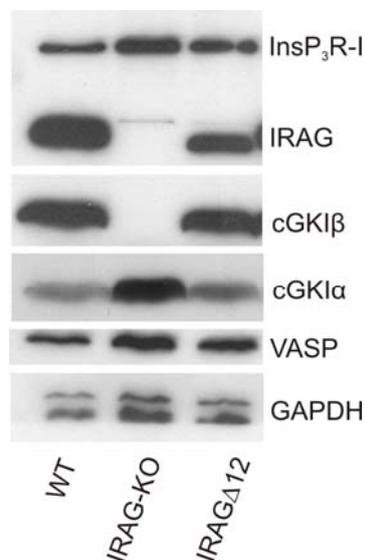


Abb. 10: Expression diverser Proteine in WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten

Es wurden je 60 μg Gesamtprotein auf ein 11,5%-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den jeweiligen primären AK gegen $\text{InsP}_3\text{R-I}$, IRAG, cGKI β , cGKI α , VASP und GAPDH inkubiert.

Als Nächstes wurde das Vorliegen des trimeren Komplexes in den Mausthrombozyten nachgewiesen. Dafür wurden als Erstes cGMP-Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Thrombozyten durchgeführt. Bei den WT-Thrombozyten konnten sowohl cGKI α als auch cGKI β gefällt werden, da die Kinasen cGMP binden. Zusätzlich wurden die mit der cGKI β

interagierenden Proteine IRAG und $\text{InsP}_3\text{R-I}$ nachgewiesen (s. Abb 11). Im IRAG-KO dagegen konnte neben $\text{cGKI}\alpha$ nur sehr wenig $\text{cGKI}\beta$ detektiert werden, aber kein $\text{InsP}_3\text{R-I}$, da im IRAG-KO das Ankerprotein (IRAG) für diesen Calciumkanal fehlt (s. trimerer Komplex Abb. 3). Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung - womit die Bindung von Proteinen an die Agarose direkt oder an den Linker gemeint ist (Hanke *et al.*, 2011) - wurde WT-Thrombozytenlysat mit Ethanolaminagarose inkubiert. Diese ist das Pendant zur üblicherweise verwendeten 8-AET-cGMP-Agarose (8-Aminoethylthio-cGMP-Agarose), deren Linker ebenfalls aus einem Ethylrest besteht. Bei Ethanolaminagarose fehlt lediglich das zyklische Nukleosidmonophosphat zur Kinasebindung. Hierbei zeigte sich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen (Bindungspuffer mit 150 mM NaCl und 2 % Lubrol als Detergens, Proteinbindung über Nacht und drei Waschschrte vor der Elution) keine unspezifische Bindung auftrat.

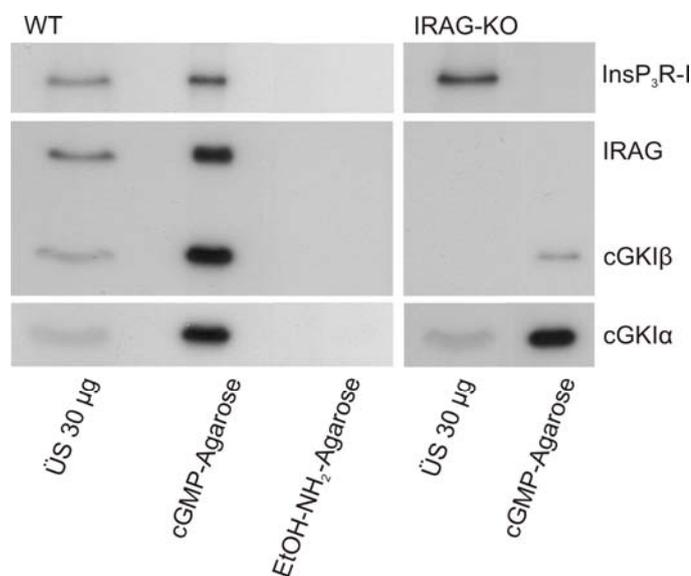


Abb. 11: Der trimere Komplex in Thrombozyten: cGMP-Agarose

cGMP-Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Thrombozyten (je 250 µg Gesamtprotein). Als Kontrolle der unspezifischen Proteinbindung an Agarose wurden WT-Thrombozyten mit Ethanolaminagarose inkubiert. Im Western Blot wurden der $\text{InsP}_3\text{R-I}$, IRAG, $\text{cGKI}\beta$ und $\text{cGKI}\alpha$ detektiert.

Da mit cGMP-Agarose alle cGMP-bindenden Proteine, unter anderem auch Phosphodiesterasen, angereichert werden können, wurden zum Nachweis des trimeren Komplexes anschließend die spezifischeren Co-Immunpräzipitationen mit Protein A-Sepharose durchgeführt. Sowohl bei Verwendung von anti- $\text{cGKI}\beta$ -, als auch von anti-IRAG- und anti- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -AK konnten im Wildtyp alle drei Proteine im Präzipitat detektiert werden. Mit anti- $\text{cGKI}\alpha$ -AK jedoch konnte keines der Komplexproteine gefällt werden (s. Abb. 12 A). Das heißt, dass unter den gewählten Bedingungen (siehe cGMP-Agarosefällung) die $\text{cGKI}\alpha$ nicht im Komplex vorlag und auch nicht unspezifisch an die

Sepharose-Matrix gebunden wurde. Zum Nachweis eventueller durch den Antikörper selbst hervorgerufener Banden wurde ein Versuch nur mit anti-IRAG-AK plus Protein A-Sepharose ohne Zugabe von Protein durchgeführt. In diesem Fall konnte im Western Blot nur die „heavy chain“ des Antikörpers detektiert werden, jedoch waren keine Banden auf Höhe der anderen Proteine zu sehen. Gemeinsam mit der cGKI α -Probe kann daraus gefolgert werden, dass die Bindung der drei Komplexproteine untereinander sehr spezifisch erfolgt. In den IRAG-KO-Thrombozyten dagegen konnte wie schon in der cGMP-Agarosefällung keine Interaktion zwischen InsP₃R-I und cGKI β ohne Vorhandensein des IRAG-Proteins nachgewiesen werden (s. Abb 12 B). Bei der mit dem anti-InsP₃R-I-AK in der cGKI α - und der cGKI β -Immunpräzipitation detektierten Bande muss es sich um eine Kreuzreaktivität handeln, da das detektierte Protein ein etwas kleineres apparentes Molekulargewicht hat als das InsP₃R-I-Protein im Ausgangslysat. Das mit dem anti-IRAG-AK detektierte Protein im Knock-out wurde bereits auf Seite 54 beschrieben und kommt ebenfalls durch eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers zustande. Interessanterweise wurde dieses Protein mit den eingesetzten Antikörpern co-immunopräzipitiert.

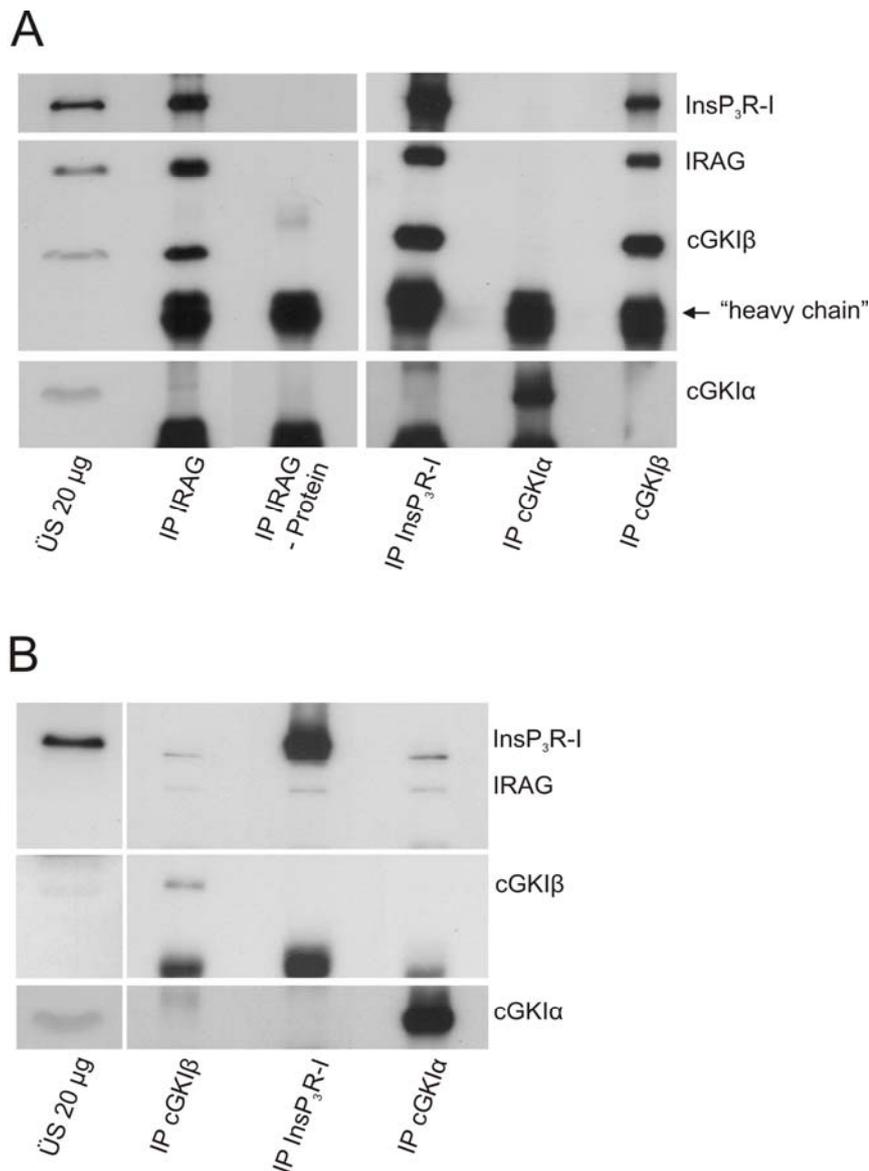


Abb. 12: Nachweis des trimeren Komplexes in Thrombozyten: Co-Immünpräzipitationen

A) Protein A-Sepharosefällungen mit anti-IRAG-, anti-InsP₃R-I- und anti-cGKIα/β-AK mit WT-Thrombozytenlysat (je 250 µg Protein). Eine Probe mit anti-IRAG-AK ohne Protein zur Detektion unspezifischer, durch den Antikörper selbst verursachter Banden. Mit dem anti-cGKIβ-AK wurde im Western Blot zusätzlich die „heavy chain“ des zur Immunpräzipitation eingesetzten AK detektiert. B) Co-Immünpräzipitationen mit IRAG-KO-Thrombozytenlysat (je 250 µg) mit anti-cGKIβ-, anti-InsP₃R-I- und anti-cGKIα-AK. Im Immunblot wurden der InsP₃R-I, IRAG und cGKIα/β detektiert.

C.1.1.2 Die InsP₃R-I-Spleißvarianten in Thrombozyten

Vom InsP₃R-I sind zwei Spleißvarianten (Wagner *et al.*, 2004) beschrieben, zum einen die sogenannte S²⁺-Form, die neuronale, lange Form und zum anderen die periphere S²⁻-Form, bei der drei Exons deletiert sind, nämlich die Basenpaare 5074 - 5193 bzw. die Aminosäuren Ser1692 - Ser1732. Diese Deletionsstelle liegt zwischen den beiden

Phosphorylierungsstellen Ser1589 und Ser1755. Die cG-Kinase kann nur Ser1755, die PKA jedoch beide Aminosäuren phosphorylieren (Wagner *et al.*, 2003).

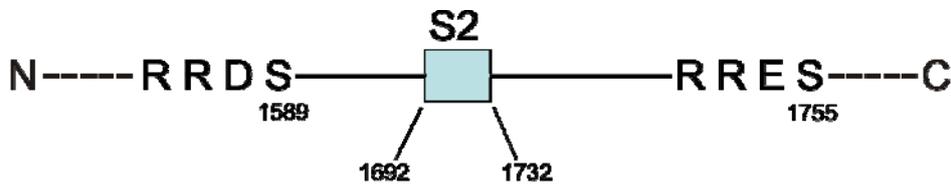


Abb. 13: Darstellung der S2-Spleißpositionen des InsP₃R-I (Wagner *et al.*, 2004)

S²⁺ ist die neuronale, lange Form des InsP₃R-I. S²⁻ ist die nicht-neuronale, periphere Form, hier fehlen 3 Exons, die für die Aminosäuren 1692-1732 kodieren.

Da es sich bei Thrombozyten nicht um neuronales Gewebe handelt, war davon auszugehen, dass dort die periphere Form des InsP₃R-I exprimiert wird, was allerdings bisher nicht explizit beschrieben worden war. Um die vorkommende Spleißvariante nachzuweisen, wurde mit der cDNA von humanen und murinen Thrombozyten eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Detektion des InsP₃R-I durchgeführt. Dafür wurde zuerst RNA aus den Thrombozyten isoliert und diese anschließend in cDNA umgeschrieben. Für die PCR wurde, wie bereits unter Material und Methoden erwähnt, ein Primerpaar verwendet, welches 5' und 3' der für die Deletionsstelle kodierenden Region bindet. Damit konnte bereits anhand der Länge der entstandenen PCR-Fragmente die vorliegende Spleißvariante identifiziert werden: die Länge des S²⁺-Fragments betrug 321 Basenpaare und die des S²⁻-Fragments 202 Basenpaare. Durch eine Sequenzanalyse (Firma Entelechon; Regensburg) der PCR-Proben konnte gezeigt werden, dass in Thrombozyten, wie bereits vermutet, die periphere Form vorkommt und zusätzlich eine weitere bis jetzt nicht beschriebene Spleißvariante (s. Abb. 14). Bei dieser sind anstatt drei Exons nur zwei Exons deletiert, nämlich die Basenpaare 5074 - 5142 bzw. die AS 1692 - 1714. Diese Variante konnte sowohl in den humanen als auch in den Mausthrombozyten nachgewiesen werden und könnte auch in ein funktionelles Protein translatiert werden, da es durch das Entfernen der Basen nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt. Falls zwei Spleißvarianten vorliegen bzw. translatiert werden, konnten diese jedoch im Western Blot nicht unterschieden werden, da die zweite, neu identifizierte Spleißvariante nur um 51 Basenpaare, also 17 Aminosäuren größer ist als die S²⁻-Form. Der InsP₃R-I ist jedoch mit ca. 230 kDa ein sehr großes Protein, weshalb sehr geringe Größenunterschiede in der SDS-PAGE nicht aufgetrennt werden können.

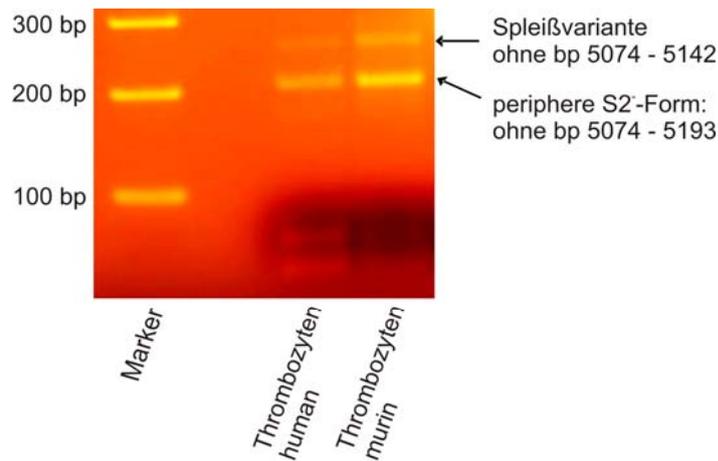


Abb. 14: Spleißvarianten des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in humanen und murinen Thrombozyten

2 %-Agarosegel zur Analyse einer PCR mit der cDNA von humanen Thrombozyten und murinen WT-Thrombozyten.

C.1.1.3 *In-vivo*-Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in Thrombozyten

Bereits im Jahr 2000 wurde die cGMP-stimulierte Phosphorylierung von $\text{InsP}_3\text{R-I}$ und $-\text{III}$ in humanen Thrombozyten untersucht (El-Daher *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass beide Subtypen durch die cGKI phosphoryliert werden können, jedoch wurde im Autoradiogramm nur die allgemeine Phosphorylierung der Rezeptoren detektiert und nicht die Phosphorylierung an einer spezifischen cGK-Phosphorylierungsstelle. Über die Funktion dieser Phosphorylierung konnte ebenfalls keine Aussage gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in murinen Thrombozyten untersucht, nach einer *in-vivo*-Stimulation mit cGMP, in Analogie zur *in-vivo*-Phosphorylierung von IRAG (Antl *et al.*, 2007). Die Zunahme der Phosphorylierung wurde mit einem anti-P- $\text{InsP}_3\text{R-I-AK}$ (Ser1755) detektiert, welcher nur dann $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Protein erkennt, wenn dieses an der cGKI-Phosphorylierungsstelle Ser1755 phosphoryliert ist. Zur Stimulation der cGMP-abhängigen Proteinkinase wurde das membrangängige, relativ Phosphodiesterase-stabile cGMP-Analogon 8-Br-cGMP verwendet. Die Thrombozyten wurden in allen Experimenten über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C stimuliert, da sich sowohl beim $\text{InsP}_3\text{R-I}$ als auch beim IRAG-Protein und beim VASP auch zwischen 20 und 30 min noch eine Zunahme der Phosphorylierung zeigte (Daten nicht gezeigt). Die stärkste Phosphorylierung von IRAG (an Ser664) und des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ konnte bei einer 8-Br-cGMP-Konzentration von 1 mM beobachtet werden, weswegen diese Konzentration im Weiteren bei den Phosphorylierungsexperimenten eingesetzt wurde (s. Abb. 15).

Die Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ wurde in WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten untersucht. Die Berechnung der Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation (s. Material und Methoden) ergab im WT und in den IRAG-Mutanten einen Anstieg von ca.

2,4- bis 3,1-fach. Die stärkste Phosphorylierung trat dabei in den WT- und die schwächste Phosphorylierung in den IRAG Δ 12-Thrombozyten auf (s. Abb. 16 B). Es war jedoch kein signifikanter Unterschied zu beobachten (WT + cGMP [n = 13]: 3.121 ± 0.210 , x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe; IRAG-KO + cGMP [n = 11]: 2.793 ± 0.392 ; IRAG Δ 12 + cGMP [n = 7]: 2.366 ± 0.366). Das heißt, dass die Phosphorylierung des InsP₃R-I unabhängig von IRAG und von der Interaktion zwischen dem InsP₃R-I und IRAG erfolgte.

Als Kontrolle der Aktivität der cG-Kinase wurde die Zunahme der VASP-Phosphorylierung an Ser239 bestimmt (s. Abb. 16 C). Diese war bei IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten in etwa gleich, die densitometrische Auswertung ergab einen Anstieg um das ca. 20-fache (IRAG-KO + cGMP [n = 15]: 18.69 ± 2.02 , x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe; IRAG Δ 12 + cGMP [n = 9]: 19.80 ± 2.57). Die Phosphorylierung von VASP in den WT-Thrombozyten war dagegen signifikant geringer (WT + cGMP [n = 16]: 10.21 ± 1.58). Dies ist insofern erstaunlich, da in den WT-Thrombozyten viel mehr cGKI β -Protein exprimiert wird als in den IRAG-KO-Thrombozyten. Somit ist die Expressionsmenge der Kinase vermutlich nicht entscheidend für die Phosphorylierung des VASP-Proteins.

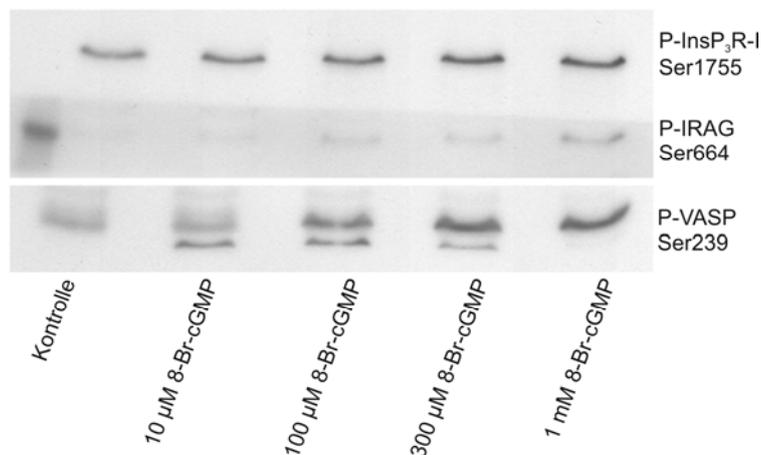


Abb. 15: Stimulation von murinen Thrombozyten mit steigenden Konzentrationen 8-Br-cGMP

Darstellung der Phosphorylierung von InsP₃R-I (an Ser1755), von IRAG (an Ser664) und von VASP (an Ser239) durch Stimulation mit 8-Br-cGMP in Konzentrationen von 10 μ M bis 1 mM.

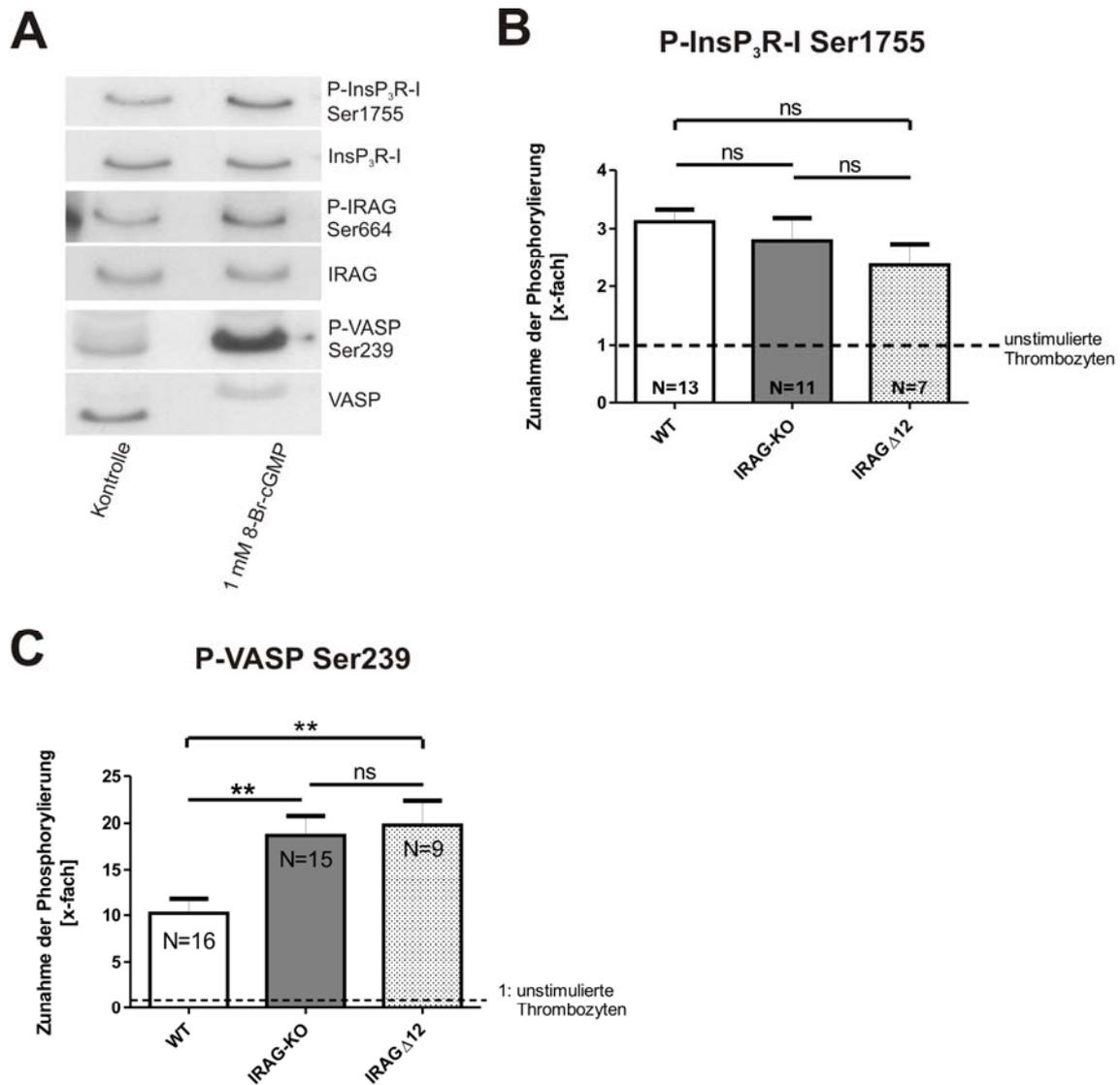


Abb. 16: cGMP-stimulierte Phosphorylierung von InsP₃R-I und VASP in WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten

A) Beispiel für die Stimulation von WT-Thrombozyten (Kontrolle ist minus cGMP): Darstellung der Phosphorylierung von IRAG, VASP und InsP₃R-I im Western Blot. Nach der Inkubation mit den Phospho-Antikörpern wurde gestrippt und mit den jeweiligen Gesamt-AK inkubiert. B) Statistik der Phosphorylierung des InsP₃R-I an Ser1755. Einfaktorielle Varianzanalyse und Bonferroni-Test, $p < 0,05$. C) Statistik der Phosphorylierung von VASP an Ser239. Einfaktorielle Varianzanalyse und Bonferroni-Test, $p < 0,05$.

Zusätzlich zu 8-Br-cGMP wurde das ebenfalls membrangängige cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP in einer Konzentration von 200 μ M, welche auch zur Hemmung der Thrombozytenaggregation verwendet wurde (Schinner *et al.*, 2011), eingesetzt. Da 8-pCPT-cGMP lipophiler als 8-Br-cGMP ist, genügt bei gleichem K_a -Wert für die cGKI eine geringere Konzentration, um in Zellen die gleiche cGMP-Konzentration und somit die gleiche Aktivierung der cG-Kinase zu erzielen (Werner *et al.*, 2011).

Die Phosphorylierung wurde nach drei verschiedenen Zeiten, nämlich nach 10, 20 und 30 min bestimmt, da bei der Messung der Thrombozytenaggregation ebenfalls 10 min lang mit 8-pCPT-cGMP vorinkubiert worden war (Schinner *et al.*, 2011). Bei den Wildtyp-Thrombozyten ergab sich ein Anstieg der Phosphorylierung von ca. 50 %, die über die Zeit leicht abnahm (WT + cGMP 10 min [n = 6]: 1.564 ± 0.216 , x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe; WT + cGMP 20 min [n = 6]: 1.470 ± 0.1960 ; WT + cGMP 30 min [n = 6]: 1.457 ± 0.041). Die IRAG-KO-Thrombozyten zeigten eine ähnliche Zunahme des P-InsP₃R-I-Signals wie der Wildtyp (KO + cGMP 10 min [n = 6]: 1.339 ± 0.172 , x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe; KO + cGMP 20 min [n = 6]: 1.418 ± 0.140 ; KO + cGMP 30 min [n = 5]: 1.425 ± 0.116). Die Phosphorylierungszunahme nach Stimulation mit 8-pCPT-cGMP war zwar geringer als nach Stimulation mit 8-Br-cGMP, allerdings war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und IRAG-KO-Thrombozyten aufgetreten (s. Abb. 17 A).

Was die VASP-Ser239-Phosphorylierung betrifft, so waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und IRAG-KO-Thrombozyten zu beobachten. Die Zunahme der Phosphorylierung betrug zwischen 12 und 20 % (s. Abb. 17 B) (WT + cGMP 10 min [n = 6]: 16.25 ± 2.80 ; x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe; WT + cGMP 20 min [n = 6]: 13.95 ± 2.56 ; WT + cGMP 30 min [n = 6]: 11.83 ± 1.74 ; KO + cGMP 10 min [n = 6]: 14.72 ± 4.84 ; KO + cGMP 20 min [n = 5]: 19.68 ± 5.93 ; KO + cGMP 30 min [n = 5]: 15.24 ± 3.32). Nach 30-minütiger Stimulation war die Phosphorylierung im IRAG-KO aber tendenziell größer als im Wildtyp. Dies stimmt mit den 8-Br-cGMP-Ergebnissen überein.

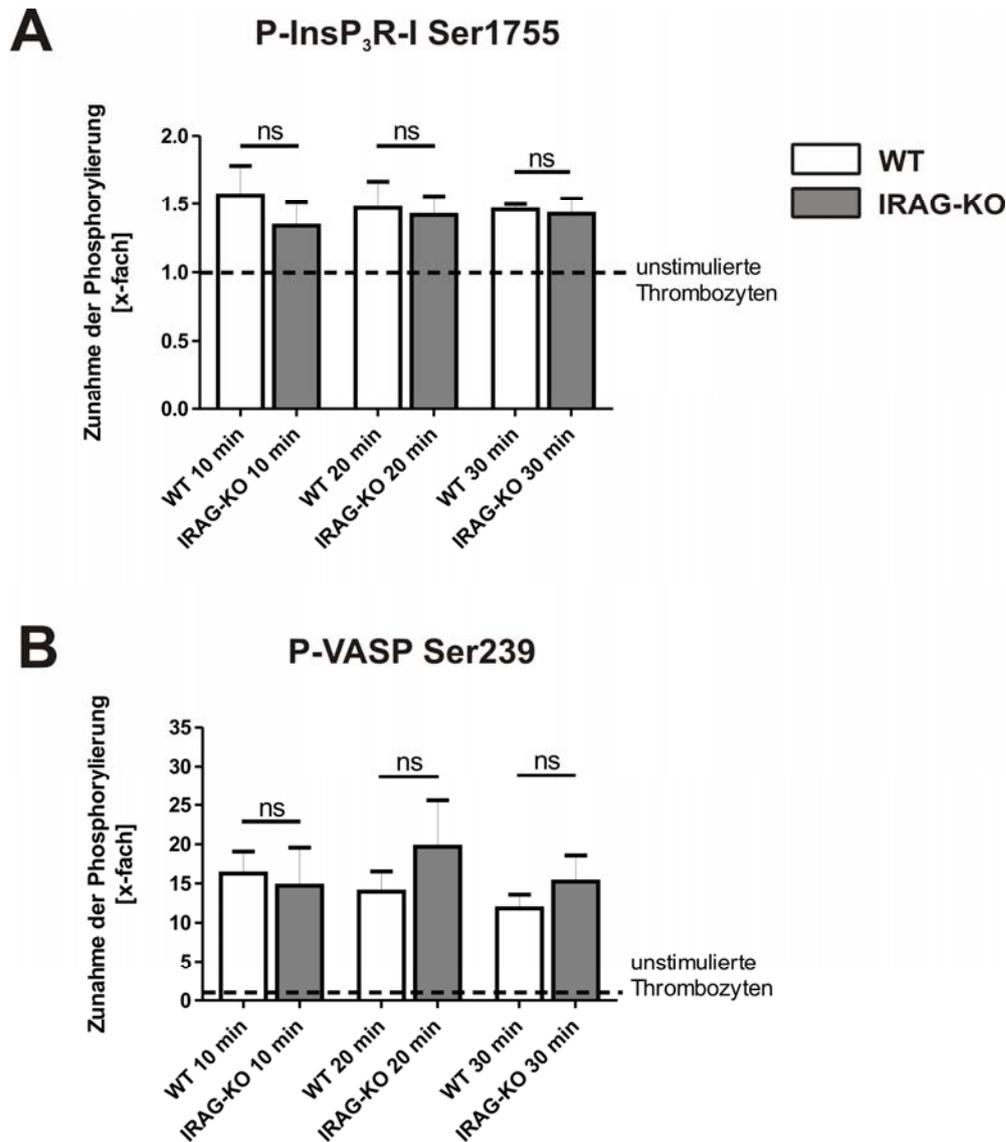


Abb. 17: *In-vivo*-Stimulation von Thrombozyten mit 8-pCPT-cGMP über 10, 20 und 30 min

WT- und IRAG-KO-Thrombozyten wurden 10, 20 oder 30 min mit 200 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Detektion von P-InsP₃R-I (Ser1755), InsP₃R-I, P-VASP (Ser239) und VASP im Western Blot. A) Statistik der Ser1755-Phosphorylierung des InsP₃R-I in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten. B) Statistik der VASP-Ser239-Phosphorylierung in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten. Jeweils t-Test, $p < 0,05$.

Um nachzuweisen, dass die cGMP-stimulierte Phosphorylierung des InsP₃R-I an Ser1755 durch die cGKI erfolgt, wurde der cGKI-Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS eingesetzt. Dieser ist membranpermeabel, PDE-stabil und hemmt die Enzymaktivität beider cGKI-Isoformen. Die K_i -Werte werden mit 35 nM für die cGKI α -Isoform und mit 30 nM für die cGKI β -Isoform angegeben (Butt *et al.*, 1995). Es wurde allerdings beschrieben, dass die cGKI α -Hemmung nicht vollständig ist und dass der Inhibitor bei Abwesenheit von cGMP sogar eine partiell agonistische Aktivität gegenüber der cGKI α -Isoform aufweist (Valtcheva *et al.*, 2009). Der K_i -Wert für die PKA liegt bei 11 μ M (Butt *et al.*, 1995).

Nach Verwendung des cGKI-Inhibitors war im Western Blot eine Hemmung der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung sowohl in den WT- als auch in den IRAG-KO-Thrombozyten zu sehen. Die cGKI-Hemmung zeigte sich auch in der Reduktion der VASP-Phosphorylierung an der cGKI-spezifischen Phosphorylierungsstelle Ser239 (s. Abb. 18 A). Diese konnte durch Einsatz des Inhibitors sowohl im Wildtyp als auch im Knock-out stark vermindert werden, wie die densitometrische Auswertung ergab (s. Abb. 18 B) (WT + Inhibitor [n = 5]: 70.21 % \pm 15.28 % Hemmung; IRAG-KO + Inhibitor [n = 3]: 89.37 % \pm 8.57 % Hemmung; bezogen auf die cGMP-stimulierte Phosphorylierung). Die $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung dagegen wurde durch Vorinkubation mit dem Inhibitor nur um ca. 30 – 40 % gehemmt (WT + Inhibitor [n = 6]: 29.44 % \pm 7.56 % Hemmung; IRAG-KO + Inhibitor [n = 3]: 37.43 % \pm 11.88 % Hemmung). Ein Einsatz des cGKI-Inhibitors im Überschuss (100 μM 8-Br-cGMP/ 250 μM Rp-8-Br-PET-cGMPS) führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Auch hier konnte die $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung weniger stark gehemmt werden als die VASP-Phosphorylierung an Ser239.

Der Unterschied zwischen der Hemmung der VASP-Phosphorylierung und der Hemmung der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung könnte dadurch erklärt werden, dass VASP tatsächlich nur durch die cGKI an Ser239 phosphoryliert wird, während der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ sowohl durch die PKA als auch durch die cGKI an Ser1755 phosphoryliert werden kann (Ferris *et al.*, 1991). Die PKA hat zwar eine 200-fach geringere Affinität für cGMP als die cG-Kinase, cGMP kann aber in höheren Konzentrationen auch die Proteinkinase A aktivieren. Massberg *et al.* (1999) haben allerdings festgestellt, dass in murinen Thrombozyten keine Kreuz-Aktivierung zwischen cGK und PKA stattfindet. Dies wurde damit begründet, dass in $\text{cGKI}^{-/-}$ -Thrombozyten und in WT-Thrombozyten durch cBIMPS ein vergleichbarer PKA-Effekt erzielt werden konnte. Dieser wurde durch Analyse der VASP-Phosphorylierung ermittelt (Massberg *et al.*, 1999). Allerdings setzten Massberg *et al.* zur Stimulation der Thrombozyten das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP in einer Konzentration von 100 μM ein, während im Rahmen der vorliegenden Arbeit 1 mM 8-Br-cGMP im Stimulationsansatz enthalten war. Es könnte sein, dass bei dieser Konzentration auch die PKA durch das cGMP-Analogon aktiviert wurde und es dadurch zu einer PKA-vermittelten $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung kam. Diese konnte durch Rp-8-Br-PET-cGMPS nicht gehemmt werden.

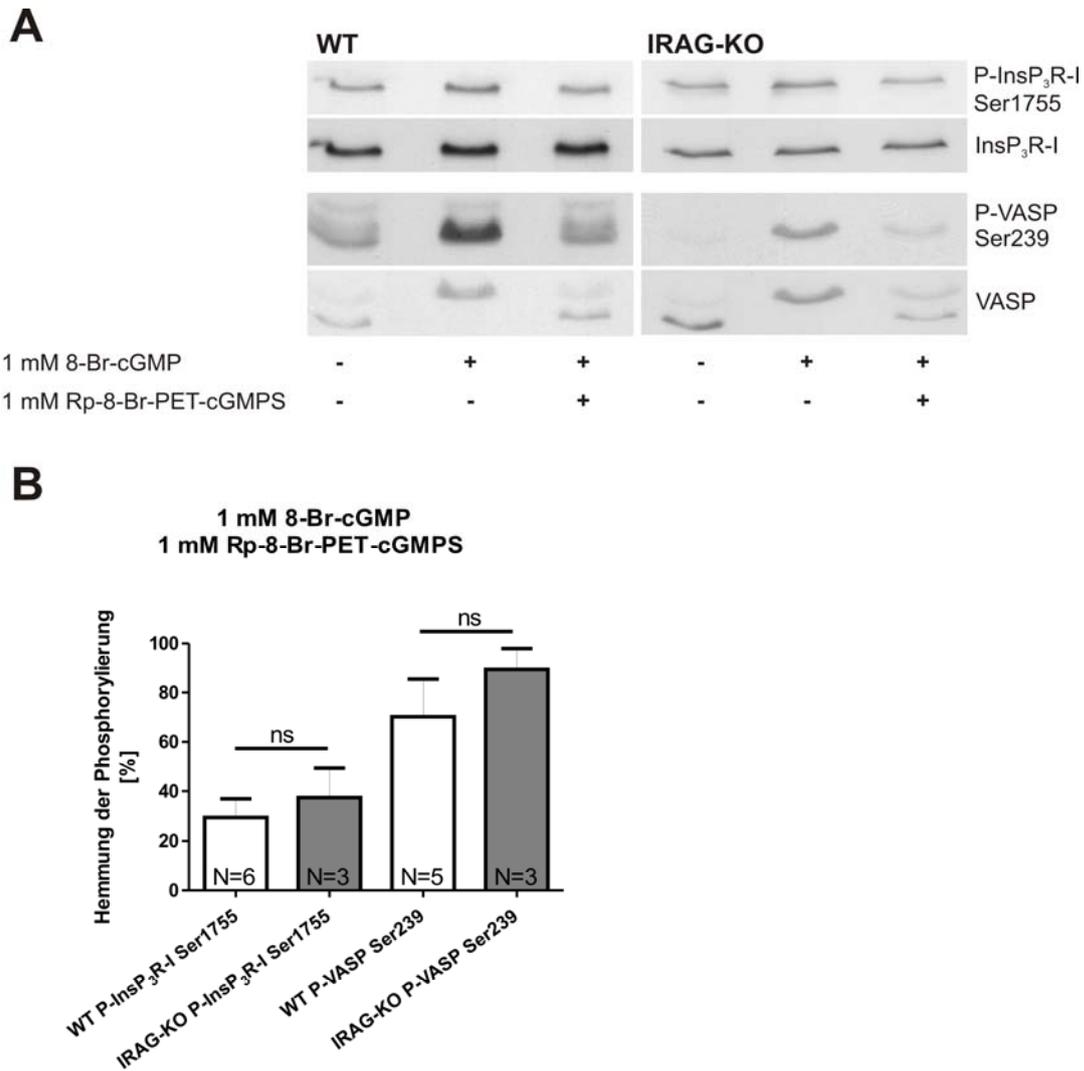


Abb. 18: Hemmung der cGKI in Thrombozyten durch Rp-8-Br-PET-cGMPS

Hemmung der cGKI durch Vorinkubation der Thrombozyten mit Rp-8-Br-PET-cGMPS (20 min, 37 °C), dann Zugabe von 8-Br-cGMP und Stimulation über 30 min. A) Western Blot von WT- und IRAG-KO-Thrombozyten: Detektion von P-InsP₃R-I (Ser1755), InsP₃R-I, P-VASP (Ser239) und VASP. B) Statistische Auswertung zur Hemmung in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten: Student t-Test, $p < 0,05$.

Zusätzlich wurde der laut Literatur (Nickl *et al.*, 2010) hochpotente und membranpermeable cGKI-Inhibitor (D)-DT-2 eingesetzt. Dieser ist das proteolysestabile D-Aminosäure-Derivat des cGKI-Inhibitors DT-2 und weist einen K_i -Wert von 0,8 nM für die cGKI α auf (Nickl *et al.*, 2010). Die Membrangängigkeit dieser peptidbasierten Inhibitoren wird durch Fusion von membranpermeablen Peptiden an das inhibitorische Oktapeptid LRK₅H (Einbuchstaben-Code) erzielt. Bei DT-2 und (D)-DT-2 wurde dazu ein 13 Aminosäuren großes Fragment einer Tyrosinaminotransferase aus dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) eingesetzt (Dostmann *et al.*, 2002). Neben seiner hohen Potenz zeigte (D)-DT-2 außerdem eine sehr hohe Selektivität für die cGKI im Vergleich zur PKA (15000-fach) (Nickl *et al.*, 2010).

Die Substanz wurde in der vorliegenden Arbeit in Konzentrationen von 1 und 2 μM zur Hemmung der Kinaseaktivität eingesetzt. Die Stimulation mit 1 mM 8-Br-cGMP wurde über einen Zeitraum von 10 anstatt von 30 min durchgeführt, da eine Enzymhemmung möglicherweise nur bei einer relativ kurzen Stimulationszeit möglich ist. Nach 10 min war eine deutliche Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ (an Ser1755) und des VASP-Proteins (an Ser239) zu sehen, allerdings konnten diese Phosphorylierungen durch Vorinkubation mit (D)-DT-2 nicht gehemmt werden (s. Abb. 19). Laut Literatur sollen beide cGKI-Isoformen durch das inhibitorische Oktapeptid gehemmt werden (Dostmann *et al.*, 2002). Ebenso kann das VASP-Protein vermutlich durch beide cGKI-Isoformen an Ser239 phosphoryliert werden (Zhuang *et al.* detektierten eine Zunahme der VASP-Ser239-Phosphorylierung bei Expression von cGKI α in Ratten C6 Gliomazellen (Zhuang *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung durch die cGKI β -Isoform wurde in HEK-Zellen nachgewiesen (Meinecke *et al.*, 1994)).

Da nach Vorinkubation mit (D)-DT-2 weder eine Inhibition der VASP-Phosphorylierung an Ser239 noch eine Hemmung der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung an Ser1755 beobachtet werden konnte, war die Substanz unter den getesteten Bedingungen in den Thrombozyten nicht wirksam.

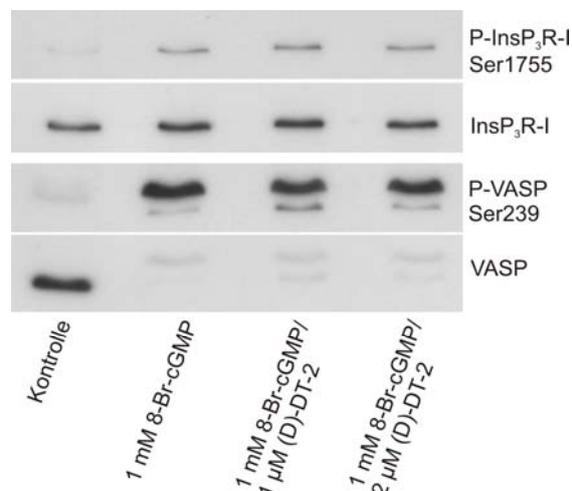


Abb. 19: Hemmung der cGKI in Thrombozyten durch (D)-DT-2

WT-Thrombozyten wurden 20 min mit dem cGKI-Inhibitor vorinkubiert. Dann wurde 1 mM 8-Br-cGMP zugegeben und 10 min bei 37 °C stimuliert. Im Western Blot wurde mit den jeweiligen Phospho-AK und den Gesamt-AK für $\text{InsP}_3\text{R-I}$ und VASP inkubiert.

Anschließend wurde eine mögliche Hemmung der Substratphosphorylierung durch den PKA-Inhibitor H89 untersucht. H89, ein Isochinolinsulfonamid, hemmt die Enzymaktivität durch kompetitiven Antagonismus an der ATP-Bindungsstelle (Lochner & Moolman, 2006). Der K_i -Wert für eine PKA-Hemmung wird zwischen 50 und 135 nM angegeben. Nachteilig ist die geringe Selektivität des Inhibitors (Lochner & Moolman, 2006).

Als Marker der PKA-Hemmung diente die Phosphorylierung von VASP an Ser157. Steigende Konzentrationen H89 verursachten eine zunehmende Inhibition dieser Phosphorylierung. Bei Einsatz von 75 μM H89 war die Phosphorylierung von VASP beinahe komplett unterdrückt und noch niedriger als in der Kontrolle (ohne cGMP, ohne H89) (s. Abb. 20). Bei dieser Konzentration war auch eine leichte Hemmung der $\text{InsP}_3\text{R-I-Ser1755}$ -Phosphorylierung und der VASP-Ser239-Phosphorylierung zu beobachten. Wenn davon ausgegangen wird, dass Ser239 sehr spezifisch durch die cGKI phosphoryliert wird, könnte diese Hemmung durch eine cGKI-Inhibition verursacht worden sein. H89 besitzt nur eine etwa 10-fache Selektivität für die PKA im Vergleich zur cGKI (Chijiwa *et al.*, 1990). Das heißt, dass auch die Hemmung der Ser1755-Phosphorylierung durch eine cG-Kinase-Inhibition bedingt sein könnte.

Zusammenfassend wird die cGMP-stimulierte Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ an Ser1755 überwiegend durch die cGKI vermittelt, da sie durch den cGKI-Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS deutlich, aber durch den PKA-Inhibitor H89 kaum gehemmt werden konnte.

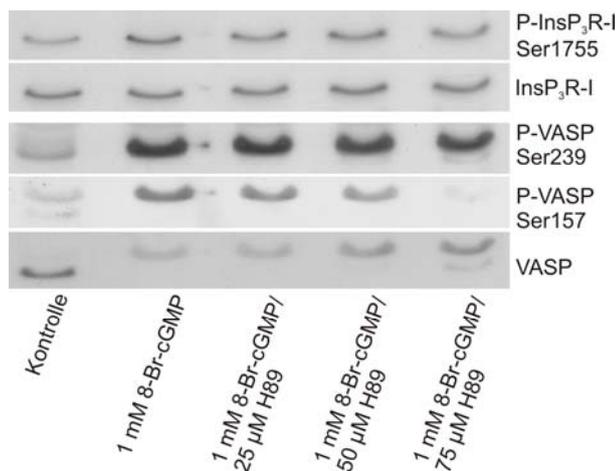


Abb. 20: Hemmung der PKA in Thrombozyten durch H89

WT-Thrombozyten wurden 20 min bei 37 °C mit steigenden Konzentrationen (25 -75 μM) H89 vorinkubiert, dann wurde die cG-Kinase durch Zugabe von 1 mM 8-Br-cGMP aktiviert (30 min, 37 °C). Im Western Blot wurden die beiden P-VASP-AK, der P- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -AK und die jeweiligen Gesamt-AK eingesetzt.

Parallel zur VASP- und zur $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung wurde die Phosphorylierung von IRAG an Ser664 untersucht. In humanen Thrombozyten wurden drei *in-vivo*-Phosphorylierungsstellen identifiziert: Ser374, Ser664 und Ser677 (Antl *et al.*, 2007). Ser664 und Ser677 wurden dabei durch cGMP-Stimulation verstärkt phosphoryliert, während Ser374 eine konstitutive Phosphorylierung zeigte. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Mausthrombozyten die Zunahme der Phosphorylierung an Ser664

untersucht. Die densitometrische Vermessung der Banden, die mit dem Phospho-AK detektiert worden waren, ergab eine cGMP-abhängige Zunahme der IRAG-Phosphorylierung um das ca. 5-fache (s. Abb. 16 A und Abb. 21) (WT + cGMP [n = 11]: 5.116 ± 0.790 ; x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe). Dies stimmt gut mit den Ergebnissen in den humanen Thrombozyten überein, als nach 30-minütiger Stimulation mit $200 \mu\text{M}$ 8-pCPT-cGMP ebenfalls ein Anstieg der IRAG-Phosphorylierung um das ca. 5-fache beobachtet wurde (Antl *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung wurde dabei ebenfalls mit dem P-Ser664-AK detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den gleichen Bedingungen, unter welchen der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ cGMP-stimuliert phosphoryliert wird, auch IRAG phosphoryliert wird, was – wie bereits bekannt – mit einer Hemmung der Calciumfreisetzung aus dem ER einhergeht (Ammendola *et al.*, 2001).

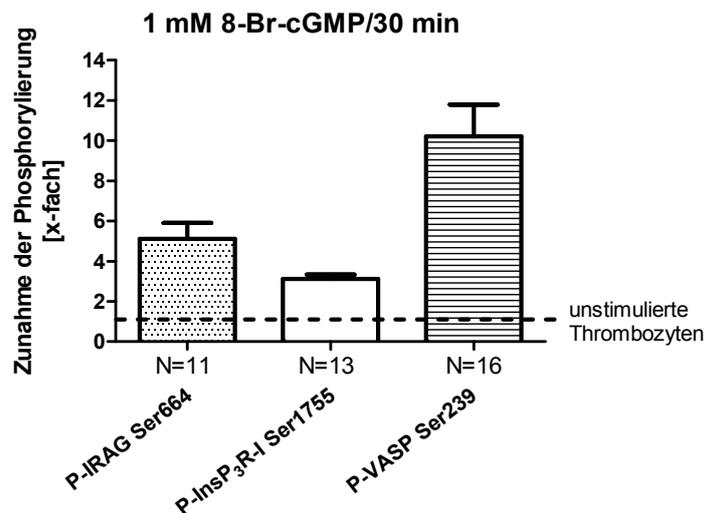


Abb. 21: Statistik zur cGMP-stimulierten Phosphorylierung von $\text{InsP}_3\text{R-I}$, IRAG und VASP in WT-Thrombozyten

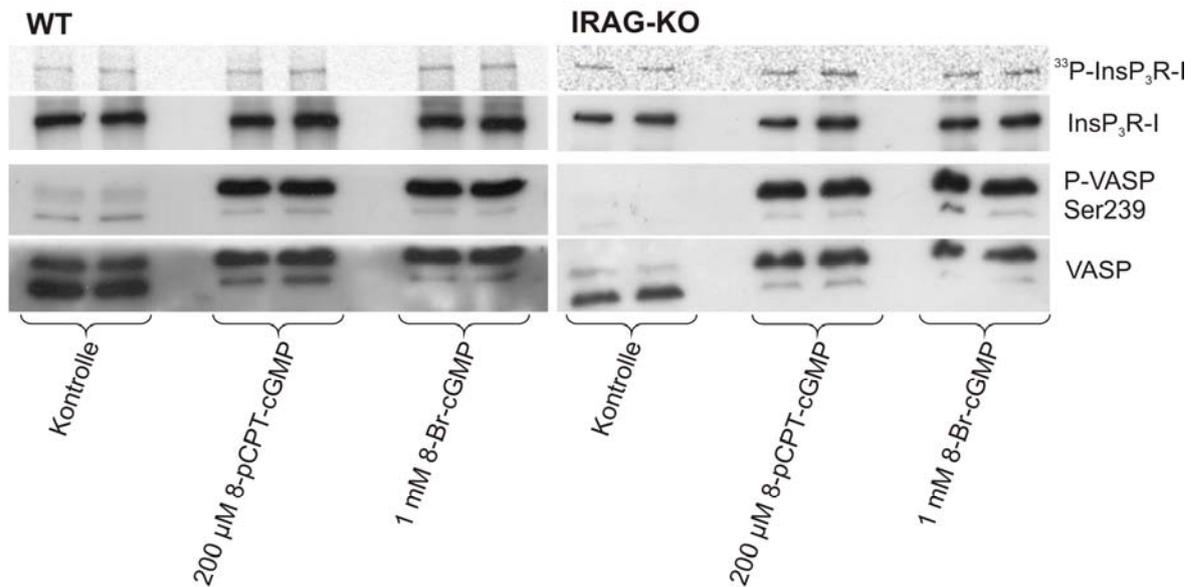
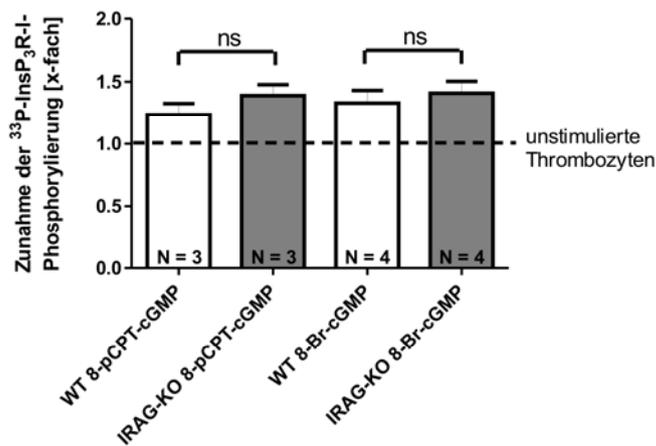
In-vivo-Phosphorylierung in Thrombozyten: Stimulation mit 1 mM 8-Br-cGMP über 30 min bei 37 °C, dann SDS-PAGE und Western Blot mit den jeweiligen Phospho- und Gesamt-AK. Statistik der densitometrischen Vermessung.

C.1.1.4 Bestimmung der Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ mittels ^{33}P -Markierung und Autoradiographie

Mit dem verwendeten P- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -AK konnte nur die Phosphorylierung an Ser1755 detektiert werden. Möglicherweise wird aber die Calciumfreisetzung durch den $\text{InsP}_3\text{R-I}$ durch Phosphorylierung einer anderen Aminosäure beeinflusst. Um eine eventuelle cGKI-vermittelte Phosphorylierung an weiteren Aminosäuren, zum Beispiel an der bekannten PKA-Phosphorylierungsstelle Ser1589 oder an einer unbekannt Aminosäure, detektieren zu können, wurde die cGMP-stimulierte „Gesamt“-Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in Thrombozyten mittels ^{33}P -Markierung und Autoradiographie untersucht. Dafür wurden Thrombozyten mit $^{33}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ inkubiert, wodurch die Übertragung von ^{33}P -Phosphat auf die Substratproteine der cGK ermöglicht wurde. Nach der $^{33}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ -Inkubation wurde die cG-Kinase wie bei der Untersuchung der vorher beschriebenen Phosphorylierung an Ser1755 mit den membrangängigen cGMP-Analoga 8-Br-cGMP und 8-pCPT-cGMP stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Gesamtheit des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ – der phosphorylierte und der unphosphorylierte Rezeptor - immunpräzipitiert, die gebundenen Proteine mit Laemmli-Puffer von der Protein A-Sepharose eluiert und über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine geblottet und die Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ im Autoradiogramm detektiert. Die cGMP-stimulierte Zunahme der Phosphorylierung wurde unter Einbeziehung der Gesamtmenge an $\text{InsP}_3\text{R-I}$ berechnet. Als Kontrolle der Aktivierung der cG-Kinase diente wie bei der Ser1755-Phosphorylierung der Anstieg der VASP-Phosphorylierung an der cGKI-Phosphorylierungsstelle Ser239.

Das Ergebnis war eine schwache Zunahme der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung nach Stimulation mit cGMP, die bei den IRAG-KO-Thrombozyten etwas höher als bei den WT-Thrombozyten ausfiel. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach Inkubation mit 8-Br-cGMP war der Anstieg etwas stärker als nach Gabe von 8-pCPT-cGMP (WT + 8-pCPT-cGMP [n = 3]: $1,236 \pm 0.090$, x-fache Zunahme gegenüber unstimulierter Probe; IRAG-KO + 8-pCPT-cGMP [n = 3]: $1,389 \pm 0.088$; WT + 8-Br-cGMP [n = 4]: $1,329 \pm 0.101$; IRAG-KO + 8-Br-cGMP [n = 4]: $1,409 \pm 0.094$).

Beim VASP-Protein war sowohl im Wildtyp als auch im IRAG-KO eine starke Zunahme der Phosphorylierung an Ser239 nach Stimulation mit cGMP zu beobachten. Dabei führten 8-Br-cGMP und 8-pCPT-cGMP zu einer gleich starken Aktivierung der cG-Kinase, was im Western Blot sichtbar wurde (s. Abb. 22 A).

A**B****Abb. 22: *in-vivo*-Phosphorylierung in Thrombozyten und Autoradiographie**

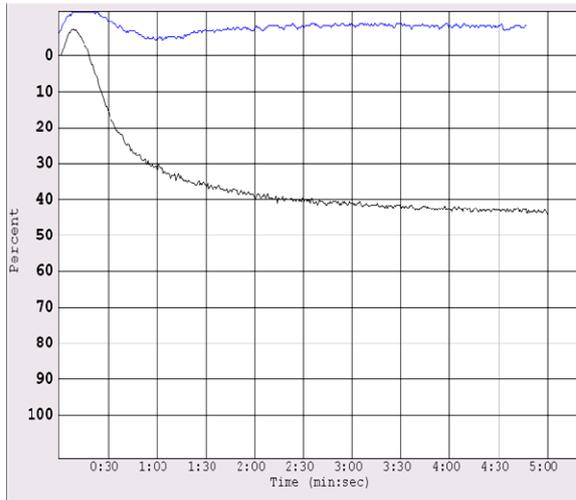
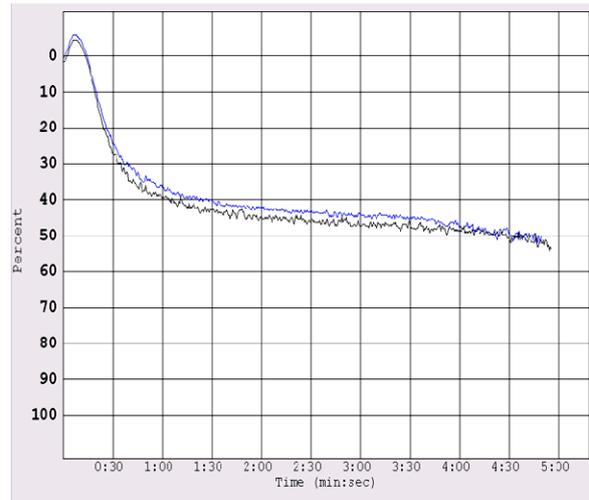
WT- und IRAG-KO-Thrombozyten wurden mit ³³P-H₃PO₄ inkubiert, dann mit cGMP stimuliert und der InsP₃R-I nach der Solubilisierung immunpräzipitiert. Nach der Elution von der Sepharose wurden die gebundenen Proteine über ein 10%-Acrylamidgel aufgetrennt und geblottet. A) Autoradiogramm des phosphorylierten, immunpräzipitierten InsP₃R-I, Immundetektion des Gesamt-InsP₃R-I. Zur Kontrolle der cGKI-Aktivität wurden nach der Stimulation 15 μg Protein von jeder Probe abgenommen. Die Kontrollen wurden auf ein eigenes Gel aufgetragen und die Proteine nach der SDS-PAGE geblottet. Inkubation der PVDF-Membran mit dem anti-P-VASP-AK (Ser239) und mit dem anti-VASP-AK. B) Statistik der InsP₃R-I-Phosphorylierung: Es wurde ein Student t-Test mit $p < 0,05$ durchgeführt.

C.1.2 cGMP-stimulierte Hemmung der Thrombozytenaggregation

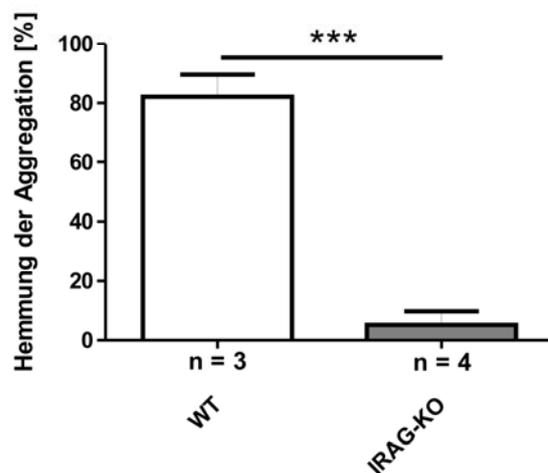
Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung wurden mit Thrombozyten Aggregationsexperimente unter den gleichen Bedingungen wie die Phosphorylierungsexperimente durchgeführt. Wildtyp- und IRAG-KO-Thrombozyten wurden dabei nach Protokoll isoliert, 30 Minuten bei 37 °C mit 1 mM 8-Br-cGMP vorinkubiert, dann wurde die Aggregation durch Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin stimuliert. In Abb. 23 A ist je ein Beispiel für ein Aggregationsexperiment mit WT- und IRAG-KO-Thrombozyten dargestellt. Nach Thrombinzugabe war zuerst eine Abnahme der Lichttransmission zu beobachten, die durch den „shape change“ der Thrombozyten verursacht wurde. Anschließend nahm in beiden Kontrollen (- cGMP; schwarze Kurven) die Transmission durch Zusammenlagerung der Thrombozyten zu größeren Aggregaten immer mehr zu. Durch Vorinkubation mit cGMP konnte im Wildtyp die Aggregation gehemmt werden, weswegen die blaue Kurve (+ cGMP) nach dem „shape change“ nicht weiter abfiel. Im IRAG-KO dagegen waren beide Kurven beinahe identisch, da die Aggregation durch Vorinkubation mit 8-Br-cGMP nicht inhibiert werden konnte.

In den Wildtyp-Thrombozyten war eine über 80 %-ige cGMP-vermittelte Hemmung der Aggregation zu beobachten, während im IRAG-KO die Hemmung fast vollständig aufgehoben war (WT + cGMP [n = 3]: 82.11 % \pm 7.48, % Hemmung gegenüber Kontrolle ohne cGMP; IRAG-KO + cGMP [n = 4]: 5.214 % \pm 4.59) (s. Abb. 23 B).

Da bei den vorhergehenden Aggregations- und Sekretionsuntersuchungen (Schinner *et al.*, 2011) jeweils 10 Minuten mit 8-pCPT-cGMP vorinkubiert worden war, wurde diese Inkubationszeit zusätzlich auch mit 8-Br-cGMP getestet. Unter diesen Bedingungen konnte in den WT-Thrombozyten die Aggregation ebenfalls signifikant stärker gehemmt werden als in den IRAG-KO-Thrombozyten, allerdings war die Hemmung im Wildtyp schwächer als nach 30 Minuten 8-Br-cGMP-Inkubation (WT + cGMP [n = 6]: 67.55 % \pm 12.18 Aggregationshemmung gegenüber Kontrolle ohne cGMP; IRAG-KO + cGMP [n = 6]: 9.336 % \pm 4.349) (s. Abb. 23 C).

A**WT****IRAG-KO****B**

0,1 U/ml Thrombin
1 mM 8-Br-cGMP: 30 min

**C**

0,1 U/ml Thrombin
1 mM 8-Br-cGMP: 10 min

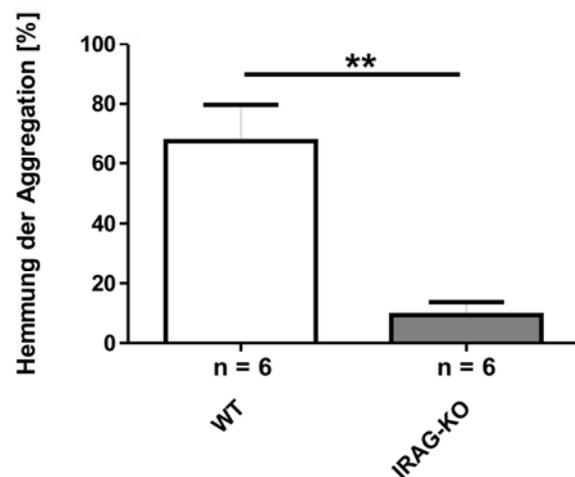


Abb. 23: cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation

Thrombozyten wurden 10 bzw. 30 min mit 1 mM 8-Br-cGMP bzw. H₂O vorinkubiert, dann erfolgte die Stimulation der Aggregation durch Zugabe von 0,1 U/ml Thrombin. Messung der Aggregation mit dem Luminoaggregometer. A) Jeweils ein Beispiel einer Aggregationskurve für WT- und IRAG-KO-Thrombozyten (30 min cGMP-Vorinkubation): Es ist die Transmission [%] in Abhängigkeit von der Zeit [min] dargestellt; die schwarze Kurve steht für die Kontrolle (-cGMP), die blaue Kurve zeigt den Verlauf nach cGMP-Gabe.

B) Statistik bei 30 min Vorinkubation mit 8-Br-cGMP. C) Statistik bei 10 min Vorinkubation mit 8-Br-cGMP. Jeweils Student t-Test mit $p < 0,05$.

C.1.3 Phosphorylierung des InsP₃R-I in humanen Thrombozyten und in murinem Aortenlysat

Zusätzlich zu den Mausthrombozyten wurde auch in humanen Thrombozyten die Phosphorylierung des InsP₃R-I untersucht, um die Speziesabhängigkeit dieser Phosphorylierung zu testen. Es zeigte sich, dass der InsP₃R-I auch in humanen Thrombozyten cGMP-stimuliert vermehrt phosphoryliert wird. Diese Zunahme der Phosphorylierung konnte ebenfalls durch den cG-Kinase-Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS gehemmt werden (s. Abb. 24 A). Daraus kann gefolgert werden, dass die Zunahme der Phosphorylierung auch hier durch die cGKI vermittelt wurde. Da in humanen Thrombozyten im Gegensatz zu den Mausthrombozyten nur cGKI β , aber keine cGKI α exprimiert wird, muss hier die cG-Kinase-vermittelte Phosphorylierung durch die cGKI β -Isoform erfolgen. Die densitometrische Vermessung der Western Blots ergab eine gleich starke Zunahme der Phosphorylierung in den humanen Thrombozyten wie in den Mausthrombozyten (Human + cGMP [n = 5]: 3.334 \pm 0.519, x-fache Zunahme gegenüber Kontrolle ohne cGMP; Maus + cGMP [n = 16]: 3.404 \pm 0.319) (s. Abb. 24 C).

Um auch andere Gewebe zu testen, wurde die InsP₃R-I-Phosphorylierung anschließend in Aortenlysat von WT-Mäusen untersucht. Wie in den Thrombozyten spielt auch in der Aorta die NO/cGMP-vermittelte Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum funktionell eine wichtige Rolle, was durch Relaxationsversuche mit WT- und IRAG-KO-Aorten nachgewiesen werden konnte (Desch *et al.*, 2010). In der Aorta der IRAG-KO-Mäuse war dabei die 8-Br-cGMP-vermittelte Relaxation stark gehemmt. Die Aortenstimulation mit 1 mM 8-Br-cGMP ergab eine Zunahme der InsP₃R-I-Phosphorylierung um das ca. 3-fache (Aorta + cGMP [n = 3]: 3.083 \pm 0.082, x-fache Zunahme gegenüber Kontrolle ohne cGMP), was sich nicht signifikant von der Phosphorylierung in den Thrombozyten unterschied (s. Abb. 24 B/C). Allerdings handelte es sich beim Aortenversuch nicht wie bei den Thrombozyten um eine *in-vivo*-Phosphorylierung, sondern um eine *in-vitro*-Phosphorylierung, da kein intaktes Gewebe, sondern ein Lysat verwendet wurde. Das heißt, dass die im Lysat beobachtete Phosphorylierung nicht unbedingt auch im intakten Gewebe bzw. Gefäß auftreten muss. Der hier analysierte *in-vitro*-Versuch ist aber ein erster Hinweis auf eine *in-vivo*-Phosphorylierung. Diese sollte am intakten Gefäß noch durchgeführt werden.

Zusammenfassend wurde die Phosphorylierung des InsP₃R-I an Ser1755 in murinen und humanen Thrombozyten und in murinem Aortenlysat untersucht. Durch eine 30-minütige Inkubation mit 1 mM 8-Br-cGMP konnte jeweils eine Zunahme der Phosphorylierung um das ca. 3-fache erzielt werden.

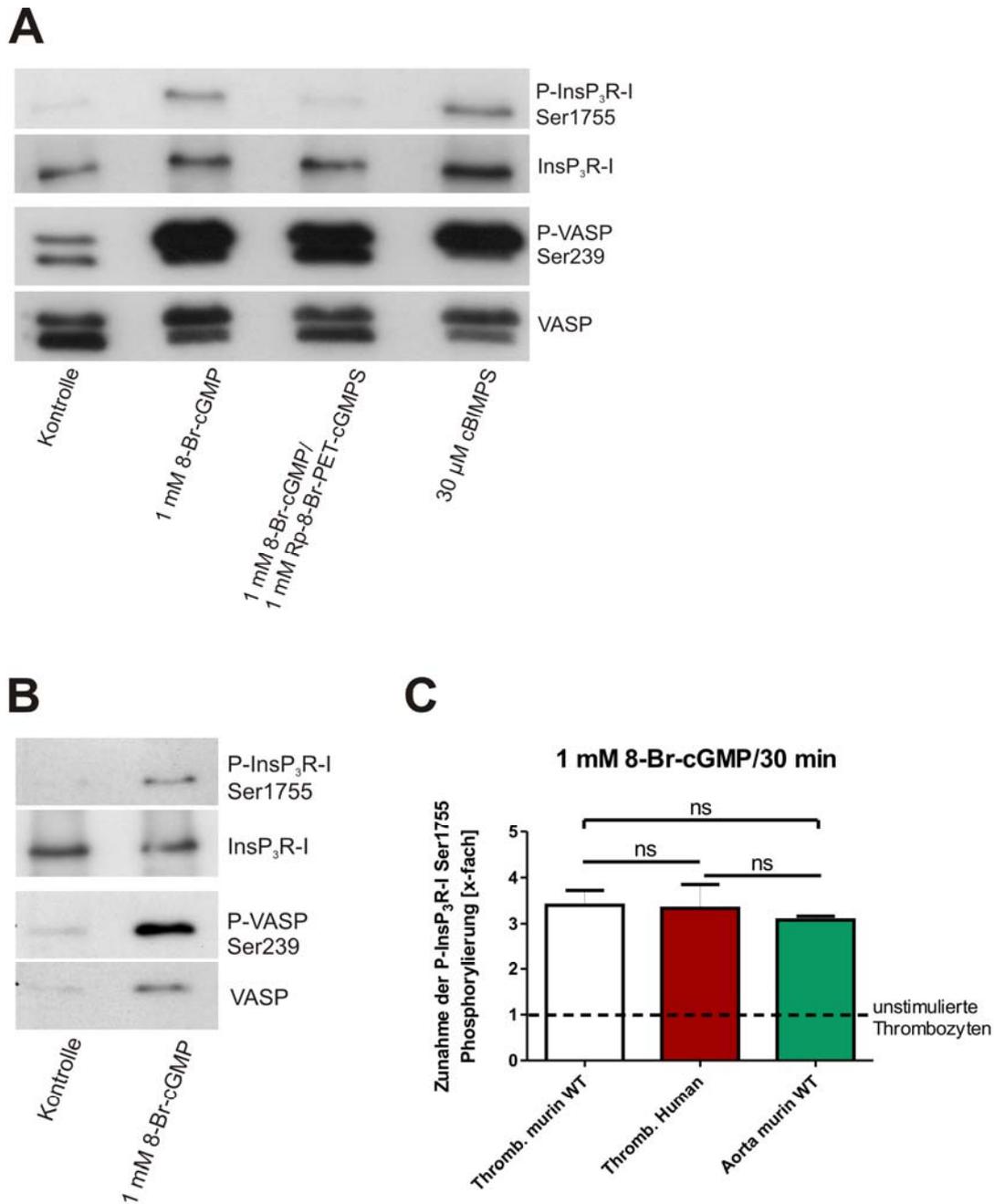


Abb. 24: InsP₃R-I-Phosphorylierung (an Ser1755) in humanen Thrombozyten und in murinem Aortenlysat

Die Phosphorylierung von InsP₃R-I und VASP wurde im Immunblot mit den jeweiligen Phosphoantikörpern detektiert. Zur Bestimmung der Gesamtmenge der beiden Proteine wurden die entsprechenden Gesamt-AK eingesetzt. A) Humane Thrombozyten: Stimulation der cG-Kinase mit 8-Br-cGMP, Hemmung der cGKI durch Vorinkubation mit Rp-8-Br-PET-cGMPS und Stimulation der PKA mit dem cAMP-Analagon cBIMPS. B) *In-vitro*-Phosphorylierung des InsP₃R-I in murinem WT-Aortenlysat durch Inkubation mit 1 mM 8-Br-cGMP. C) Statistik der InsP₃R-I-Phosphorylierung (Ser1755): Einfaktorielle Varianzanalyse und Bonferroni-Test, $p < 0,05$.

C.1.4 Stimulation der PKA in Thrombozyten

C.1.4.1 Stimulation mit cBIMPS, Forskolin und Iloprost

Laut Literatur kann neben der cG-Kinase auch die Proteinkinase A den $\text{InsP}_3\text{R-I}$ an Ser1755 phosphorylieren. Der Effekt dieser $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung wurde dabei durch Expression und Phosphorylierung des Rezeptors in DT-40-Zellen untersucht, in welchen alle drei Formen des InsP_3 -Rezeptors ($\text{InsP}_3\text{R-I/II/III}$) ausgeschaltet waren (DT-40 3ko-Zellen (Miyakawa *et al.*, 1999)). Eine PKA-stimulierte Phosphorylierung der S^2 - $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Spleißvariante an Ser1755 und zusätzlich an Ser1589 führte zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration in den DT-40 3ko-Zellen, die mit dieser Rezeptor-cDNA transfiziert worden waren (Wagner *et al.*, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die cAMP-stimulierte Phosphorylierung in Thrombozyten analog der cGMP-Stimulation mit einem membranpermeablen, nicht PDE-sensitiven cAMP-Analogen, Sp-5,6-DCI-cBIMPS, durchgeführt. Die Phosphorylierung erfolgte bei 37 °C, zwischen 2 und 30 min, unter Verwendung einer cBIMPS-Konzentration von 30 μM , welche unter anderem zu einer Hemmung der Collagen-induzierten Thrombozyten-Aggregation führte (Antl *et al.*, 2007). Zur Kontrolle der PKA-Stimulation wurde bei diesen Experimenten im Western Blot ein Phospho-VASP-AK verwendet, der die cAMP/PKA-vermittelte Phosphorylierung von VASP an Ser157 erkennt. Das Ergebnis war ein Maximum der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung (an Ser1755) bereits nach 2 min Stimulation (untere Bande), während die VASP-Phosphorylierung erst nach 30 min ihr Maximum erreichte (s. Abb. 25). Zusätzlich wurde ab einer Inkubationszeit von 5 min mit dem P- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -AK eine zweite Bande oberhalb des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ detektiert, die mit der Zeit immer deutlicher wurde. Im Datenblatt des P- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -AK (Cell Signaling) ist Ser1755 als Phosphorylierungsstelle der PKA beschrieben, allerdings wird nicht erwähnt, dass nach PKA-Stimulation eine zweite Bande auftritt. Der Antikörper wurde vom Hersteller mit Proteinlysate aus murinem Gehirn getestet, über die cAMP-abhängige Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in Mausthrombozyten sind keine Daten verfügbar. Die zusätzliche Bande kann kein „shift“ des phosphorylierten $\text{InsP}_3\text{R-I}$ sein, da sie mit dem Gesamt- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -AK nicht detektiert wurde. Um nachzuweisen, dass diese Bande tatsächlich durch die cAMP-stimulierte Phosphorylierung eines Proteins hervorgerufen wurde, wurde die PKA gehemmt. Die Thrombozyten wurden 20 min lang mit dem PKA-Inhibitor H89 vorinkubiert, dann wurde 30 μM cBIMPS zugegeben und anschließend 30 min bei 37 °C stimuliert. Es zeigte sich, dass mit dem AK tatsächlich eine spezifische PKA-vermittelte Phosphorylierung detektiert wurde, da die Bande bei Einsatz steigender H89-Konzentrationen immer schwächer wurde (s. Abb. 26 A). Als Kontrolle der Inhibition der PKA diente die Abnahme der VASP-Phosphorylierung an der PKA-Phosphorylierungsstelle Ser157. Zusätzlich wurde der cGKI-Inhibitor Rp-8-Br-PET-

cGMPS eingesetzt, der bei Stimulation mit cBIMPS keinen Effekt auf die zweite Bande hatte (s. Abb. 26 B).

Zusätzlich zum cAMP-Analogon cBIMPS wurden der Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin und das Prostacyclinanalogon Iloprost, welches durch Stimulation G_s -gekoppelter Rezeptoren die Adenylatcyclase aktiviert, eingesetzt (s. Abb. 27). Beide Aktivatoren greifen oberhalb von cBIMPS in die $G_s/AC/cAMP$ -Signalkaskade ein und sind deshalb ein zusätzlicher Hinweis auf eine spezifische PKA-vermittelte Phosphorylierung. Bei beiden Aktivatoren war nach 30 min Stimulation bei 37 °C sowohl bei WT- als auch bei IRAG-KO-Thrombozyten ebenfalls die 2. Bande im Western Blot detektierbar. Auch die durch Forskolin und Iloprost hervorgerufene Phosphorylierung konnte durch PKA-Inhibition vermindert werden (s. Abb. 28), was die Vermutung weiter unterstützt, dass es sich um eine spezifische PKA-abhängige Phosphorylierung handelt.

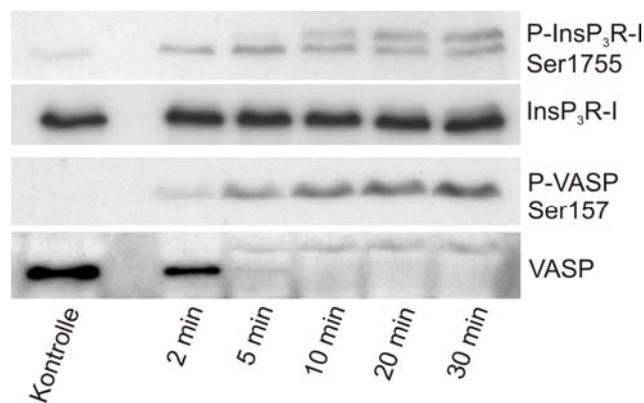
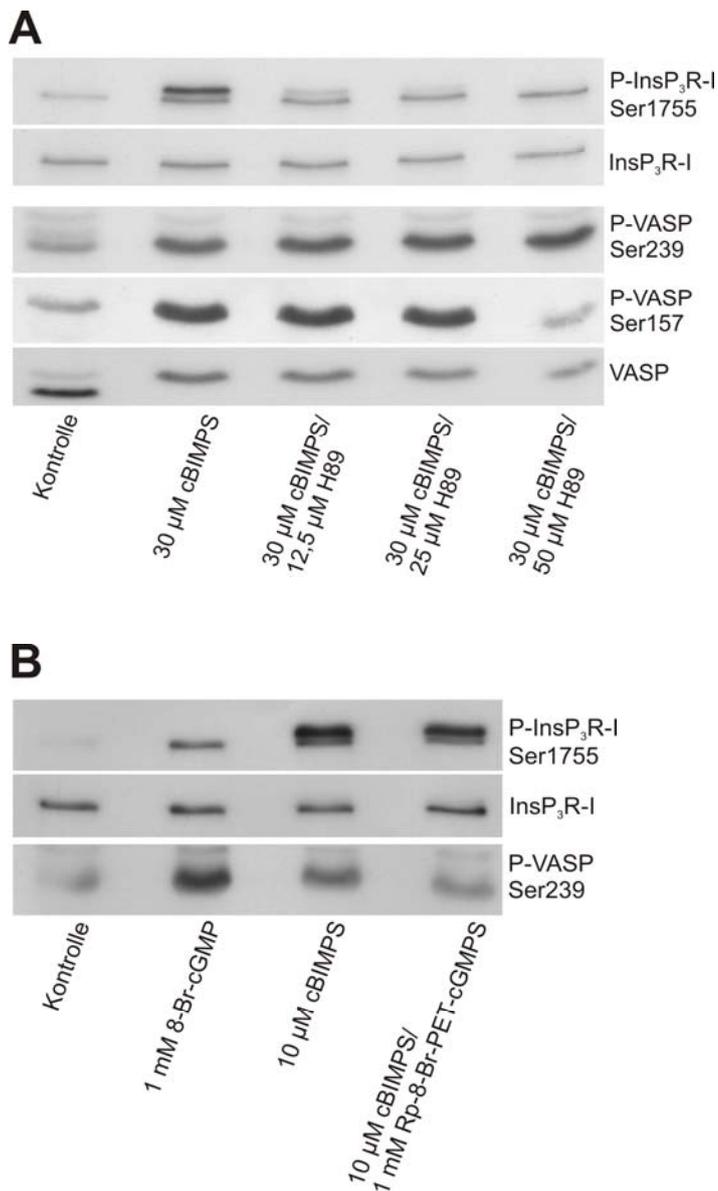


Abb. 25: Zeitabhängige Phosphorylierung von InsP₃R-I und VASP in Thrombozyten durch PKA-Stimulation mit cBIMPS

Stimulation von WT-Thrombozyten mit 30 μ M Sp-5,6-DCI-cBIMPS, Inkubation bei 37 °C zwischen 2 und 30 Minuten. Inkubation mit anti-P-InsP₃R-I-AK (Ser1755) und anti-P-VASP-AK (Ser157) zur Detektion der PKA-vermittelten Phosphorylierung. Nach dem Strippen Inkubation mit den jeweiligen Gesamt-AK.

**Abb. 26: Hemmung von PKA und cGKI in WT-Thrombozyten**

A) WT-Thrombozyten wurden 20 min mit steigenden Konzentrationen H89 vorinkubiert, dann erfolgte die Stimulation der PKA durch Inkubation mit 30 μM cBIMPS über 30 min. B) Hemmung der cBIMPS-stimulierten Phosphorylierung durch Rp-8-Br-PET-cGMPs. Es wurde 20 min mit Inhibitor vorinkubiert, dann wurde 30 min mit cBIMPS stimuliert. Im Western Blot wurden jeweils die entsprechenden Phospho- und Gesamt-AK eingesetzt.

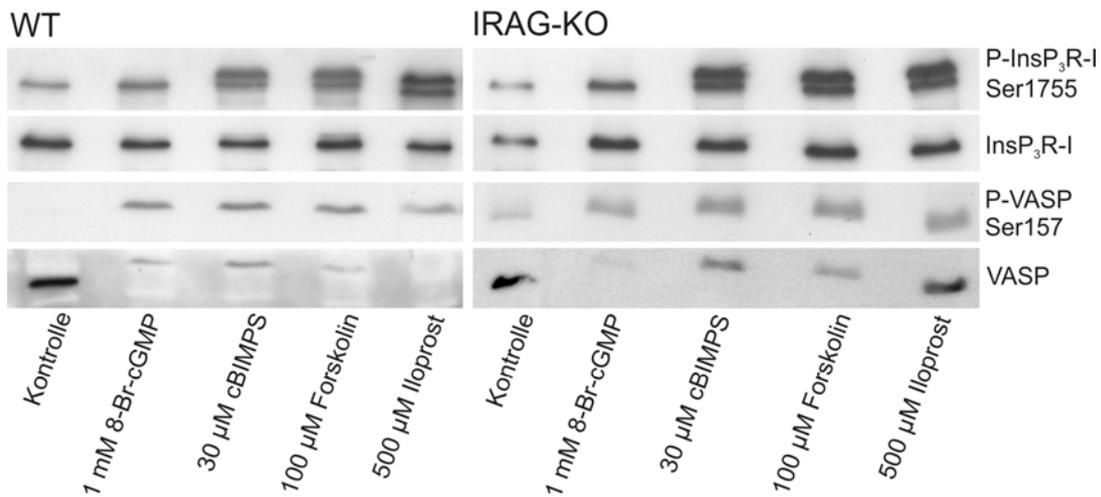


Abb. 27: Gs/AC/cAMP-vermittelte Phosphorylierung von InsP₃R-I und VASP in Thrombozyten

Stimulation von WT- und IRAG-KO-Thrombozyten mit dem cAMP-Analogon cBIMPS, mit Forskolin und mit Iloprost (30 min, 37 °C). Detektion von P-InsP₃R-I (Ser1755), InsP₃R-I, P-VASP (Ser157) und VASP im Western Blot.

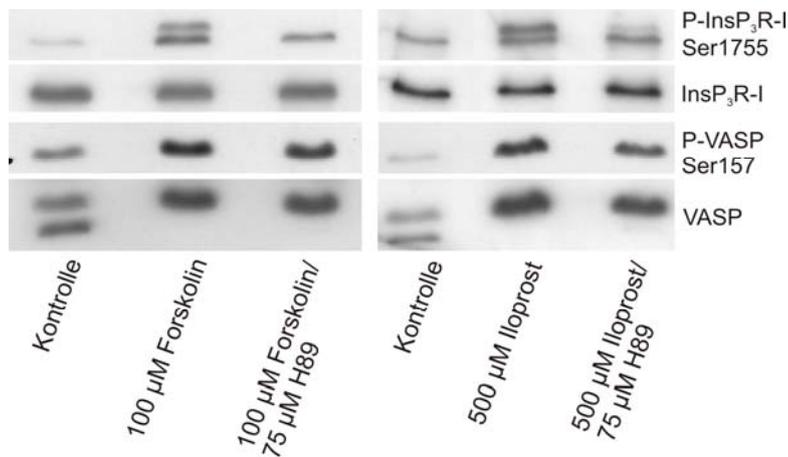


Abb. 28: Hemmung der Forskolin- und Iloprost-stimulierten Phosphorylierung in WT-Thrombozyten durch H89

WT-Thrombozyten wurden 20 min mit dem PKA-Inhibitor H89 vorinkubiert, dann 30 min mit Forskolin bzw. Iloprost stimuliert. Detektion von P-InsP₃R-I (Ser1755), InsP₃R-I, P-VASP (Ser157) und VASP.

Wurden jedoch humane Thrombozyten mit cBIMPS stimuliert, so war die zusätzliche Bande nicht zu erkennen (s. Abb. 24 A). Das heißt, dass das detektierte Protein in humanen Thrombozyten unter den gleichen Bedingungen nicht phosphoryliert wurde oder nach erfolgter Phosphorylierung nicht vom P-InsP₃R-I-AK erkannt wurde. Wenn sich das humane und das Mausprotein in der Sequenz deutlich unterscheiden, ist es möglich, dass der Antikörper nur das murine Protein erkennt. Die Beobachtung der fehlenden Bande in humanen Thrombozyten spricht zusätzlich dagegen, dass es sich beim in den

Mausthrombozyten detektierten Protein um den $\text{InsP}_3\text{R-I}$ handelt. Sowohl der phosphorylierte humane als auch der phosphorylierte murine $\text{InsP}_3\text{R-I}$ werden vom Phospho-AK erkannt, weswegen es unwahrscheinlich ist, dass ein „shift“ des Rezeptors nur in einer Spezies detektiert wird.

C.1.4.2 Identifikation eines durch die PKA phosphorylierten, mit dem anti-P- $\text{InsP}_3\text{R-I-AK}$ (Ser1755) detektierten unbekanntem Proteins

Auch der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ und der $\text{InsP}_3\text{R-III}$ können durch die PKA phosphoryliert werden. Nach Stimulation der AC mit Forskolin wurde in COS-7-Zellen eine Zunahme der Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-II}$ beobachtet, wobei als Phosphorylierungsstelle die Aminosäure Ser937 ermittelt wurde (Betzenhauser *et al.*, 2009). In Parotiszellen, in welchen die PKA-Aktivierung zu einer Steigerung der Flüssigkeitssekretion führt, wurde nach Forskolin-Gabe ebenfalls eine $\text{InsP}_3\text{R-II}$ -Phosphorylierung detektiert (Yule *et al.*, 2003). Yule *et al.* konnten zudem nach Stimulation mit Cholecystokinin und Forskolin eine Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-III}$ in Pankreaszellen nachweisen. Bei der Expression des Ratten- $\text{InsP}_3\text{R-III}$ in DT40-Zellen ergaben sich nach Forskolin-Stimulation drei PKA-Phosphorylierungsstellen, nämlich Ser916, Ser934 und Ser1832 (Soulsby & Wojcikiewicz, 2007).

Nach cAMP-Stimulation wurden Western Blot-Membranen mit anti- $\text{InsP}_3\text{R-II}$ - und - III-AK inkubiert. Es zeigte sich, dass das unbekannte Protein nicht mit dem $\text{InsP}_3\text{R-III}$ identisch sein kann, da dieser in der SDS-PAGE ein kleineres apparentes Molekulargewicht, welches dem des unphosphorylierten $\text{InsP}_3\text{R-I}$ vergleichbar war, aufwies (Daten nicht gezeigt). Dagegen war die Laufhöhe des $\text{InsP}_3\text{R-II}$ mit der des unbekanntem Proteins vergleichbar (s. Abb. 29 A).

Um das unbekannte Protein identifizieren zu können, sollte es als Nächstes gegenüber den anderen Thrombozytenproteinen angereichert werden. Eine Möglichkeit bot die Heparin-Agarose, mit welcher InsP_3 -Rezeptoren aufkonzentriert werden können, da Heparin ein kompetitiver Antagonist an InsP_3 -Rezeptoren ist (Bultynck *et al.*, 2003). Mit Hilfe von Heparin-Agarosefällungen wurde 1989 der InsP_3 -Rezeptor aus solubilisierten Liposomen aufgereinigt (Ferris *et al.*, 1989). Heparin-Agarose kann außer den InsP_3 -Rezeptoren auch verschiedene andere Proteine binden, unter anderem Wachstumsfaktoren, Lipoproteine und Gerinnungsfaktoren.

Als Erstes wurden Heparin-Agarosefällungen durchgeführt, bei welchen die Proteine anschließend mit Laemmli-Puffer eluiert und nach der SDS-PAGE mit Coomassie-Reagenz gefärbt wurden. Hierbei zeigte sich, dass relativ viele Proteine an Heparin-Agarose binden, allerdings war eine Anreicherung von Proteinen im großen

Molekulargewichtsbereich zu sehen (s. Abb. 29 B). Auch die InsP_3 -Rezeptoren liegen im Acrylamidgel oberhalb der 170 kDa-Bande. Im Western Blot zeigte sich in der Heparin-Agarosefällung eine Anreicherung von $\text{InsP}_3\text{R-I}$ und eine gute Bindung von $\text{InsP}_3\text{R-II}$ (s. Abb. 29 C). Die mit dem $\text{InsP}_3\text{R-I}$ interagierenden Proteine IRAG und $\text{cGKI}\beta$ wurden ebenfalls gebunden. Auch $\text{cGKI}\alpha$ wurde detektiert, was ebenso wie die vielen Banden in der Coomassie-Färbung für unspezifische Bindungen spricht, da diese Kinaseisoform – soweit bekannt – nicht mit InsP_3 -Rezeptoren interagiert.

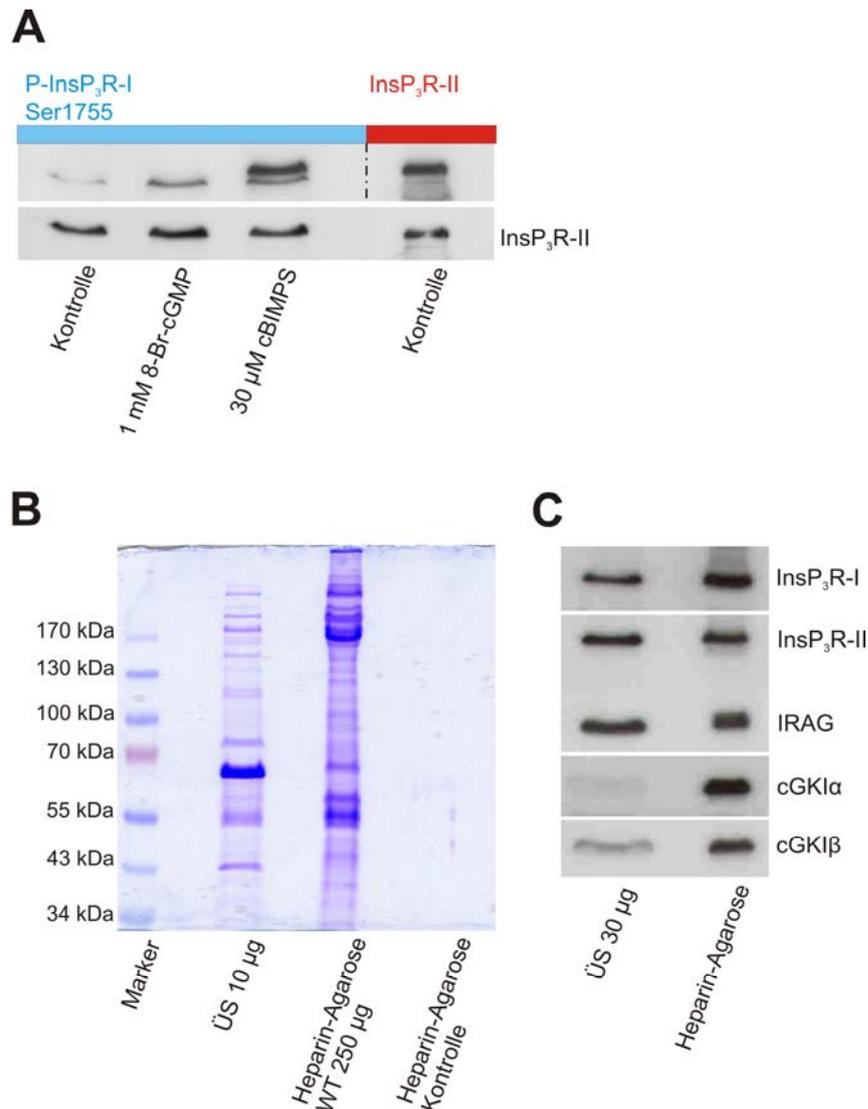


Abb. 29: Aufreinigung der InsP_3R mittels Heparin-Agarose

A) Vergleich der apparenten Molekulargewichte im Immunblot: Der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ und das unbekannte Protein zeigen das gleiche apparente Molekulargewicht. B) Coomassiegel einer Heparin-Agarosefällung mit WT-Thrombozytenlysat. Als Kontrolle Heparin-Agarose ohne Protein zur Erkennung von Banden, die durch die Agarose verursacht wurden. C) Western Blot einer Heparin-Agarosefällung mit WT-Thrombozyten (250 μg Protein): Detektion von $\text{InsP}_3\text{R-I}$, $\text{InsP}_3\text{R-II}$, IRAG und $\text{cGKI}\alpha/\beta$.

Anschließend wurde eine Heparin-Agarosefällung nach cBIMPS-Stimulation von WT-Thrombozyten durchgeführt, um zu untersuchen, ob das unbekannte Protein ebenso wie der InsP₃R-II an die Agarose bindet. Tatsächlich banden sowohl der InsP₃R-I, als auch das zu identifizierende Protein und der InsP₃R-II komplett an die Agarose (s. Abb. 30).

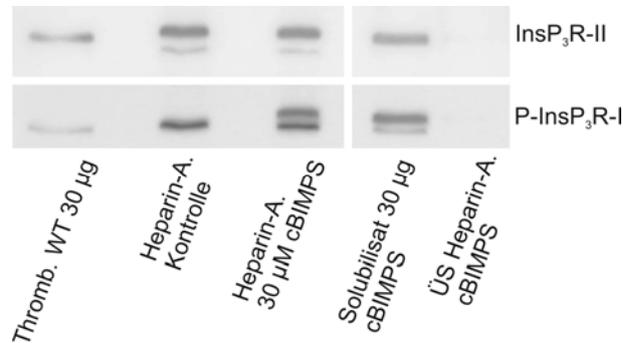


Abb. 30: Heparin-Agarosefällung nach cBIMPS-Stimulation

WT-Thrombozyten (300 µg) wurden mit cBIMPS stimuliert. Nach der Solubilisierung der Proteine wurde eine Heparin-Agarosefällung durchgeführt. Detektion von InsP₃R-II und P-InsP₃R-I in der Heparin-Agarosefällung. Im Überstand nach der Fällung waren der InsP₃R-II und das unbekannte Protein nicht mehr enthalten.

Der nächste Schritt war die Sequenzierung des unbekanntes Proteins nach dem Ausschneiden der entsprechenden Proteinbande aus dem Polyacrylamidgel. Es wurde eine Heparin-Agarosefällung nach cBIMPS-Stimulation durchgeführt und die gebundenen Proteine mit Laemmli-Puffer eluiert. Dann wurde die Probe auf ein 7,5 %-Polyacrylamidgel aufgetragen, um eine gute Auftrennung der Proteine zu gewährleisten (s. Abb. 31). Auf der zweiten Hälfte des Gels wurden zwei stimulierte Proben von je 50 µg Protein aufgetragen, wobei eine Probe die Kontrolle war und die andere mit 30 µM cBIMPS behandelt worden war. Die eine Hälfte des Gels, auf dem sich die Heparin-Agarosefällung befand, wurde mit Coomassie-Reagenz gefärbt, die andere Hälfte wurde geblottet. Nach der Detektion der P-InsP₃R-I-Banden wurden die Western Blot-Membran und das Coomassiegel wieder zusammengefügt und die Banden verglichen. Die für das unbekannte Protein und für den InsP₃R-I in Frage kommenden Proteinbanden wurden aus dem Coomassiegel ausgeschnitten und am Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg (Herr Dr. Jörg Reinders) mittels MALDI-TOF sequenziert.

In Probe 1 konnte ein Protein mit seiner Phosphorylierungsstelle identifiziert werden, nämlich Filamin-A mit Ser2152, welches unter anderem durch die PKA phosphoryliert werden kann. Filamin-A (FLNa) gehört zur Gruppe der Aktin-bindenden Proteine und ist an der Quervernetzung von Aktinfilamenten, den Hauptbestandteilen des Zytoskeletts, beteiligt. In Thrombozyten verbindet Filamin-A den von-Willebrand-Faktor-Rezeptor mit dem Zytoskelett und spielt eine wichtige Rolle bei der von-Willebrand-Faktor-stimulierten Aktivierung der Blutplättchen (Falet *et al.*, 2010).

Um nachzuprüfen, ob es sich bei der Bande um phosphoryliertes Filamin-A handelt, wurde die PVDF-Membran aus Abb. 31 A gestriipt und mit einem anti-Filamin-A-Antikörper inkubiert. Ein Vergleich der P-InsP₃R-I-Bande mit der Filamin-A-Bande zeigte allerdings, dass Filamin-A im Gel ein größeres apparentes Molekulargewicht als das unbekannte Protein hat und dass es sich daher bei diesem nicht um Filamin-A handeln kann. Zusätzlich wurde mit einem anti-P-Filamin-A-AK inkubiert, der eine Phosphorylierung an Ser2152 detektierte. Hierbei konnte eine cBIMPS-stimulierte Zunahme der Filamin-A-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In allen drei Proben, die sequenziert wurden, konnten weder der InsP₃R-I noch der InsP₃R-II nachgewiesen werden, obwohl sie im Western Blot nach der Heparin-Agarosefällung detektiert worden waren. Es könnte sein, dass sie aber im Vergleich zu anderen Proteinen (Filamin-A) nur in sehr geringer Menge an die Agarose binden und deshalb in der Fällung nicht identifiziert werden konnten.

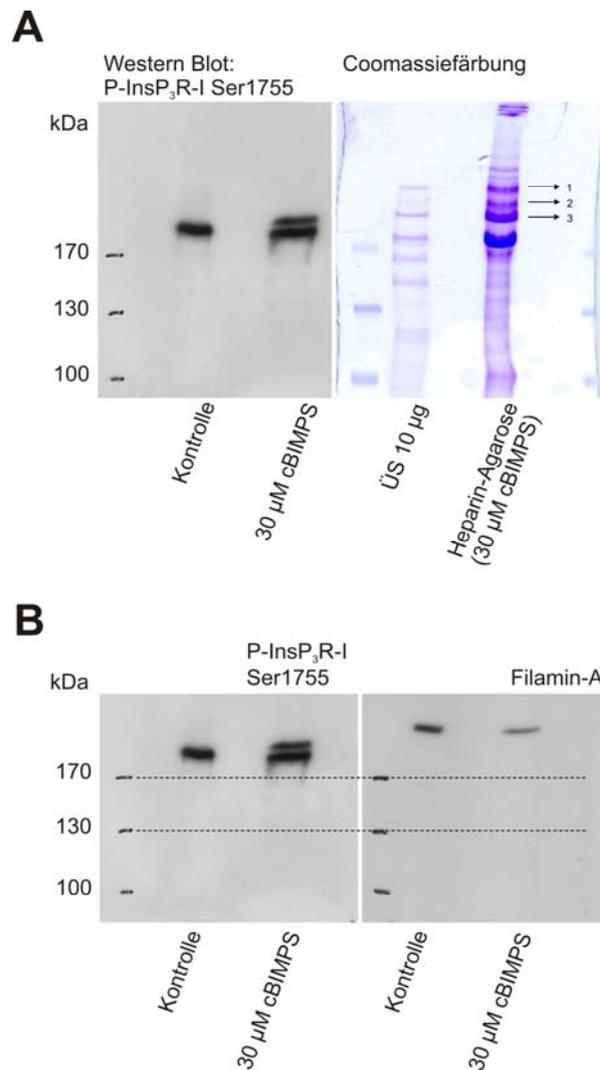


Abb. 31: Sequenzierung von Proteinen nach cBIMPS-Stimulation und nachfolgender Heparin-Agarosefällung

A) Rechte Seite: Heparin-Agarosefällung mit WT-Thrombozyten (300 μ g) nach cBIMPS-Stimulation. Die Probe wurde auf ein 7,5 %-Acrylamidgel aufgetragen, welches anschließend mit Coomassie-Reagenz gefärbt wurde. Die Banden 1, 2 und 3 wurden aus dem Coomassiegel ausgeschnitten und sequenziert.

Linke Seite: Western Blot nach Stimulation von WT-Thrombozyten: Es wurden je 50 μ g einer Kontrolle und einer cBIMPS-stimulierten Probe aufgetragen. Detektion von P-InsP₃R-I (Ser1755). B) Der zuerst mit anti-P-InsP₃R-I-AK behandelte Western Blot (31 A links) wurde gestrippt und anschließend mit anti-Filamin-A-Antikörper inkubiert.

Anschließend wurden cGMP-Agarosefällungen mit cBIMPS-stimulierten WT-Thrombozyten durchgeführt. Das unbekannte Protein wurde, ebenso wie der InsP₃R-II, nicht an die Agarose gebunden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Möglichkeit, um nachzuprüfen, ob es sich bei der nach cBIMPS-Stimulation detektierten Bande um den InsP₃R-II handelt, wäre die Immunpräzipitation des phosphorylierten InsP₃R-II mit anti-InsP₃R-II-AK. Jedoch war mit allen zur Verfügung stehenden Antikörpern eine Immunpräzipitation dieses InsP₃-Rezeptors nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

C.2 Untersuchung der IRAG-cGKI β -Interaktion in COS-7-Zellen

C.2.1 Untersuchung der Interaktion zwischen IRAG Δ Int und cGKI β mit Hilfe von cGMP-Agarosefällungen

Ammendola et al. (2001) beschrieben, dass die Aminosäuren 152-184 von IRAG mit dem N-terminalen Leuzin-Zipper von cGKI β durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäuren interagieren. Die IRAG-Interaktionsstelle wurde durch „yeast two-hybrid screening“ verschiedener IRAG- und cGKI-Fragmente ermittelt. Allerdings war nicht getestet worden, ob durch Deletion genau dieser 33 Aminosäuren im IRAG-Protein die Wechselwirkung mit der cGKI β vollständig aufgehoben wird oder ob es zusätzliche Interaktionsstellen gibt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das IRAG Δ Int-Konstrukt hergestellt, bei welchem es sich um das bovine IRAG α -Protein ohne die Aminosäuren 152-184 handelt. Die IRAG Δ Int-Mutante wurde ebenso wie das full-length-IRAG (nichtmodifiziertes IRAG-Protein voller Länge) gemeinsam mit der cGKI β in COS-7-Zellen, welche endogen weder IRAG noch cGKI β enthalten, exprimiert. Die für die Proteine kodierende cDNA wurde mittels Calciumphosphat-Transfektion in die COS-7-Zellen eingeschleust. Die Interaktion zwischen IRAG und cGKI β wurde anschließend in cGMP-Agarose-Fällungen mit dem COS-7-Zelllysate untersucht.

Es zeigte sich, dass IRAG Δ Int, im Gegensatz zum nichtmodifizierten WT-IRAG, welches als Positiv-Kontrolle diente, nicht mehr mit der cGKI wechselwirken kann (s. Abb. 32).

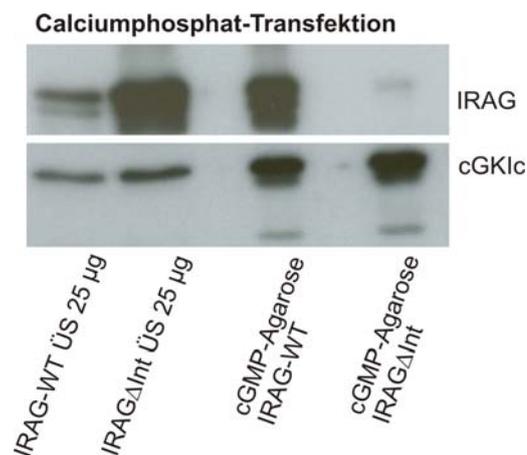


Abb. 32: Interaktion zwischen IRAG-WT oder IRAG Δ Int und cGKI β nach transienter Expression in COS-7-Zellen

Es wurden cGMP-Agarosefällungen mit je 200 µg Lysat von COS-7-Zellen, in welchen entweder IRAG-WT/cGKI β oder IRAG Δ Int/cGKI β überexprimiert worden waren, durchgeführt. Im Western Blot Detektion von IRAG und cGKI.

C.2.2 Untersuchung der Lokalisation heterolog exprimierter cGKI β in COS-7-Zellen nach Stimulation mit cGMP

In primären murinen Gefäßmuskelzellen (VSMC) waren sowohl cGKI α als auch cGKI β - ohne und nach cGMP-Stimulation - zytosolisch verteilt, cGKI α perinukleär und cGKI β in retikulären Strukturen (Desch *et al.*, 2010). Casteel *et al.* haben 2008 festgestellt, dass nach Co-Expression von IRAG und cGKI α bzw. IRAG und cGKI β in BHK-Zellen (baby hamster kidney cells), und anschließender cGMP-Stimulation der Zellen, nur die cGKI α eine Translokation vom Zytosol in den Zellkern erfährt (Casteel *et al.*, 2008). Daraus wurde geschlossen, dass IRAG ein extranukleärer Anker der cGKI β ist und dadurch die Translokation der Kinase in den Zellkern verhindert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zuerst die Lokalisation der überexprimierten cGKI β in COS-7-Zellen nach cGMP-Stimulation untersucht. Anschließend wurde getestet, ob sich die Verteilung der Kinase in der Zelle bei gleichzeitiger Expression von IRAG-WT bzw. IRAG Δ Int verändert.

Die COS-7-Zellen wurden dafür mittels Fugene-Transfektionsreagenz mit Plasmiden transfiziert, welche für cGKI β , IRAG-WT oder IRAG Δ Int kodierten. Nach einer Expressionszeit von drei Tagen wurden die Zellen über 60 Minuten bei 37 °C mit 250 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert und dann mit Paraformaldehyd fixiert. Nach der Behandlung mit den jeweiligen primären und sekundären Antikörpern wurden die Objektträger am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die cGKI β (grün) nach cGMP-Stimulation im Zellkern lokalisiert war, wenn nicht gleichzeitig IRAG in den Zellen exprimiert worden war (s. Abb. 33). Wurde die für das IRAG-WT-Protein kodierende DNA co-transfiziert, war die cGKI β nicht im Zellkern zu sehen, sondern ebenso wie IRAG perinukleär lokalisiert. Die Co-Lokalisation der beiden Proteine wurde durch die gelbe Farbe im überlagerten („merge“) Bild deutlich. Dagegen wurde bei Co-Expression von IRAG Δ Int und cGKI β nach cGMP-Stimulation wiederum eine Translokation der Kinase in den Zellkern beobachtet. Das heißt, dass IRAG tatsächlich die Lokalisation der Kinase in der Zelle beeinflussen kann und dass die Interaktionsdomäne (AS 152-184) mit der cGKI β dafür essentiell ist. Ein anderes Bild ergab sich in den primären glatten Gefäßmuskelzellen, da die cGKI β auch in den IRAG-KO-Zellen nach cGMP-Stimulation zytosolisch verteilt war und keine Translokation zeigte (Desch *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass in den primären, nichttransfizierten Zellen zusätzliche Proteine vorhanden sein müssen, die die Kinase im Zytosol verankern (Desch *et al.*, 2010).

Für die Interaktion zwischen cGKI β und IRAG sind aber dennoch die Aminosäuren 152-184 im IRAG-Protein entscheidend, wie sowohl durch die cGMP-Agarosefällungen als auch durch die Bilder der transfizierten COS-7-Zellen gezeigt werden konnte.

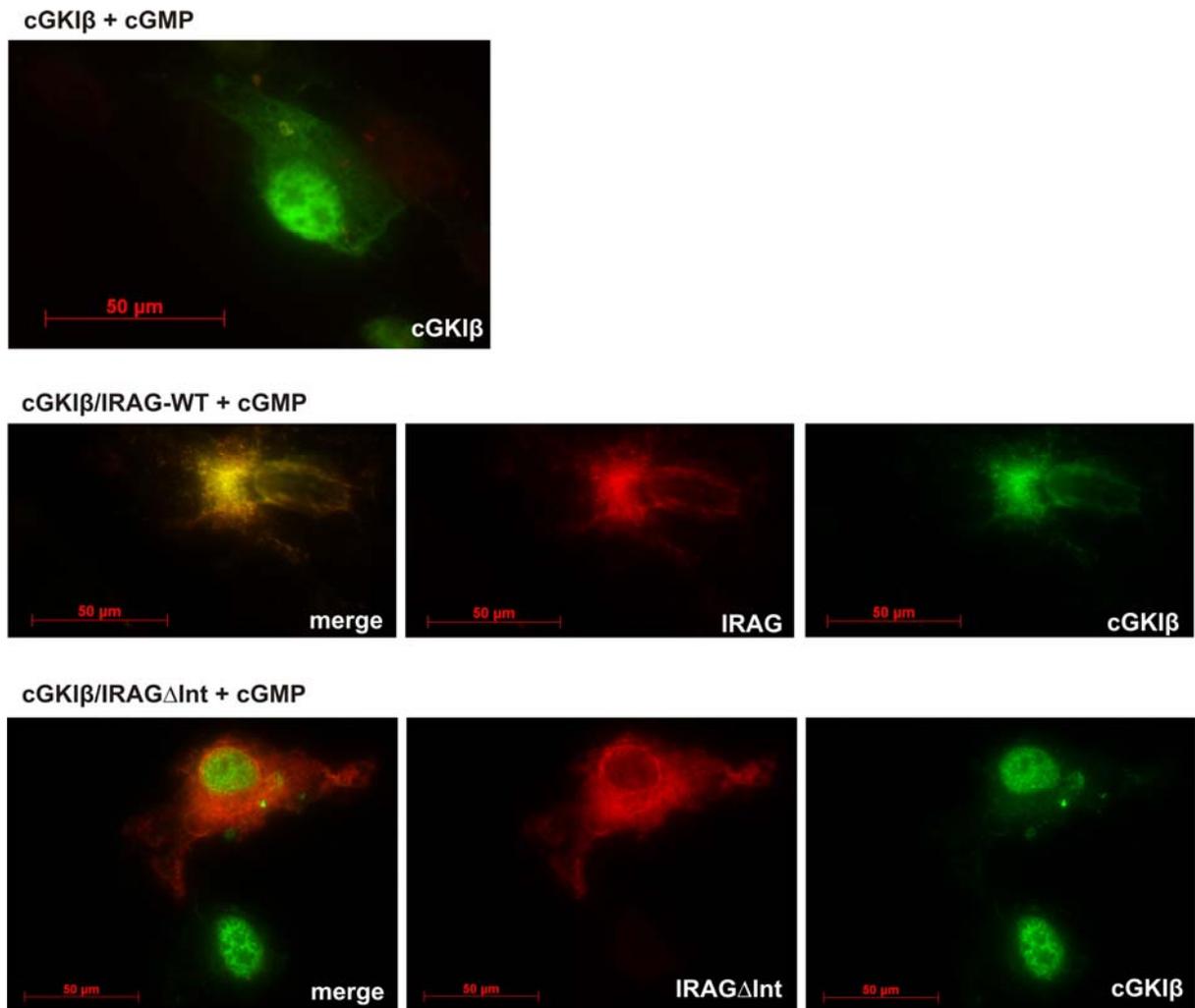


Abb. 33: Lokalisation von cGKI β und IRAG nach heterologer Expression in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit rekombinanten Plasmiden transfiziert, welche DNA enthielten, die für cGKI β , IRAG-WT und IRAG Δ Int kodierte. Die Lokalisation der Proteine wurde nach Stimulation mit 8-pCPT-cGMP (250 μ M, 37 °C, 60 min) immunzytochemisch detektiert. Es wurde jeweils eine repräsentative Zelle für mindestens 3 Zellen, die das gleiche Ergebnis zeigten, abgebildet.

C.3 Weitere cGKI-Komplexe in Thrombozyten und in Glattmuskelgewebe von WT- und IRAG-KO-Mäusen

C.3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen InsP₃R-II bzw.

InsP₃R-III und IRAG in Thrombozyten und Colongewebe

Außer dem InsP₃R-I interagierten auch der InsP₃R-II und der InsP₃R-III nach Co-Expression in COS-7-Zellen mit dem IRAG-Protein (Masuda *et al.*, 2010). Diese Interaktion wurde aufgehoben, wenn statt der cDNA für das IRAG-WT-Protein die cDNA für das IRAG Δ 12-Protein transfiziert wurde. Bei diesem wurde - entsprechend der IRAG Δ 12-Mutante - die Interaktionsstelle mit dem InsP₃R-I deletiert. Nun sollte untersucht werden, ob diese Interaktionen auch im Gewebe und/oder in isolierten Zellen zu beobachten sind. Für die InsP₃R-II-Versuche wurden Thrombozyten von WT- und IRAG-KO-Mäusen verwendet, da in diesen auch der trimere Makrokomples nachgewiesen worden war. Die IRAG-InsP₃R-III-Interaktion wurde ebenfalls in Thrombozyten und zusätzlich in Colongewebe von WT- und IRAG-KO-Mäusen untersucht.

C.3.1.1 Interaktion zwischen InsP₃R-II und IRAG

Zur Untersuchung der InsP₃R-II-IRAG-Interaktion wurden als erstes Agarosefällungen mit Thrombozytenlysate durchgeführt (s. Abb. 34 A). Der InsP₃R-II konnte weder im Wildtyp noch im IRAG-KO an cGMP-Agarose gebunden werden. Das heißt, dass dieser InsP₃R-Subtyp zum einen nicht in einem Komplex mit der cG-Kinase vorliegt und zum anderen nicht mit IRAG interagiert, welches an die cGKI β bindet und deshalb mit cGMP-Agarose gefällt werden konnte. Es ist bekannt, dass die Proteinkinase A den InsP₃R-II an Ser937 phosphorylieren kann (Betzenhauser *et al.*, 2009), weshalb mit WT-Thrombozyten zusätzlich eine Fällung mit 8-AEA-cAMP-Agarose durchgeführt wurde, um eine Interaktion zwischen InsP₃R-II und der PKA detektieren zu können. Auch mit cAMP-Agarose konnten jedoch nur die Proteine des trimeren Komplexes gebunden werden. cGKI β bindet neben cGMP mit geringerer Affinität auch cAMP, weshalb diese Kinase und ihre interagierenden Proteine an cAMP-Agarose gebunden werden konnten. Dass der InsP₃R-II nicht mit IRAG interagiert, wurde dadurch bestätigt, dass er auch in der Co-Immunpräzipitation mit dem anti-IRAG-Antikörper nicht detektiert werden konnte (s. Abb. 34 B). Der InsP₃R-I dagegen konnte sowohl in der cGMP-Agarosefällung, als auch in der Protein A-Sepharosefällung mit anti-IRAG-AK nachgewiesen werden.

Es ist möglich, dass es an den getesteten Bedingungen liegt, dass der InsP₃R-II in den Thrombozyten keine Interaktion mit IRAG zeigte, da er auch mit anti-InsP₃R-II-AK nicht

gefällt werden konnte (siehe C.1.4.2). Deswegen wurden verschiedene Bindungspuffer mit verschiedenen Detergenzien und/oder Salzkonzentrationen getestet und zusätzlich Fällungen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Jeweils konnte der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ nicht angereichert werden und auch eine Interaktion mit IRAG konnte nicht detektiert werden. Zusammenfassend konnte in Thrombozyten die von Masuda *et al.* (Masuda *et al.*, 2010) beschriebene Interaktion zwischen IRAG und dem $\text{InsP}_3\text{R-II}$ nicht bestätigt werden.

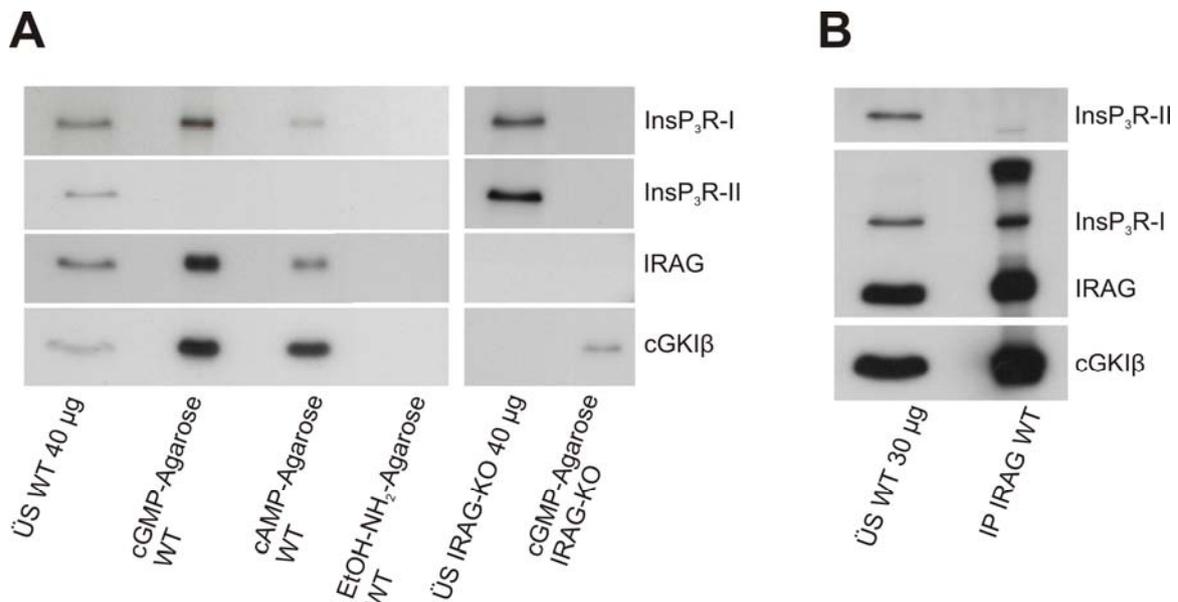


Abb. 34: $\text{InsP}_3\text{R-I/II}$ -Fällung mittels cGMP/cAMP-Agarose und Co-Immunpräzipitation

Für die Proteinfällungen wurden jeweils 250 µg Thrombozytenlysate verwendet. Auf die Elution mit Laemmli-Puffer folgten die SDS-PAGE und der Western Blot mit Detektion von $\text{InsP}_3\text{R-I/II}$, IRAG und cGKIβ.

A) Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Thrombozytenlysate, zur Kontrolle der unspezifischen Bindung eine Ethanolaminagarose-Fällung. B) Protein A-Sepharose-Fällung mit WT-Thrombozyten mit anti-IRAG-AK. Die Bande, die in der IP-Probe mit dem anti- $\text{InsP}_3\text{R-II}$ -AK detektiert wurde, ist eine unspezifische Bande, da der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ im Überstand höher liegt.

C.3.1.2 Untersuchung der Interaktion zwischen IRAG und $\text{InsP}_3\text{R-III}$ in Thrombozyten und Colongewebe

Neben dem $\text{InsP}_3\text{R-I}$ und dem $\text{InsP}_3\text{R-II}$ existiert eine dritte Isoform, der $\text{InsP}_3\text{R-III}$. Dieser wird in verschiedenen Geweben und Zelllinien exprimiert, hat aber eine besonders große Bedeutung in exokrinem Gewebe wie der Bauchspeicheldrüse, was durch Untersuchungen mit $\text{InsP}_3\text{R-II/III}$ -Doppel-KO-Mäusen gezeigt werden konnte (Futatsugi *et al.*, 2005). Diese Mausmutante zeichnete sich durch unzureichende Sekretion von Speichel und Verdauungsenzymen aus, was durch eine verringerte Ca^{2+} -Freisetzung durch $\text{InsP}_3\text{R-II}$ und -III erklärt wurde. Was die Affinität für InsP_3 betrifft, weist – wie

bereits erwähnt - der InsP₃R-II die höchste und der InsP₃R-III die geringste Affinität auf (Taylor & Tovey, 2011).

Masuda et al. konnten in COS-7-Zellen eine Interaktion zwischen IRAG und allen drei InsP₃R-Isoformen nachweisen (Masuda *et al.*, 2010). Außerdem wurde bei allen drei Subtypen eine Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung nach cGKI-vermittelter Phosphorylierung des Rezeptors beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die beschriebene Interaktion IRAG-InsP₃R-III auch in Zellen oder in murinem Gewebe auftritt. Die dafür notwendigen Versuche wurden einerseits mit murinen Thrombozyten, welche für die meisten Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet worden waren, und andererseits mit Colongewebe durchgeführt. Allerdings exprimieren Thrombozyten im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen nur sehr wenig InsP₃R-III, was auch in humanen Blutplättchen beobachtet worden war (El-Daher *et al.*, 2000). Dennoch konnte der InsP₃R-III ausreichend gut detektiert werden (s. Abb. 35). Murines Colon- bzw. Uterusgewebe wurde zusätzlich untersucht, da auch dort der cGMP/cGKI/IRAG-Signalweg eine wichtige funktionelle Rolle spielt und der InsP₃R-III endogen in größerer Menge vorkommt als in Thrombozyten.

Als Erstes wurden cGMP-Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Thrombozytenlysate durchgeführt. Im cGMP-Agarose-Komplex der WT-Thrombozyten konnte im Gegensatz zum IRAG-KO-Komplex eine geringe Menge InsP₃R-III nachgewiesen werden (s. Abb. 36 A). Dies spricht dafür, dass der InsP₃R-III, wie der InsP₃R-I, nur über IRAG an die cGMP-Agarose bzw. an cGKI β bindet und nicht direkt mit der cG-Kinase interagieren kann. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Masuda et al. überein, die keine Interaktion zwischen InsP₃R-III und IRAG beobachten konnten, wenn anstelle des WT-IRAG das IRAG Δ 12-Protein exprimiert worden war, bei welchem die Interaktionsstelle mit dem InsP₃-Rezeptor deletiert wurde.

Zusätzlich wurden Immunpräzipitationen mit WT-Thrombozyten mit den Antikörpern gegen IRAG, cGKI β und cGKI α durchgeführt (s. Abb. 36 B). In der IRAG- und in der cGKI β -Immunpräzipitation konnte InsP₃R-III detektiert werden, jedoch nicht in der cGKI α -Probe. Das heißt, dass keine Wechselwirkung zwischen cGKI α und InsP₃R-III besteht.

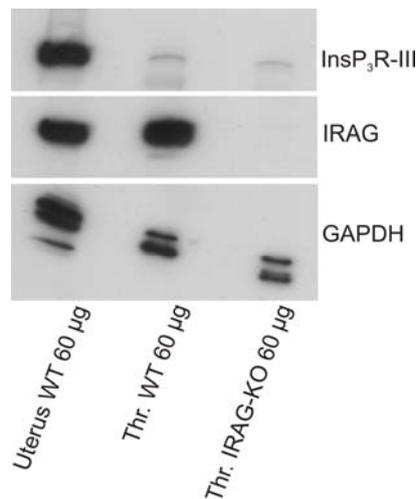


Abb. 35: Expression des InsP₃R-III in Thrombozyten und in WT-Glattmuskelgewebe

Auftragung von je 60 µg Proteinlysate von WT- und IRAG-KO-Thrombozyten und von WT-Uterusgewebe. Western Blot: Inkubation mit anti-InsP₃R-III-AK, anti-IRAG-AK und anti-GAPDH-AK als Ladungskontrolle. Thr. = Thrombozyten.

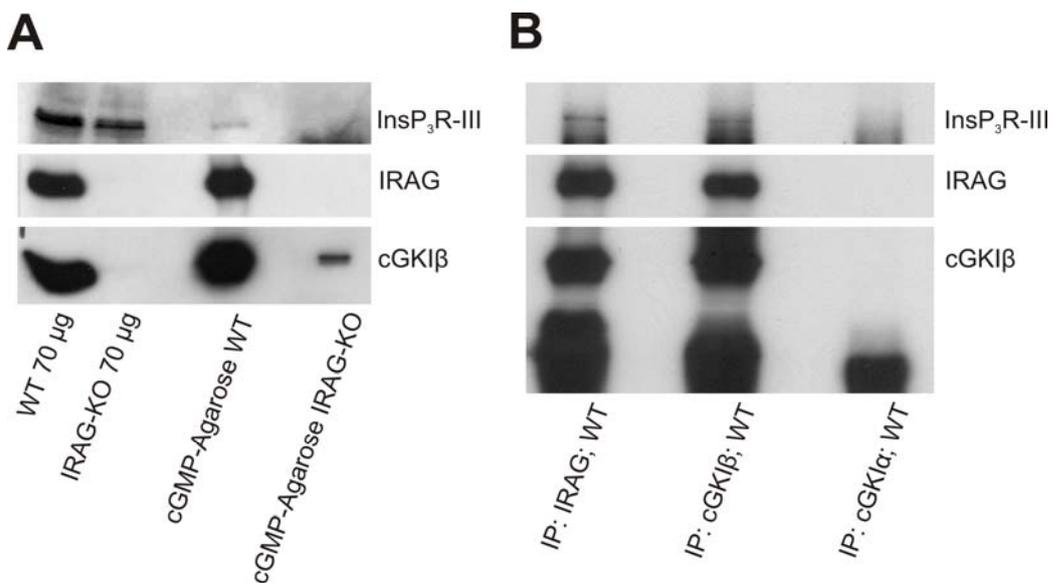


Abb. 36: InsP₃R-III: cGMP-Agarosefällungen und Immunpräzipitationen mit Thrombozyten

A) cGMP-Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Thrombozytenlysate (je 250 µg). Im Western Blot Detektion von InsP₃R-III, IRAG und cGKIβ. B) Protein A-Sepharosefällungen mit anti-cGKIα-, anti-cGKIβ- und anti-IRAG-AK mit WT-Thrombozyten. Detektion von InsP₃R-III, IRAG und cGKIβ im Western Blot.

Die Interaktion InsP₃R-III/IRAG wurde - wie bereits erwähnt - auch in Colongewebe untersucht. Auch hier wurden zuerst cGMP-Agarosefällungen durchgeführt: Im Gegensatz zum Thrombozytenlysate konnte nicht nur im Wildtyp, sondern auch in der IRAG-KO-Probe InsP₃R-III detektiert werden, allerdings viel weniger Protein als im WT (s. Abb. 37 A). Das deutet darauf hin, dass nicht nur zwischen InsP₃R-III und IRAG eine Interaktion besteht, sondern auch zwischen InsP₃R-III und der cG-Kinase, da das dazwischenliegende

„Adapterprotein“ IRAG im KO fehlt. Anhand der cGMP-Agarosefällung konnte jedoch nicht ermittelt werden, mit welcher Isoform der cGKI der Rezeptor interagiert, da sowohl cGKI α als auch cGKI β gebunden werden. Um dies zu klären, wurden Immunpräzipitationen mit Colon-WT-Lysat mit anti-IRAG-, anti-cGKI α - und anti-cGKI β -AK durchgeführt (s. Abb. 37 B). Es zeigte sich, dass der InsP₃R-III außer mit dem anti-IRAG- und dem anti-cGKI β -AK auch mit dem anti-cGKI α -AK immunpräzipitiert werden kann. Da in der cGKI α -IP keine cGKI β -Bande zu sehen war, muss eine direkte Interaktion zwischen der cGKI α und dem Rezeptor bestehen. Allerdings war die Menge an InsP₃R-III, die in der cGKI α -IP detektiert wurde, sehr viel geringer als die Proteinmenge, die in den anderen beiden Proben nachgewiesen wurde. Aus den Ergebnissen der Immunpräzipitationen kann gefolgert werden, dass in der cGMP-Agarosefällung des IRAG-KO der InsP₃R-III ebenfalls über cGKI α an die cGMP-Agarose gebunden wurde.

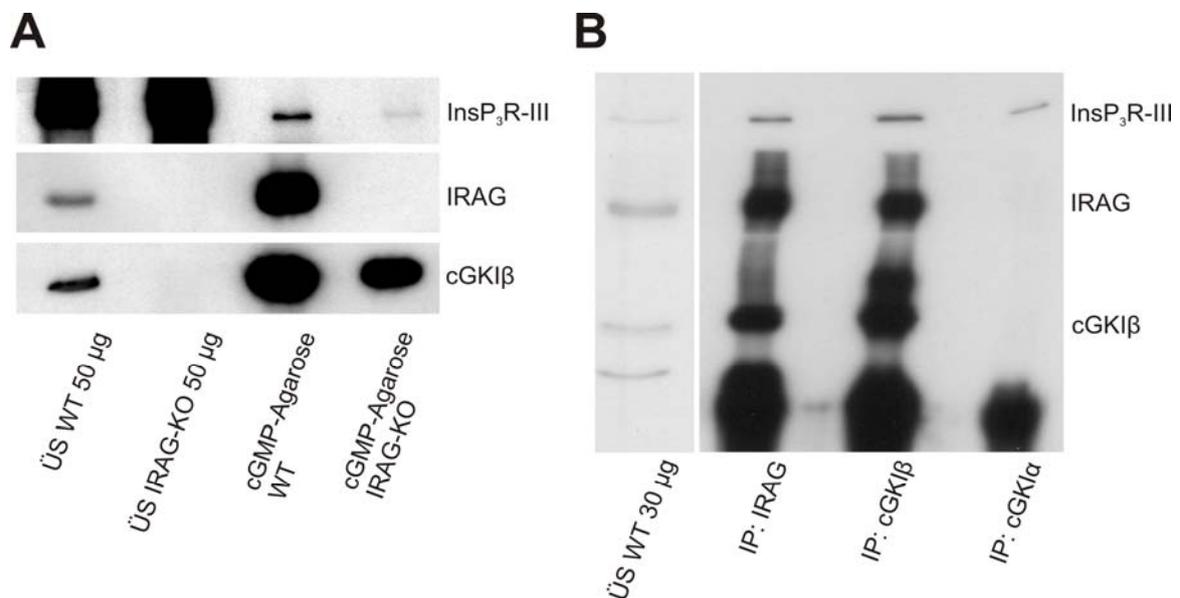


Abb. 37: InsP₃R-III: cGMP-Agarosefällungen und Immunpräzipitationen mit Colonlysate

A) cGMP-Agarosefällungen mit je 750 μ g Gesamtprotein, Auftrennen der Proteinkomplexe über ein 10%-Acrylamidgel und im Western Blot Detektion von cGKI β , IRAG und InsP₃R-III. B) Co-Immunpräzipitationen mit je 750 μ g WT-Lysat mit anti-IRAG-, anti-cGKI β - und anti-cGKI α -AK. Im Western Blot wurden InsP₃R-III, IRAG und cGKI β detektiert.

C.3.2 Untersuchung der Interaktion zwischen der cGKI und Phospholamban in murinen Thrombozyten und Colongewebe

Das aus 52 Aminosäuren bestehende Peptid Phospholamban (PLB) wird in der Herzmuskulatur, im Skelettmuskel aber auch in glatter Muskulatur exprimiert. Die Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies zeigen eine hohe Homologie (Tada & Toyofuku, 1998). Ein Phospholambanmonomer besteht aus drei funktionellen Domänen: Domäne Ia (AS 1-20, eine α -Helix) und Domäne Ib (AS 21-30) sind zytoplasmatisch, während Domäne II den Transmembranbereich darstellt (Tada & Toyofuku, 1998). Dieser Transmembranbereich enthält Leuzin- und Isoleuzin-Aminosäurereste, die vermutlich eine Pentamerbildung fördern (Glaves *et al.*, 2011). Denn Phospholamban kann als Mono- oder Pentamer vorliegen, wobei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen besteht und in der SDS-PAGE die pentamere Form dominiert. Mutationen, die eine gestörte Pentamerbildung verursachten, führten zu einer verstärkten SERCA-Hemmung. Daraus wurde geschlossen, dass die inhibitorische Wirkung von Phospholamban über den Monomer-Anteil bestimmt wird (Glaves *et al.*, 2011). Das Pentamer dagegen ist eine Art inaktive Speicherform. Phospholamban kann – wie bereits in der Einleitung erwähnt - durch die Kinasen cGK und PKA an Ser16 phosphoryliert werden, wodurch die hemmende Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase SERCA aufgehoben wird. Diese kann in der Folge verstärkt Ca^{2+} aus dem Zytosol ins ER transportieren.

Koller *et al.* (2003) konnten zusätzlich in bovinen microsomalen Membranen der Trachea eine Interaktion zwischen der cGKI und Phospholamban feststellen: Bovines Lysat wurde zuerst mit cGMP-Agarose inkubiert, dann wurden die gebundenen Proteine in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ mit 8-pCPT-cGMP stimuliert. Anschließend wurden die phosphorylierten Proteine identifiziert (Koller *et al.*, 2003). Neben den Proteinen des trimeren Signalkomplexes konnten auch Phospholamban, RhoA und α -Aktin nachgewiesen werden. Daraufhin wurden in COS-7-Zellen der $\text{InsP}_3\text{R-I}$, IRAG, cGKI β und Phospholamban co-exprimiert. In der Co-Immunpräzipitation mit anti-PLB-AK konnten alle vier Proteine nachgewiesen werden, was bedeutet, dass PLB ein Bestandteil des Makrokomplexes ist. Bei Abwesenheit des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ (dieser wurde nicht gemeinsam mit PLB exprimiert) konnte die cGKI β nicht im PLB-Immunpräzipitat detektiert werden, während die cGKI α gar keine Interaktion mit PLB zeigte. Die Ca^{2+} -ATPase SERCA II dagegen konnte zwar in der Immunpräzipitation mit anti-Phospholamban-Antikörper, aber nicht im cGKI-Komplex nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, welche Rolle IRAG bei der Komplexbildung spielt und welcher Komplex in murinen Thrombozyten und in der glatten Muskulatur des Colons vorkommt. Aus dem Wissen um den Aufbau der cGK-PLB-

Komplexe können neue Erkenntnisse über die Calciumregulation in Blutplättchen und Colon gewonnen werden.

Als Erstes wurden cGMP-Agarosefällungen mit Thrombozytenlysat von WT- und IRAG-KO-Mäusen durchgeführt. In beiden Fällen konnte neben den cG-Kinasen das Phospholamban-Pentamer im Western Blot detektiert werden (s. Abb. 38 rechts). Anhand einer cGMP-Agarosefällung kann allerdings keine Aussage getroffen werden, mit welcher cGKI-Isoform ein Protein interagiert, weswegen anschließend PLB mit anti-PLB-AK immunpräzipitiert wurde. Es zeigte sich, dass in murinen Thrombozyten nicht nur zwischen der cGKI β -, sondern auch zwischen der cGKI α -Isoform und Phospholamban eine Wechselwirkung besteht. Im Experiment mit WT-Thrombozytenlysat konnten beide Isoformen der cGKI mit anti-PLB-AK präzipitiert werden (s. Abb. 38 Mitte). In der Fällung mit IRAG-KO-Thrombozyten wurde dagegen eine cGKI α -, aber keine cGKI β -Bande detektiert. Verantwortlich dafür könnten die geringe cGKI β -Menge im IRAG-KO und zusätzlich die relativ schwache Interaktion zwischen der cG-Kinase und PLB sein. Dass keine starke Interaktion besteht, konnte man daran sehen, dass es in der Fällung nicht zu einer Anreicherung, sondern zu einer Abreicherung der Kinase im Vergleich zum Ausgangslysat kam. Dies stimmt überein mit den Beobachtungen in den bovinen microsomalen Membranen, als festgestellt wurde, dass mit anti-cGKI-AK nur ca. 5-10 % der Menge PLB präzipitiert werden konnten, die mit dem anti-PLB-AK gefällt wurde (Koller *et al.*, 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde mehr PLB in der PLB-Immunpräzipitation gebunden, als in den cGKI-Fällungen (s. Abb. 39). Mit WT-Thrombozytenlysat wurden zusätzlich Fällungen mit anti-cGKI β -, anti-cGKI α - und anti-IRAG-AK durchgeführt. Bei allen drei Experimenten konnte das PLB-Pentamer im Western Blot nachgewiesen werden, was ebenfalls dafür spricht, dass Phospholamban einerseits im Makrokomples enthalten ist und andererseits mit der cGKI α interagiert. Es war kein Unterschied zwischen WT- und IRAG-KO-Thrombozyten zu beobachten, woraus geschlossen werden kann, dass Phospholamban nicht direkt an IRAG, sondern an cGKI α und cGKI β bindet.

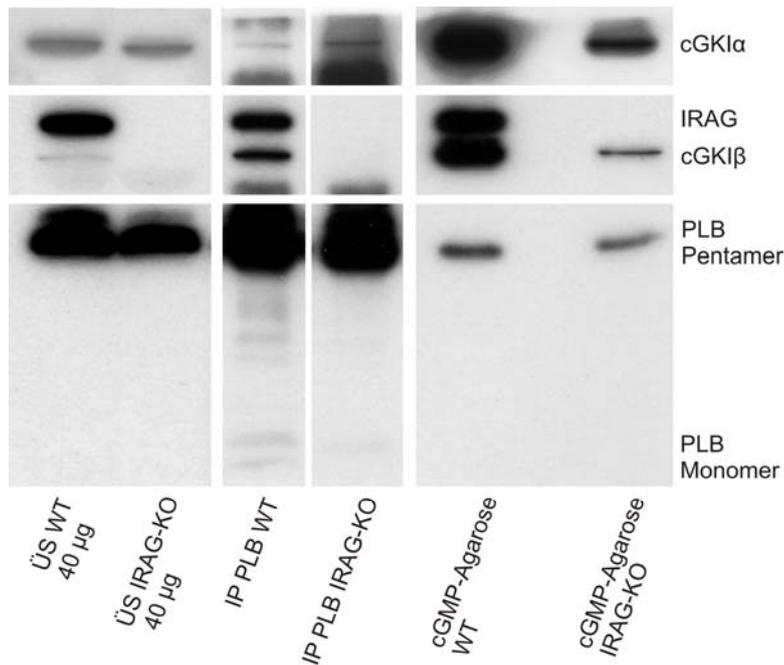


Abb. 38: Interaktion Phospholamban-cGKI in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten

Es wurden Immunpräzipitationen mit anti-PLB-AK und cGMP-Agarose-Fällungen mit je 350 µg Gesamtprotein durchgeführt. Die Proben wurden zur Elektrophorese auf ein Tricingel aufgetragen. Im Western Blot wurde mit den Antikörpern gegen Phospholamban, cGKIα, cGKIβ und IRAG inkubiert.

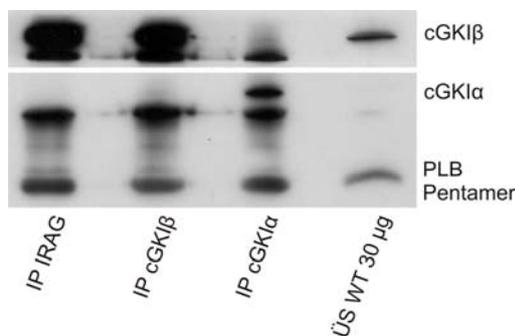


Abb. 39: Interaktion zwischen PLB und den cGKI-Isoformen in WT-Thrombozyten

Immunpräzipitationen mit AK gegen IRAG, cGKIα und cGKIβ mit je 300 µg Lysat von WT-Mausthrombozyten. Nach der Elution mit 1 x Laemli-Puffer wurden eine Tricin-SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Es wurden PLB, cGKIα und cGKIβ detektiert.

Im Colongewebe war das gleiche Ergebnis wie in den murinen Thrombozyten zu sehen: An cGMP-Agarose konnten neben den Proteinen des trimeren Komplexes auch die cGKIα und das Phospholamban-Pentamer gebunden werden (s. Abb. 40 B). Dabei war kein Unterschied zwischen WT- und IRAG-KO-Colongewebe zu beobachten. In der Protein A-Sepharosefällung mit anti-PLB-AK konnten neben Phospholamban beide cGKI-Isoformen und im WT IRAG nachgewiesen werden (s. Abb. 40 A). Im Präzipitat der IRAG-KO-Probe wurde auch die cGKIβ detektiert, da im IRAG-KO-Colon mehr cGKIβ exprimiert wird, als in den KO-Thrombozyten. Außerdem wurde zusätzlich zum Pentamer auch das

Phospholamban-Monomer gebunden. Sowohl im Wildtyp als auch im IRAG-KO konnte in den Immunpräzipitationen mit den beiden anti-cGKI-Antikörpern das Phospholamban-Pentamer detektiert werden (s. Abb. 41).

Phospholamban ist also in Mausthrombozyten und in murinem Colongewebe ein Bestandteil des Makrosignalkomplexes und kann zusätzlich mit der cGKI α interagieren, was durch Co-Immunpräzipitationen gezeigt werden konnte.

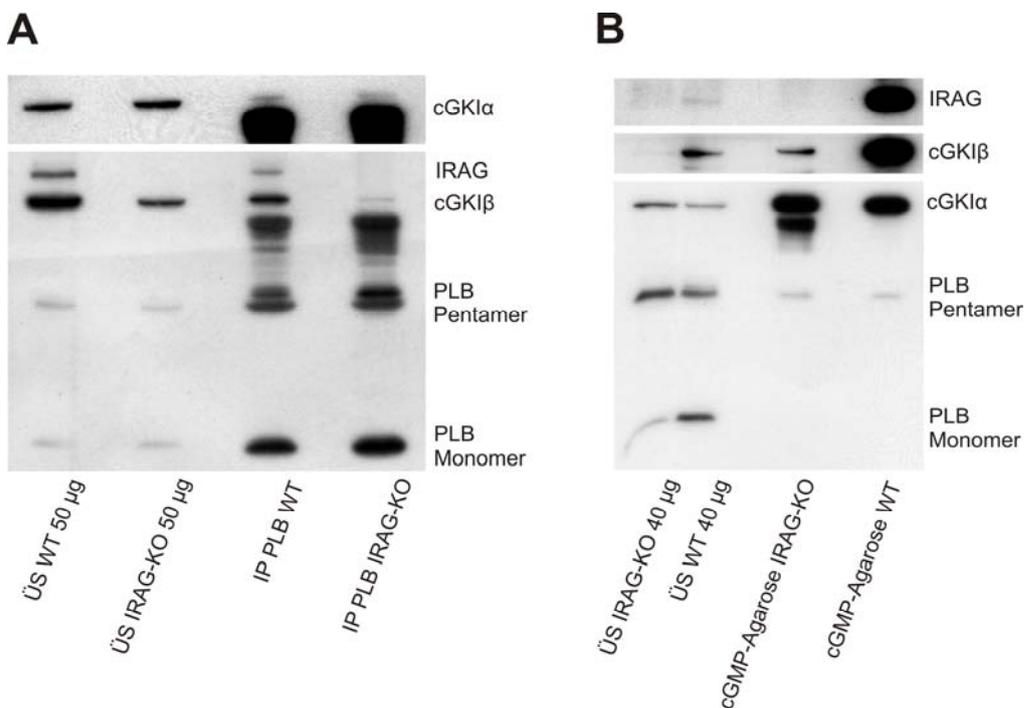


Abb. 40: Interaktion zwischen PLB und cGKI in WT- und IRAG-KO-Colongewebe

A) Phospholamban-Immunpräzipitationen mit je 750 μ g WT- und IRAG-KO-Colonlysate. Detektion von IRAG, PLB und den beiden cGKI-Isoformen im Western Blot des Tricingels. B) cGMP-Agarose: gleiche Proteinmenge und im Western Blot Verwendung der gleichen AK wie in der PLB-IP.

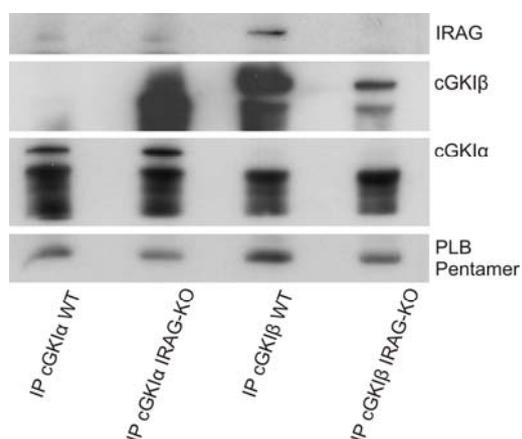


Abb. 41: PLB: Interaktion mit cGKI α / β in murinem WT- und IRAG-KO-Colongewebe

Protein A-Sepharose-Fällungen mit anti-cGKI α - bzw. anti-cGKI β -AK mit je 750 μ g WT- bzw. IRAG-KO-Colonlysate. Detektion von IRAG, cGKI α / β und PLB im Western Blot.

C.3.3 Ist die PDE5 ein Bestandteil des trimeren Makrokompleses in Thrombozyten und Colongewebe?

Die PDE5 ist in Thrombozyten die vorherrschende cGMP-spezifische Phosphodiesterase (Jensen *et al.*, 2010). Sie wird auch in der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts, des Uterus und der Blutgefäße exprimiert (Lin, 2004; Kass *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2010). Die PDE5 wird durch Bindung von cGMP an die sogenannten GAF-Domänen aktiviert. Das heißt, die cGMP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung, die die katabolische Aktivität des Enzyms für cGMP erhöht (Auto-feedback-Mechanismus) (Kass *et al.*, 2007). Zusätzlich wird durch cGMP-Bindung an die GAF-Domänen die cGK-vermittelte Phosphorylierung der PDE5 gesteigert. In vitro können sowohl die cG-Kinase als auch die PKA die PDE5 in Anwesenheit von cGMP phosphorylieren und aktivieren, während *in vivo* (in humanen Uterusmuskeln) nur eine cGMP-vermittelte Stimulation der cGK zur Phosphorylierung und Aktivierung der PDE5 führt (Rybalkin *et al.*, 2002).

Darüber hinaus konnte die PDE5 in humanen Thrombozyten in einem Signalkomplex mit der cGKI β , IRAG und dem InsP₃R-I nachgewiesen werden (Wilson *et al.*, 2008). Die Anwesenheit von IRAG in diesem Signalkomplex konnte nicht eindeutig bewiesen werden, da kein Primär-AK gegen IRAG verfügbar gewesen war. Allerdings wurde nach cGMP-Stimulation eines cGKI-Immünpräzipitats ein Protein im Autoradiogramm detektiert, das dem IRAG-Protein in der Größe entsprach. In der Veröffentlichung wurde zusätzlich beschrieben, dass nur die cGK- bzw. InsP₃R-I-assoziierte PDE5 durch 8-Br-cGMP-Stimulation aktiviert und phosphoryliert werden konnte, wodurch die Bedeutung dieser Interaktion verdeutlicht wurde.

Da IRAG in der Arbeit von Wilson *et al.* (2008) nicht eindeutig als Bestandteil des PDE5-enthaltenden Makrokompleses nachgewiesen werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Vorkommen des beschriebenen Komplexes in murinen Thrombozyten untersucht. Durch die zusätzliche Untersuchung der Interaktion im IRAG-KO kann zudem festgestellt werden, ob die Anwesenheit von IRAG für die Komplexbildung essentiell ist, beziehungsweise an welches der Komplexproteine die PDE5 bindet.

Als Erstes wurden Co-Immünpräzipitationen mit murinem Thrombozytenlysat mit anti-InsP₃R-I-AK durchgeführt. Die PDE5 konnte dabei weder im Wildtyp noch im IRAG-KO im Western Blot in den InsP₃R-I-Fällungen detektiert werden (s. Abb. 42 A). Gleichzeitig konnte aber in der WT-Probe der trimere Komplex aus InsP₃R-I, IRAG und cGKI β nachgewiesen werden. Anschließend wurde cGMP-Agarose zur Proteinbindung eingesetzt (s. Abb. 42 B). Bei kurzer Belichtung des Chemolumineszenzfilms (ca. 1 min) konnte sowohl in der WT-, als auch in der IRAG-KO-Probe keine PDE5 detektiert werden. Bei einer sehr langen Belichtungszeit (ca. 20 min) wurde jedoch in beiden Fällungen eine geringe Menge an PDE5 sichtbar. Folglich war nur sehr wenig Protein in der cGMP-

Agarosefällung enthalten. Da die PDE5 als cGMP-abbauendes Enzym direkt an cGMP-Agarose binden kann, ist ein Nachweis des Proteins in der cGMP-Agarosefällung kein direkter Hinweis auf eine Interaktion mit der cG-Kinase. Daher sind die Co-Immunpräzipitationen zur Beurteilung der Interaktion zwischen cGKI und PDE5 besser geeignet.

Danach wurde die cGMP-stimulierte Phosphorylierung von PDE5 in WT-Thrombozyten untersucht. Die Blutplättchen wurden, wie bei der Untersuchung der InsP_3R -I-Phosphorylierung, 30 min bei 37 °C mit 1 mM 8-Br-cGMP stimuliert. Dann wurde die PDE5-Phosphorylierung im Western Blot mit einem anti-P-PDE5A-AK detektiert, der die cGKI-vermittelte Phosphorylierung an Ser92 erkannte. Es zeigte sich, dass die PDE5 in WT-Thrombozyten *in vivo* durch die cGKI phosphoryliert werden kann, wobei als Kontrolle der cGK-Aktivität die VASP-Phosphorylierung an Ser239 diente (s. Abb. 42 C).

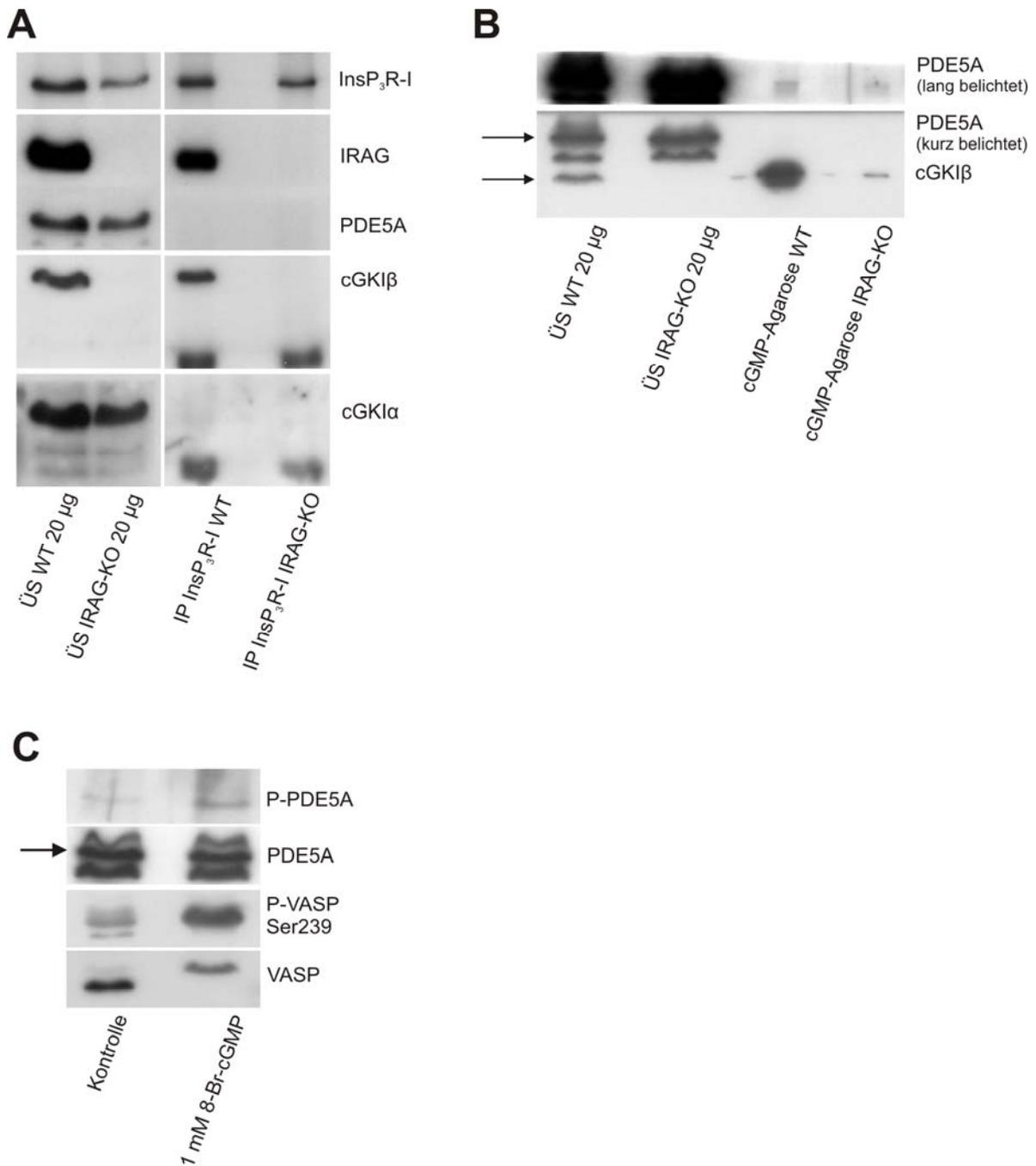


Abb. 42: PDE5: InsP₃R-I-Immünpräzipitation und cGMP-Agarosefällung mit WT- und IRAG-KO-Thrombozytenlysat und cGMP-Stimulation von WT-Thrombozyten

A) Protein A-Sepharose-Fällungen (2 % Lubrol und 80 mM NaCl im Bindungspuffer) mit anti-InsP₃R-I-AK mit je 350 µg Gesamtprotein. Detektion von InsP₃R-I, IRAG, PDE5A und cGKIα/β im Western Blot. B) cGMP-Agarose-Fällungen mit je 250 µg Gesamtprotein von WT- und IRAG-KO-Thrombozyten (Bindungspuffer s. A). Detektion von PDE5A und cGKIβ im Immunblot. C) *in-vivo*-Stimulation von WT-Thrombozyten mit 1 mM 8-Br-cGMP (30 min, 37 °C); Detektion der PDE5A-Phosphorylierung mit dem anti-P-PDE5A-AK (Ser92), zur Kontrolle der cGK-Aktivität Analyse der VASP-Phosphorylierung an Ser239. Anschließend wurde der Western Blot mit den jeweiligen Gesamt-AK inkubiert.

Da in den Co-Immunpräzipitationen mit Thrombozytenlysate keine Interaktion zwischen cGKI β und PDE5 oder InsP₃R-I und PDE5 nachgewiesen werden konnte, wurden zusätzlich Fällungen mit Colongewebe von Wildtyp- und IRAG-KO-Mäusen durchgeführt. Hierbei konnte, wie bei den Thrombozyten-Versuchen, in den InsP₃R-I-Immunpräzipitationen keine PDE5 detektiert werden (s. Abb. 43). Auch in den cGMP-Agarosefällungen konnte das PDE5-Protein nicht nachgewiesen werden, weder in der Wildtyp-, noch in der IRAG-KO-Probe.

Der in den humanen Thrombozyten beschriebene Komplex aus PDE5, IRAG, cGKI β und InsP₃R-I (Wilson *et al.*, 2008) konnte somit weder in den Mastthrombozyten, noch in murinem Colongewebe bestätigt werden. Das heißt, dass dort entweder keine Interaktion auftritt, oder dass diese unter den gewählten Versuchsbedingungen so schwach ist, dass sie im Western Blot nicht detektiert werden konnte. Allerdings konnten die drei Hauptkomponenten des Makrokompleses jeweils ohne Probleme nachgewiesen werden.

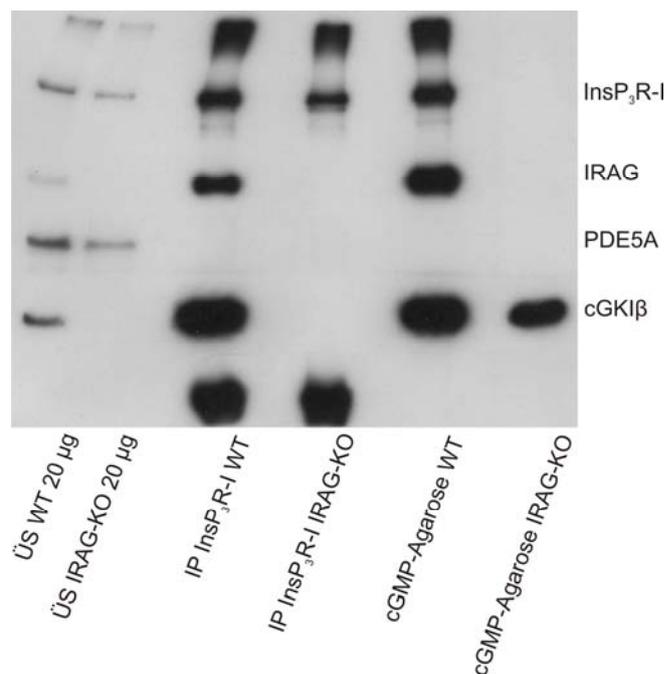


Abb. 43: PDE5: Bestandteil des Makrokompleses in murinem Colongewebe?

Co-Immunpräzipitationen mit anti-InsP₃R-I-AK und cGMP-Agarose-Fällungen mit Colongewebe (jeweils 750 µg Protein pro Fällung; Bindungspuffer s. Abb. 42) von WT- und IRAG-KO-Mäusen: Detektion von InsP₃R-I, IRAG, PDE5A und cGKI β im Western Blot.

C.3.4 Untersuchung der Interaktion zwischen MYPT-1 und cGKI α in der glatten Muskulatur von Uterus und Colon

Als letzte Interaktion wurde in dieser Arbeit in murinem Uterus- und Colongewebe die bereits sehr ausführlich beschriebene und untersuchte Wechselwirkung zwischen cGKI α und MYPT-1 analysiert. Bei MYPT-1 handelt es sich um eine der drei Untereinheiten der Myosinleichtkettenphosphatase. Diese besteht aus der 130 kDa großen regulatorischen „myosin targeting subunit“ (MYPT-1), der 37 kDa großen katalytischen Untereinheit (PP1c) und einer 20 kDa großen Untereinheit unbekannter Funktion (M20) (Given *et al.*, 2007).

Die Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit in murinem Colon- und Uterusgewebe untersucht, da MYPT-1 eine besonders wichtige Rolle bei der Relaxation glatter Muskulatur spielt. Uterusgewebe wurde zusätzlich zum Colon verwendet, um die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Geweben vergleichen zu können.

Als Erstes wurden Co-Immunpräzipitationen mit anti-cGKI α -AK durchgeführt. Dabei konnte eine starke Anreicherung der cGKI α in beiden Geweben, aber keine Fällung von MYPT-1 beobachtet werden (s. Abb. 44 A). Danach wurde ein anti-cGKIc-AK (anti-cGKI-common-AK) zur Präzipitation eingesetzt. Dieser bindet nicht N-terminal, wie die jeweiligen Antikörper gegen cGKI α und cGKI β , sondern die gesamte „common“-Domäne der Kinase, und ermöglicht deshalb die Detektion beider Kinase-Isoformen. Der anti-cGKIc-AK wurde getestet, da eine bestehende Interaktion beim vorherigen Versuch womöglich nicht detektiert werden konnte, weil sich der anti-cGKI α -Antikörper und MYPT-1 bei der Bindung an das cGKI α -Protein gegenseitig behindern. Dies wäre dann der Fall, wenn der Antikörper und MYPT-1 an derselben Stelle des N-terminalen Leuzin-Zippers an die Kinase binden. Da der anti-cGKIc-Antikörper auch die im Glattmuskellysat vorkommende cGKI β bindet, wäre es wiederum möglich, dass sich cGKI α und cGKI β bei der Bindung an den Antikörper behindern. Um dies zu vermeiden, wurde zuerst über Nacht eine Immunpräzipitation mit dem anti-cGKI β -AK durchgeführt, wobei cGKI β weitgehend gebunden wurde (s. Abb. 44 B rechts und Abb. 44 B links). Dann wurde der Überstand dieser Fällung, in dem immer noch cGKI α und MYPT-1 enthalten waren (s. Abb. 44 B rechts), für eine zweite Immunpräzipitation mit anti-cGKIc-AK verwendet. Weder in der ersten noch in der zweiten Fällung konnte MYPT-1 im Western Blot detektiert werden, cGKI α und cGKI β wurden dagegen jeweils angereichert. Das heißt, unter den beschriebenen Bedingungen konnte in murinem Colon- und Uterusgewebe keine Interaktion zwischen cGKI α und MYPT-1 beobachtet werden.

Anschließend wurden zwei Bindungspuffer getestet, die bereits in früheren Publikationen zur Präzipitation von MYPT-1 verwendet worden waren. Puffer 2 war zur Untersuchung der Interaktion zwischen MYPT-1 und ZIPK (zipper interacting kinase) eingesetzt worden

(MacDonald *et al.*, 2001) und Puffer 3 bei der Co-Immunpräzipitation von MYPT-1 und cGKI α aus VSMC-Lysat (Surks *et al.*, 1999). Vor der Immunpräzipitation wurde zuerst untersucht, ob die Colon- und Uterusproteine in ausreichendem Maß in den beiden Puffern solubilisiert werden. Die Uterusproteine wurden dabei in beiden Puffern und die Colonproteine in Puffer 2 gut solubilisiert (s. Abb. 45 A links). Danach wurden Co-Immunpräzipitationen mit beiden Gewebelysaten mit anti-cGKIc- und anti-cGKI α -AK durchgeführt. cGKI α wurde durch den spezifischen Antikörper besser gebunden als vom anti-cGKIc-AK, konnte aber in jeder Fällung in ausreichender Menge detektiert werden. MYPT-1 jedoch konnte in keiner Probe nachgewiesen werden (s. Abb. 45 A/B).

Zuletzt wurde versucht, die cGKI α -MYPT-1-Interaktion mittels cGMP-Agarose-Fällungen mit WT- und IRAG-KO-Uterusgewebe nachzuweisen. In beiden Fällen wurde zwar cGKI α , aber nicht MYPT-1 gebunden (s. Abb. 46). Hier wurde zur Präzipitation wieder der 2 %-Lubrolpuffer verwendet (150 mM NaCl; pH 8,0). Die Interaktion zwischen den beiden Proteinen konnte also in murinem Uterus- und Colongewebe nicht bestätigt werden.

Puffer 2:

Hepes pH 7,5	25 mM
EGTA	0,1 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	1 mM
NaCl	600 mM
Triton X-100	0,5 %
+ PI	

Puffer 3:

Tris-HCl pH 7,5	25 mM
MgCl ₂	5 mM
EDTA	2,5 mM
Triton X-100	1 %
PMSF	1 mM
Benzamidin	0,1 mM
Leupeptin	0,1 µg/ml

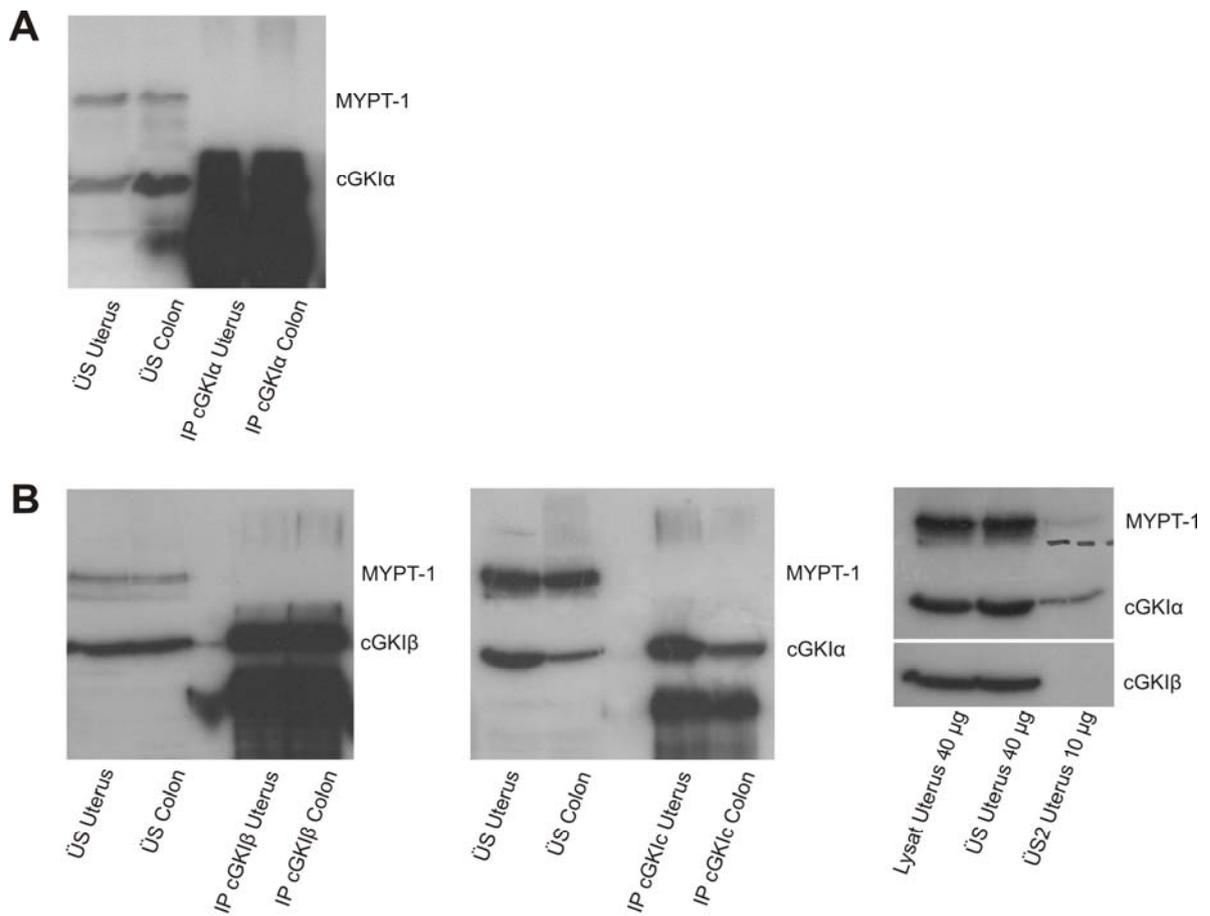


Abb. 44: Interaktion cGKI α -MYPT-1 in murinem WT-Uterus- und WT-Colongewebe

A) Co-Immunpräzipitationen mit je 200 μ g Uterus- und Colongewebe mit anti-cGKI α -AK in 2 %-Lubrolpuffer (150 mM NaCl, pH 8,0). Im Western Blot wird in der Fällung die cGKI α -Bande vom Signal der heavy chain des anti-cGKI α -AK überlagert; B) Mit je 300 μ g Uterus- bzw. Colongewebe wurde zuerst eine cGKI β -Immunpräzipitation durchgeführt (links), dann wurde der Überstand dieser Fällung mit dem anti-cGKI α -AK präzipitiert (Mitte). rechts: Darstellung der Uteruskontrollen: Lysat Uterus ist das Ausgangsmaterial, ÜS Uterus ist der Überstand nach dem Solubilisieren, ÜS2 Uterus ist der Überstand der cGKI β -Immunpräzipitation.

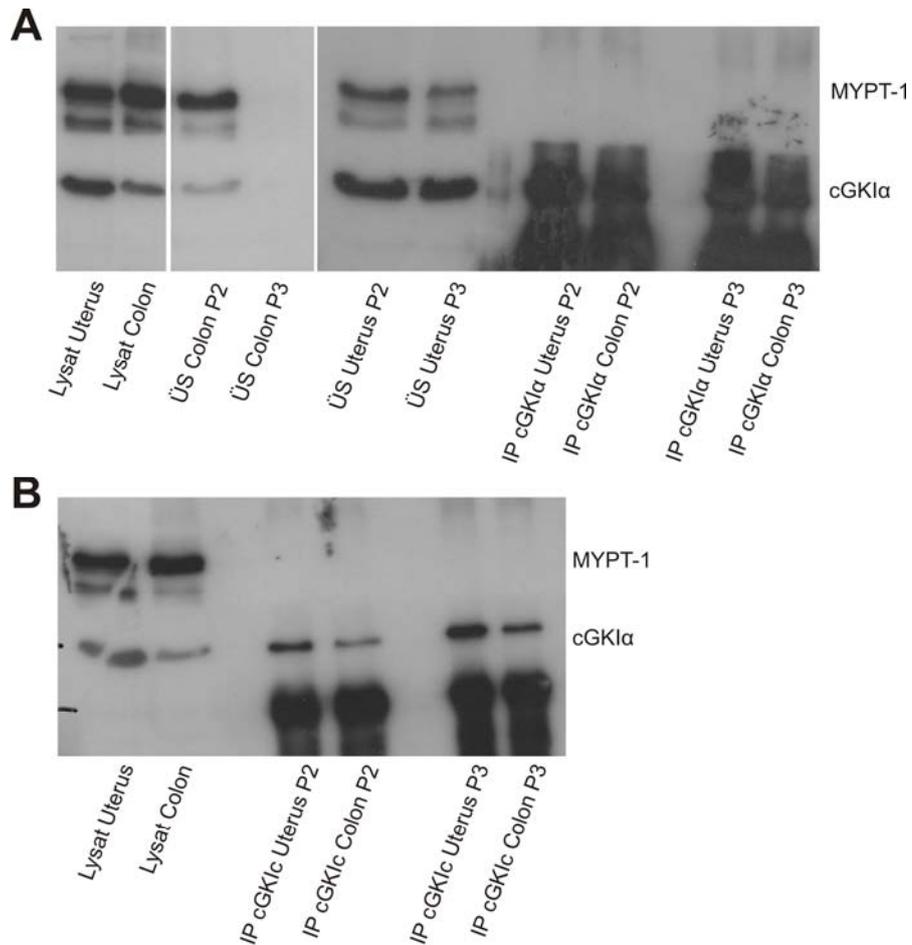


Abb. 45: Interaktion cGKI α -MYPT-1 in murinem WT-Uterus- und WT-Colongewebe: Analyse verschiedener Bindungspuffer

A) links: Darstellung der Solubilisierung der Uterus- und Colonproteine in Puffer 2 und Puffer 3; rechts: Co-Immunpräzipitation von je 200 μ g Solubilisat mit anti-cGKI α -AK, Detektion von MYPT-1 und cGKI α im Western Blot. B) Co-Immunpräzipitation von je 200 μ g Protein mit anti-cGKIc-AK, ebenfalls Detektion von MYPT-1 und cGKI α im Immunblot.

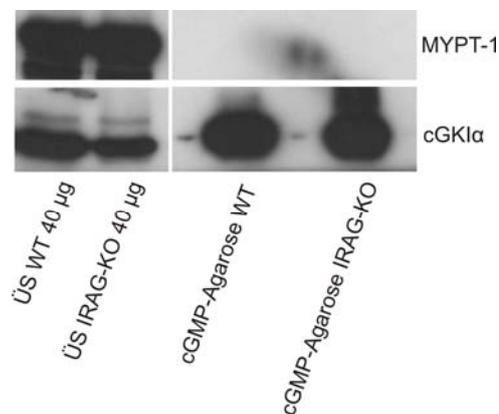


Abb. 46: MYPT-1: cGMP-Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Uteruslysat

cGMP-Agarosefällung mit je 500 μ g Gewebelysat. Detektion von cGKI α und MYPT-1 im Western Blot.

D. Diskussion

D.1 Die Bedeutung der cGMP-abhängigen InsP₃R-I-Phosphorylierung

Der erste große Abschnitt in dieser Arbeit war die Untersuchung der cGMP/cGKI-vermittelten Phosphorylierung des Calciumkanals InsP₃R-I in Thrombozyten. Dieser liegt in Thrombozyten in einem trimeren Komplex mit IRAG und der cGKI β vor. Bereits 1994 konnte durch Autoradiographie nach *in-vitro*-Phosphorylierung nachgewiesen werden, dass der InsP₃R-I sowohl durch die cGMP-abhängige Kinase als auch durch die cAMP-abhängige Kinase phosphoryliert werden kann und dass die bevorzugte cGK-Phosphorylierungsstelle die Aminosäure Ser1755 ist (Komalavilas & Lincoln, 1994). Dass eine Stimulation mit dem membrangängigen cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP zu einer InsP₃R-I-Phosphorylierung durch die cG-Kinase führt, wurde anschließend in der intakten Ratten-Aorta bestätigt (Komalavilas & Lincoln, 1996). Die bevorzugte Phosphorylierung von Ser1755 durch die cGKI wurde allerdings durch Soulsby et al. widerlegt, die feststellten dass muriner InsP₃R-I nach Expression in HEK-Zellen bevorzugt an Ser1589 phosphoryliert wurde (Soulsby et al., 2004). Jedoch wurde hier kein Gewebelysat verwendet und der Rezeptor nicht wie üblich in DT-40 Zellen, sondern in HEK-Zellen überexprimiert. Eventuell war die beobachtete cGMP-stimulierte Phosphorylierung auch PKA-vermittelt, da beide Kinasen in den Zellen endogen vorhanden waren und die cG-Kinase nicht zusätzlich überexprimiert worden war. Auch in Thrombozyten wurde bereits früher die cGK-vermittelte Phosphorylierung untersucht (El-Daher et al., 2000). In humanen Blutplättchen konnte sowohl beim InsP₃R-I als auch beim InsP₃R-III nach cGMP-Stimulation eine Phosphorylierungszunahme festgestellt werden, die jedoch nicht quantifiziert wurde und deren Funktion unklar war.

Bezüglich der Funktion der InsP₃R-I-Phosphorylierung konnten Murthy et al. feststellen, dass durch Zugabe von cGKI α - bzw. PKA-Enzym zu Glattmuskelmikrosomen aus dem Magen die InsP₃-induzierte Calciumfreisetzung gehemmt wurde (Murthy & Zhou, 2003). Dabei konnte durch beide Kinasen in etwa der gleiche Effekt erzielt werden und gleichzeitig eine deutliche Phosphorylierung des InsP₃R-I beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Hemmung der Calciumfreisetzung durch InsP₃R-I-Phosphorylierung durch die beiden Kinasen an der gleichen Aminosäure vermittelt wird. Diese konnte jedoch nicht identifiziert werden (Murthy & Zhou, 2003). 2004 wurde mit Hilfe phosphomimetischer Mutanten festgestellt, dass bei Expression der S²⁺-Form des Rezeptors durch cGK-vermittelte Phosphorylierung von Ser1755 die Calciumfreisetzung nicht gehemmt, sondern sogar gesteigert wird (Wagner et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit ergab die *in-vivo*-Stimulation von Maus-Thrombozyten, dass der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ cGMP-stimuliert durch die cGKI an Ser1755 phosphoryliert werden kann. Es war jedoch kein Unterschied in der Phosphorylierung in Wildtyp- und IRAG-KO-Thrombozyten zu beobachten. Nach Stimulation mit 200 μM 8-pCPT-cGMP lag der Anstieg der Phosphorylierung zwischen 30 und 70 %. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Phosphorylierung in der intakten Ratten-Aorta gut überein, da dort nach Stimulation mit den NO-Donoren SNP und SNAP die Phosphorylierungszunahme zwischen 40 und 70 % und nach 10-minütiger Stimulation mit 8-pCPT-cGMP bei ca. 40 % lag (Komalavilas & Lincoln, 1996). Allerdings wurde in der Ratten-Aorta die „Gesamt“-Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$, das heißt die stimulierte Phosphorylierung an allen Phosphorylierungsstellen, durch die Methode der Back-Phosphorylierung (Forn & Greengard, 1978) und eine densitometrische Vermessung des Autoradiogramms bestimmt.

Zusätzlich zur Phosphorylierung an Ser1755 wurde auch in dieser Arbeit die stimulierte Gesamtphosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ untersucht, wofür eine ^{33}P -*in-vivo*-Phosphorylierung in Thrombozyten, gefolgt von der Immunpräzipitation des Rezeptors und einer Autoradiographie durchgeführt wurden. Ergebnis war auch in diesem Experiment, dass der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ cGMP-stimuliert phosphoryliert werden kann und dass kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und den IRAG-KO-Thrombozyten besteht. In Übereinstimmung mit der Ser1755-Phosphorylierung war auch bei der Gesamtphosphorylierung der Anstieg nach Stimulation mit 1 mM 8-Br-cGMP tendenziell größer als nach Inkubation mit 200 μM 8-pCPT-cGMP. Die ermittelte Zunahme der Phosphorylierung war geringer als die mit dem Phospho-AK detektierte Zunahme, stimmte aber relativ gut mit der von Komalavilas et al. (Komalavilas & Lincoln, 1996) beobachteten Phosphorylierung in der Aorta überein.

Was kann man daraus schließen, dass die Phosphorylierungszunahme in den Wildtyp- und in den IRAG-KO-Thrombozyten gleich war? Welche Funktion hat die Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$?

In COS-7-Zellen wurde festgestellt, dass durch die cGMP-stimulierte Phosphorylierung von IRAG an Ser677 (bzw. Ser696 des bovinen IRAG) die InsP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum gehemmt wird (Ammendola *et al.*, 2001). In WT-Thrombozyten wurde die agonistinduzierte (z.B. Thromboxan, Collagen) Thrombozytenaggregation durch Vorinkubation mit NO/cGMP deutlich gehemmt, während in IRAG-KO-Thrombozyten diese Hemmung stark vermindert war (Schinner *et al.*, 2011). Das heißt, dass IRAG eine bedeutende Rolle bei der cGMP/cGKI-vermittelten Hemmung der Aggregation spielt und dass für diese Aggregationshemmung die Inhibition der Calciumfreisetzung durch IRAG-Phosphorylierung essentiell ist. Unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Thrombozytenaggregation gehemmt wurde, also 30 min Inkubation mit 1 mM 8-Br-cGMP, konnte auch die Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$

beobachtet werden. Da die Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten gleich ist, hat sie wohl keine Bedeutung für die Hemmung der Calciumfreisetzung bzw. für die Hemmung der Thrombozytenaggregation, oder ist nicht ausreichend für die Aggregationshemmung. Wenn die $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung zu einer deutlichen Hemmung der Calciumfreisetzung führen würde, müsste auch in den IRAG-KO-Thrombozyten eine Hemmung der Thrombozytenaggregation nach cGMP-Gabe beobachtet werden. Die hier erhaltenen Ergebnisse stimmten mit denen von Wagner et al. überein (Wagner *et al.*, 2003), die festgestellt haben, dass bei Expression des S^{2-} - $\text{InsP}_3\text{R-I}$ eine cGMP-Stimulation nicht zu einer Änderung des Carbachol-induzierten Calciumsignals führte. Bei Expression des neuronalen S^{2+} - $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in DT-40 Zellen jedoch konnte nach Zugabe von 8-Br-cGMP ein Anstieg des Carbachol-induzierten Calciumsignals beobachtet werden. Wagner et al. vermuteten damals, dass der S^{2-} -Rezeptor im Gegensatz zur S^{2+} -Form nicht direkt durch die cGKI phosphoryliert werden kann und dass deshalb kein Effekt zu sehen war. Diese Hypothese wurde durch die vorliegende Arbeit widerlegt. Die zweite Vermutung war, dass der Effekt einer S^{2-} -Phosphorylierung eigentlich der Effekt einer IRAG-Phosphorylierung ist, welches in den DT-40 Zellen nicht exprimiert worden war. Das bedeutet, dass eine Veränderung des Calciumsignals des S^{2-} -Rezeptors nur bei gleichzeitiger IRAG-Expression zu sehen wäre. Zusätzlich zu den Versuchen mit DT-40 Zellen wurden in der Vergangenheit auch Phosphorylierungsexperimente mit humanen Thrombozyten durchgeführt (Cavallini *et al.*, 1996). Hier bewirkte eine Zugabe von Prostacyclin (PGI_2) und Nitroprussid-Natrium (SNP) einen schnelleren Rücktransport von Calciumionen ins endoplasmatische Retikulum, nachdem die Thrombozyten zuvor mit Thrombin aktiviert worden waren. Gleichzeitig wurde in beiden Fällen eine Phosphorylierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ beobachtet, woraus geschlossen wurde, dass durch diese Phosphorylierung die InsP_3 -vermittelte Calciumfreisetzung gehemmt wird (Cavallini *et al.*, 1996). Wenn auch in den Mausthrombozyten durch die NO/cGMP-vermittelte $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung die Calciumfreisetzung gehemmt bzw. der intrazelluläre Calciumspiegel erniedrigt wird, so ist dieser Effekt gegenüber der Hemmung der Calciumfreisetzung durch IRAG-Phosphorylierung zu vernachlässigen. Wäre dies nicht der Fall, wäre in den IRAG-KO-Thrombozyten ebenfalls eine Hemmung der Thrombozytenaggregation durch NO/cGMP zu beobachten.

Dass die Phosphorylierung in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten gleich war, ist zudem erstaunlich, da in den IRAG-KO-Thrombozyten im Vergleich zum Wildtyp eine sehr stark verminderte cGKI β -Expression zu beobachten war. Das heißt, dass entweder die geringe Menge an cGKI β in den KO-Thrombozyten ausreichte, um eine gleich starke Phosphorylierung wie im Wildtyp zu erzielen, oder dass diese Phosphorylierung durch die cGKI α -Isoform verursacht wurde. Ebenfalls wäre möglich, dass im IRAG-KO die

Phosphorylierung durch die cGKI α erfolgte, und in den Wildtyp-Thrombozyten durch die cGKI β -Isoform. Einen Hinweis auf eine cGKI β -vermittelte Phosphorylierung gibt die Phosphorylierung in humanen Thrombozyten. Diese exprimieren im Gegensatz zu den Mausthrombozyten nur cGKI β , aber keine cGKI α (Geiselhoringer *et al.*, 2004a). Das heißt, dass die cGMP-stimulierte InsP₃R-I-Phosphorylierung in diesem Fall durch die cGKI β -Isoform bedingt sein muss. Der Anstieg der Phosphorylierung war in murinen und in humanen Thrombozyten gleich stark, woraus man schließen kann, dass die Phosphorylierung auch in den Mausthrombozyten durch die cGKI β erfolgte. Da bis jetzt keine selektiven cGKI β -Inhibitoren verfügbar sind, konnte auf diese Art und Weise nicht getestet werden, ob die InsP₃R-I-Phosphorylierung durch die cGKI β -Isoform verursacht wurde.

Nach Stimulation der Thrombozyten durch Inkubation mit dem cAMP-Analogen cBIMPS und mit den den cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen Forskolin und Prostazyklin konnte mit dem P-InsP₃R-I-AK eine zweite unbekannte Bande oberhalb der des InsP₃R-I detektiert werden. Nach Forskolin-Stimulation von COS-7-Zellen, in welchen der S²-InsP₃R-I transient exprimiert worden war, war diese Bande mit dem gleichen Antikörper nicht detektiert worden (Masuda *et al.*, 2010). Daraus lässt sich schließen, dass die Bande ein phosphoryliertes Protein beinhaltet, welches in COS-7-Zellen nicht endogen exprimiert wird. Es ist möglich, dass es sich bei diesem Protein um den InsP₃R-II handelt, da dieser - wie bereits erwähnt - durch die PKA an der Aminosäure Ser937 phosphoryliert werden kann (Betzenhauser *et al.*, 2009). Die Ser937-Phosphorylierungsstelle (S R G **S**) besitzt jedoch keine typische PKA-Phosphorylierungssequenz, die üblicherweise das Motiv R(R/K)X(S/T) aufweist (Scholten *et al.*, 2008). Außerdem besteht nur eine geringe Ähnlichkeit mit der Ser1755-Phosphorylierungsstelle (R R E **S**) des InsP₃R-I, weshalb es wiederum unwahrscheinlich ist, dass mit dem P-InsP₃R-I-AK der an Ser937 phosphorylierte InsP₃R-II detektiert wurde. Eventuell handelt es sich um eine neue, noch nicht beschriebene InsP₃R-II-Phosphorylierungsstelle. Jedoch kommt in der gesamten Sequenz des murinen InsP₃R-II die Aminosäuresequenz R R E S nicht vor. Somit wird möglicherweise doch ein ganz anderes Protein mit dem Phospho-AK erkannt. Das kann jedoch nur geklärt werden, wenn es gelingt, das Protein aus dem cBIMPS-stimulierten Thrombozytenlysat aufzureinigen, und seine Sequenz einschließlich der Phosphorylierungsstelle zu ermitteln.

D.2 Die trimeren cGKI β /IRAG/InsP $_3$ R-Komplexe

Der trimere Komplex aus cGKI β /IRAG/InsP $_3$ R-I wurde bereits im Jahr 2000 in Glattmuskelmembranen der Trachea nachgewiesen (Schlossmann *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die stabile Interaktion der drei Proteine in Thrombozyten und in Colonlysat bestätigt werden (s. Abb. 47). Es wurde darüber hinaus untersucht, ob durch Deletion der postulierten IRAG-Interaktionsstelle mit der cGKI β , nämlich den AS 152-184 von IRAG (Ammendola *et al.*, 2001), die Interaktion zwischen den beiden Proteinen tatsächlich aufgehoben wird. Die Kinase wurde dazu gemeinsam mit IRAG-WT bzw. IRAG Δ Int in COS-7-Zellen exprimiert. Im Gegensatz zum IRAG-WT konnte IRAG Δ Int nicht an cGMP-Agarose gebunden werden. Darüber hinaus wurde die IRAG Δ Int-Mutante eingesetzt, um die Lokalisation der Kinase in der Zelle nach cGMP-Behandlung zu testen. Casteel *et al.* (2008) hatten nach Co-Expression beider Kinase-Isoformen mit IRAG in BHK-Zellen festgestellt, dass die cGKI α nach cGMP-Stimulation eine Translokation in den Zellkern erfährt, während die cGKI β -Isoform extra-nukleär lokalisiert blieb und dort mit IRAG co-lokalisierte. Dies wurde mit einer Ankerfunktion von IRAG für die cGKI β erklärt. Diese Co-Lokalisation bzw. Verankerung konnte in COS-7-Zellen bestätigt werden. Gleichzeitig war bei Expression von IRAG Δ Int wieder eine Translokation der Kinase in den Zellkern zu sehen, was durch die fehlende Interaktion zwischen IRAG Δ Int und cGKI β ermöglicht wurde. In primären glatten Gefäßmuskelzellen von IRAG-KO-Mäusen jedoch konnte nach cGMP-Stimulation trotz des fehlenden Ankers keine Translokation der Kinase in den Zellkern beobachtet werden (Desch *et al.*, 2010). Dies wurde dadurch erklärt, dass in den VSMCs noch andere Proteine vorhanden sind, die die cGKI β im Zytosol verankern (Desch *et al.*, 2010).

IRAG ist also ein Ankerprotein für die cG-Kinase (ein GKAP), in Analogie zu den AKAPs (A-Kinase Anker Proteine), welche die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A an verschiedene zelluläre Strukturen binden. Es sind über 50 verschiedene AKAPs bekannt (Scholten *et al.*, 2008), die durch PKA-Bindung die verschiedenen PKA-Signalwege ermöglichen und eine Cross-Reaktivität verhindern (Margarucci *et al.*, 2011).

Die Interaktion zwischen IRAG und der cGKI β -Isoform wurde somit bereits relativ umfassend untersucht. Zusätzlich zur Lage der Interaktionsstelle im IRAG (AS 152-184) wurde ermittelt, dass die Interaktion zwischen basischen Aminosäuren im IRAG-Protein und sauren Resten der cGKI β besteht (Casteel *et al.*, 2005). Wichtige Aminosäuren sind dabei R120, R124 und R125 von IRAG und D26, E29 und E31 von cGKI β , was durch Untersuchung GST-getaggtter Mutanten analysiert worden war. Nach Austausch dieser für die Interaktion essentiellen Aminosäuren war keine Interaktion mehr zwischen den beiden Proteinen zu beobachten.

Über die Interaktion zwischen IRAG und dem $\text{InsP}_3\text{R-I}$ ist jedoch sehr viel weniger bekannt. Es wurden bereits einige Versuche zur funktionellen Bedeutung der IRAG- $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Interaktion durchgeführt, unter anderem die Organbadversuche mit Aorten von $\text{IRAG}\Delta 12$ -Mäusen (Geiselhoringer *et al.*, 2004b). $\text{IRAG}\Delta 12$ -Aorten konnten nach Vorkontraktion mit Phenylephrin durch cGMP-Gabe, im Gegensatz zu den WT-Aorten, fast nicht relaxiert werden. Aber außer der Notwendigkeit des Exon 12 von IRAG für die Interaktion ist wenig über die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen bekannt. Welcher Abschnitt im $\text{InsP}_3\text{R-I}$ genau mit IRAG interagiert, ist noch völlig unklar. Der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ liegt funktionell als Tetramer vor (Bultynck *et al.*, 2003), wobei ein Monomer wiederum in fünf funktionelle Domänen eingeteilt werden kann: eine N-terminale Kopplungs- bzw. Suppressordomäne, eine InsP_3 -Bindungsdomäne, eine interne Kopplungsdomäne, eine Transmembran- bzw. kanalbildende Domäne und eine C-terminale „Gatekeeperdomäne“ (Mikoshiya, 2007),(Kawaai *et al.*, 2009). Interagierende Proteine binden vermutlich an die interne Kopplungsdomäne oder die C-terminale „Gatekeeperdomäne“, deren Bedeutung bereits für die Interaktion mit dem PKC-Substrat 80K-H beschrieben wurde (Kawaai *et al.*, 2009). Für die Interaktion zwischen IRAG und dem $\text{InsP}_3\text{R-I}$ wurden derartige Untersuchungen jedoch noch nicht durchgeführt. Genauere Kenntnisse der Interaktionsstelle wären aber wichtig, um weiter aufzuklären, wie die hemmende Wirkung der cGKI β -vermittelten IRAG-Phosphorylierung auf den $\text{InsP}_3\text{R-I}$ zustande kommt. Zunächst einmal müsste der entscheidende Bereich des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ näher eingegrenzt werden, zum Beispiel durch Interaktionsstudien mit verschiedenen GST- oder His-getaggten $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Fragmenten. Dann könnten die für die Interaktion wichtigen Aminosäuren durch Untersuchung von Fusionsproteinen, die Mutationen verschiedener Aminosäuren enthalten, ermittelt werden. Zusätzlich wären auch kalorimetrische Versuche denkbar, die zum Beispiel bei der Untersuchung der cGKI α -MYPT-1-Interaktion durchgeführt wurden (Sharma *et al.*, 2008). Einen ersten Hinweis auf die $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Interaktionsdomäne könnte aber ein proteolytischer Abbau des Rezeptors durch die calciumabhängige Cystein-Protease Calpain liefern. Magnusson *et al.* konnten nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} oder Calpain plus Ca^{2+} zu Cerebellumlysat eine Degradierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ beobachten (Magnusson *et al.*, 1993). Durch den proteolytischen Abbau entstanden zwei Fragmente, eines mit einer Größe von 130 kDa und das andere mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa. Allerdings konnte die Schnittstelle der Protease nicht genau identifiziert werden. Nach einer Degradierung des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ durch Calpain könnte untersucht werden, ob das C- oder das N-terminale Fragment mit dem IRAG-Protein interagiert. Von diesem Fragment könnten dann weitere Mutanten für die Interaktionsanalysen hergestellt werden.

Neben dem $\text{InsP}_3\text{R-I}$ sind zwei weitere Subtypen von InsP_3 -Rezeptoren beschrieben, nämlich der $\text{InsP}_3\text{R-II}$ und der $\text{InsP}_3\text{R-III}$, der in den murinen Thrombozyten, im Gegensatz

zu den anderen beiden Subtypen, nur in sehr geringer Menge exprimiert wird. Zusätzlich zu dem bekannten trimeren Komplex aus cGKI β , IRAG und InsP₃R-I konnte auch eine Interaktion zwischen InsP₃R-III und IRAG nachgewiesen werden (s. Abb. 47). Diese Interaktion wurde auch in COS-7-Zellen, nach transienter Proteinexpression, beobachtet (Masuda *et al.*, 2010). Masuda *et al.* konnten zudem, ebenfalls in COS-7-Zellen, eine Interaktion zwischen dem InsP₃R-II und IRAG feststellen. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Wechselwirkung nicht detektiert werden, weder in Co-Immunpräzipitationen noch in cGMP-Agarosefällungen. Es ist dennoch möglich, dass der InsP₃R-II auch in Thrombozyten mit dem IRAG-Protein interagiert, da das Protein nicht aus Thrombozytenlysat immunpräzipitiert werden konnte. Es wurden dabei verschiedenste Fällungspuffer getestet, die in früheren Veröffentlichungen zum InsP₃R-II beschrieben worden waren. Zusätzlich wurden Immunpräzipitationen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Wenn eine Interaktion besteht, muss sie aber - im Gegensatz zur IRAG-InsP₃R-I-Interaktion - relativ schwach sein, was auch Masuda *et al.* berichteten. Sie war nicht unter den gleichen Bedingungen zu sehen wie die Interaktion zwischen IRAG und InsP₃R-I oder IRAG und InsP₃R-III. Zudem wurden bei Masuda *et al.* alle Interaktionen nach transienter Expression der Proteine in COS-7-Zellen, und nicht in murinen Thrombozyten oder Gewebelysat, nachgewiesen.

Was die Funktion der Komplexe betrifft, stellten Masuda *et al.* fest, dass die Interaktion zwischen IRAG und InsP₃R bei allen drei Subtypen essentiell für die cGMP-stimulierte Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung ist. Bei Expression des IRAG Δ 12-Proteins, dem die Interaktionsstelle mit dem InsP₃R fehlt, war keine Abschwächung des Calciumsignals nach cGMP-Gabe zu beobachten (Masuda *et al.*, 2010). Dies stimmt mit den Experimenten mit Thrombozyten überein (Antl *et al.*, 2007), da in IRAG Δ 12-Thrombozyten im Gegensatz zu WT-Thrombozyten die Collagen-induzierte Aggregation durch Vorinkubation mit NO/cGMP nicht gehemmt werden konnte. Das heißt, dass auch hier die Interaktion zwischen IRAG und InsP₃R-I notwendig war für die Hemmung der Calciumfreisetzung aus dem ER, wodurch die Thrombozytenaggregation gehemmt wurde. Ebenso konnte bei IRAG Δ 12-Colonsegmenten, im Gegensatz zum Wildtyp-Colon, durch Vorinkubation mit 8-Br-cGMP die Carbachol-induzierte Glattnuskelkontraktion nicht unterdrückt werden (Geiselhoring *et al.*, 2004b).

Masuda *et al.* konnten zudem bei Expression von S²⁺-InsP₃R-I und cGKI β ohne IRAG eine Zunahme des Carbachol-induzierten Calciumpeaks nach cGMP-Gabe nachweisen. Dies konnte bei Zellen, in denen gleichzeitig das IRAG Δ 12-Protein co-exprimiert worden war, nicht beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass der InsP₃R direkt durch die cGKI phosphoryliert werden kann und dass dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors gesteigert wird. Bei Co-Expression von IRAG jedoch bindet dieses die Kinase und könnte dadurch die Phosphorylierung anderer Substrate, wie zum Beispiel die

des Rezeptors vermindern. Sie folgerten, dass der hemmende Effekt der IRAG-Phosphorylierung über den positiven aktivierenden Effekt der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung dominiert. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen überein, als festgestellt wurde, dass die $\text{InsP}_3\text{R-I}$ -Phosphorylierung für die IRAG-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation keine Rolle spielt (s. D.1).

Die Bedeutung der Interaktion zwischen IRAG und $\text{InsP}_3\text{R-II}$ bzw. zwischen IRAG und $\text{InsP}_3\text{R-III}$ muss dagegen weiter untersucht werden. Es ist noch unklar, in welchen Zellen oder in welchem Gewebe die IRAG-abhängige Hemmung der Calciumfreisetzung über $\text{InsP}_3\text{R-II}$ und -III eine Rolle spielt. $\text{InsP}_3\text{R-III}$ konnte zum Beispiel im Jejunum der Ratte nachgewiesen werden (Blondel *et al.*, 1993). In diesem Gewebe wird auch IRAG exprimiert. Allerdings stellten Frei *et al.* fest, dass im Jejunum, im Gegensatz zum Colon, die cGKI-abhängige Hemmung der Kontraktion über einen Calcium- und IRAG-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird (Frei *et al.*, 2009). Jejunumsegmente von $\text{IRAG}\Delta 12$ -Mäusen konnten - nach Carbacholvorkontraktion - im Gegensatz zu $\text{IRAG}\Delta 12$ -Colonsegmenten durch Stimulation mit 8-Br-cGMP relaxiert werden. Gleichzeitig konnte die Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung im Jejunum nicht durch cGMP gehemmt werden. Zudem wurde im Jejunum nach cGMP-Stimulation eine verminderte MYPT-1-Phosphorylierung an Thr696, welche im Zusammenhang mit einer Glattmuskelkontraktion steht, beobachtet (Frei *et al.*, 2009). Dies spricht ebenfalls für eine Ca^{2+} -unabhängige Relaxation in diesem Gewebe.

D.3 Weitere cG-Kinase-Komplexe in Thrombozyten und Glattmuskelgewebe

Nachdem die Interaktionen der InsP_3 -Rezeptoren mit IRAG und der cG-Kinase untersucht worden waren, wurde in Mausthrombozyten und in murinem Colongewebe auf weitere cGK-Komplexe getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass Phospholamban, welches an die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase II (SERCA II) assoziiert vorliegt, ebenfalls im Makrokomples aus cGKI β , IRAG und dem $\text{InsP}_3\text{R-I}$ enthalten ist. Dies stimmt überein mit dem 2003 entdeckten Komplex aus cGKI β , $\text{InsP}_3\text{R-I}$ und Phospholamban nach Expression der Proteine in COS-7-Zellen (Koller *et al.*, 2003). Mit einem anti-PLB-AK konnte die cGKI β 2003 nur bei gleichzeitiger Expression des $\text{InsP}_3\text{R-I}$ präzipitiert werden. Wurde cGKI β durch cGKI α ersetzt, war keine Komplexbildung mehr zu sehen. Außerdem war IRAG nicht im PLB-Immünpräzipitat der COS-7-Zellen nachzuweisen, im Gegensatz zur PLB-Fällung mit bovinen Trachea-Glattmuskelfmembranen, als die cG-Kinase I, IRAG und der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ detektiert werden konnten. Diese Abweichung wurde mit der Anwesenheit weiterer Proteine im Glattmuskellysat (z.B. Aktin), die für eine IRAG-Bindung

notwendig sind, erklärt (Koller *et al.*, 2003). Glattmuskel α -Aktin war ebenfalls im cGMP-Agarosekomplex enthalten und konnte mittels MALDI-TOF identifiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun zusätzlich eine Interaktion zwischen cGKI α und Phospholamban nachgewiesen (s. Abb. 47). Dabei muss es sich aber um einen zweiten Komplex handeln. Die cGKI α ist nicht Bestandteil des großen Makrokomplexes aus cGKI β , IRAG, InsP₃R-I und Phospholamban. Dies kann man daraus ableiten, dass in der cGKI α -Immunpräzipitation die cGKI β -Isoform und IRAG nicht detektiert werden konnten. Würden sie im gleichen Komplex vorliegen, müssten sie nachzuweisen sein. In der Phospholamban-Immunpräzipitation dagegen konnten beide Komplexe mit allen Komponenten bzw. beide cGKI-Isoformen im Western Blot detektiert werden. Die Interaktion mit cGKI α muss kein Widerspruch zur Arbeit von Koller *et al.* sein, da dort nicht in Gewebe, sondern nur in transfizierten COS-7-Zellen nachgewiesen wurde, dass die cGKI α -Isoform nicht mit Phospholamban interagiert. Außerdem wurde bei der PLB-Fällung mit bovinem Glattmuskellysat im Western Blot nur der anti-cGKI-common-AK eingesetzt, was bedeutet, dass in der Fällung eventuell auch beide Isoformen der cGKI enthalten waren. Margarucci *et al.* (2011) führten cGMP-Agarosefällungen mit humanen Thrombozyten durch, welche vor der Lyse mit Collagen stimuliert worden waren. In diesen Experimenten konnte Phospholamban nicht detektiert werden, jedoch wurde auch nicht - wie in der vorliegenden Arbeit - im Western Blot auf das Protein getestet.

Die Funktion der cGKI-PLB-Interaktion ist weiterhin unklar. Es ist bekannt, dass die cG-Kinase, wie auch die Proteinkinase A, Phospholamban an Ser16 phosphorylieren kann (Kim & Perrino, 2007). Durch Phosphorylierung an dieser Stelle kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und dadurch zu einer Dissoziation von der SERCA II, wodurch die hemmende Wirkung auf die Ca²⁺-ATPase aufgehoben wird (Tada & Toyofuku, 1998). Diese (SERCA II) konnte jedoch nicht im cG-Kinase-Makrokomplex nachgewiesen werden (Koller *et al.*, 2003), wodurch ein direkter Effekt der cGKI auf die SERCA II unwahrscheinlich wird. PLB-KO-Mäuse zeigten eine verringerte Sensitivität bei der agonistinduzierten Aortenkontraktion (Lalli *et al.*, 1997), was bedeuten könnte, dass Phospholamban an der InsP₃-induzierten Calciumfreisetzung im glatten Muskel beteiligt ist. Durch Phosphorylierung von Phospholamban könnte es zu einer Beeinflussung der InsP₃R-Aktivität und somit zu einer Hemmung der Calciumfreisetzung kommen (Koller *et al.*, 2003). Dies kann sowohl im glatten Muskel des Colons bei der Hemmung der Muskelkontraktion, als auch in Thrombozyten bei der Aggregationshemmung eine Rolle spielen. Generell hat aber Phospholamban in den kardialen Myozyten eine größere Bedeutung als in der glatten Muskulatur und wird dort auch in größerer Menge exprimiert (MacLennan & Kranias, 2003). In PLB-KO-Kardiomyozyten konnte durch Gabe von 8-Br-cGMP oder CNP im Vergleich zum Wildtyp keine Reduktion der intrazellulären Calciumtransienten erzielt werden (Zhang *et al.*, 2007). Aus diesem und aus weiteren

Ergebnissen wurde geschlossen, dass die cGMP-abhängigen Reduktionen der Kardiomyozytenfunktion mindestens teilweise durch Phospholamban vermittelt werden.

Wie Phospholamban wurde auch die Phosphodiesterase 5 (PDE5) als Bestandteil des trimeren Makrokompleses beschrieben (Wilson *et al.*, 2008). Dies wurde in humanen Thrombozyten mittels Co-Immunpräzipitationen nachgewiesen. In den Fällungen mit den Antikörpern gegen $\text{InsP}_3\text{R-I}$, cGK und PDE5 konnten jeweils alle drei Proteine detektiert werden. Die Anwesenheit von IRAG in diesem Signalkomplex konnte nicht eindeutig bewiesen werden, da kein primärer Antikörper gegen das IRAG-Protein zur Verfügung gestanden hatte. Nach cGMP-Stimulation eines anti-cGK-Immunpräzipitats, welches zuvor mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ behandelt worden war, konnte aber eine von der Größe dem IRAG-Protein entsprechende Bande im Autoradiogramm detektiert werden. Neben IRAG wurden auch die PDE5 und der $\text{InsP}_3\text{R-I}$ in diesem Experiment cGMP-stimuliert durch die cGKI phosphoryliert (Wilson *et al.*, 2008). Margarucci *et al.* (2011) konnten die PDE5 ebenfalls im cGMP-Agarosekomplex von humanen Thrombozyten nachweisen und stellten zudem fest, dass die Menge an gebundenem Protein nach CRP-Stimulation (collagen related peptide) der Thrombozyten vor der Lyse signifikant um das dreifache zunahm. Sie gaben aber außerdem an, dass nur ein sehr geringer Anteil der PDE5 an IRAG und den $\text{InsP}_3\text{R-I}$ assoziiert vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht bestätigt werden, dass die PDE5 ein Bestandteil des trimeren Makrokompleses ist. Es wurden Co-Immunpräzipitationen und cGMP-Agarosefällungen mit Thrombozyten- und Colonlysate von WT- und IRAG-KO-Mäusen durchgeführt. Nur in den cGMP-Agaroseproben der murinen Thrombozyten konnte eine sehr geringe Menge PDE5 detektiert werden. Die verstärkte Bindung von PDE5 an cGMP-Agarose nach Collagen-Stimulation wurde nicht überprüft, da der Nachweis von PDE5 in der cGMP-Agarosefällung nicht unbedingt für eine Interaktion mit der cG-Kinase sprechen muss. Phosphodiesterasen sind cGMP-hydrolysierende Enzyme und binden somit cGMP und auch an die cGMP-Agarose. Im Gegensatz zur cGMP-Agarosefällung lässt sich eine Interaktion mit der cGK eindeutig aus einer Co-Immunpräzipitation mit der Kinase ableiten, weshalb auch Margarucci *et al.* mit der cGMP-Agarosemethode die Interaktion nicht direkt beweisen können. Deshalb haben sie die Phosphodiesterasen 2A und 5A, ebenso wie die Kinasen cGKI β oder cGKII, als „primary interactors“ und IRAG und die InsP_3R dagegen als „secondary interactors“ der cGMP-Agarose bezeichnet (Margarucci *et al.*, 2011). Was die CRP-Stimulation betrifft, fehlt eine direkte Kontrolle für eine erfolgreiche Aktivierung der Thrombozyten durch Collagen. Die Bedeutung der PDE5-cGKI-Interaktion unterstrichen Wilson *et al.* (2008) in ihrer Arbeit damit, dass im Experiment mit humanen Thrombozyten nur die cGK-assoziierte PDE5 cGMP-stimuliert an Ser102 phosphoryliert werden konnte. Ser102 ist die Phosphorylierungsstelle der

humanen PDE5, während Ser92 die des bovinen Enzyms darstellt. Die PDE5-Phosphorylierung wurde dabei in humanen Thrombozyten mit einem P-PDE5-AK nachgewiesen, der spezifisch die Phosphorylierung an Ser102 erkannte. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass eine cGMP-Stimulation sowohl eine Phosphorylierung der PDE5, als auch eine Zunahme der PDE5-Aktivität zur Folge hatte (Corbin *et al.*, 2000; Rybalkin *et al.*, 2002). Gleichzeitig wies die phosphorylierte Form des Enzyms eine höhere Affinität für cGMP auf (Corbin *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2010). Auch Wilson *et al.* bestimmten PDE5-Aktivitäten und stellten fest, dass nur die InsP₃R-I-assoziierte PDE5 durch 8-Br-cGMP aktiviert werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar keine Interaktion zwischen cGKI und PDE5 nachgewiesen werden, aber eine cGMP-stimulierte Phosphorylierung der PDE5 an der Phosphorylierungsstelle Ser92. Diese wurde nach cGMP-Stimulation von murinen WT-Thrombozyten mit einem Phospho-PDE5A-AK (Ser92) im Western Blot detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PDE5 cGMP-stimuliert durch die cG-Kinase phosphoryliert werden kann und dass dadurch wohl gleichzeitig die Enzymaktivität gesteigert wird. Aber es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, dass die PDE5 ein Bestandteil des trimeren Makrokompleses in murinen Thrombozyten und Gewebe ist. Eine Interaktion mit der cGKI wurde bislang allein durch Wilson *et al.* in humanen Thrombozyten beschrieben, diese hatten aber keinen anti-IRAG-AK zur Verfügung, um auch dieses im Western Blot im Komplex detektieren zu können.

Die hier bisher auf ihre Interaktionen hin dargestellten cGK-Substratproteine sind in der veröffentlichten Literatur alle als cGKI β -Interaktoren, oder als Bestandteile des trimeren Makrokompleses beschrieben worden. Die Interaktion zwischen der cGKI α -Isoform und MYPT-1, der „myosin targeting subunit“ der Myosinleichtkettenphosphatase, ist jedoch ebenfalls eine sehr gut charakterisierte Wechselwirkung. So wurde nachgewiesen, dass für die Interaktion der Leuzin-Zipper von cGKI α und die Aminosäuren 888 - 928 von MYPT-1 essentiell sind (Surks & Mendelsohn, 2003; Given *et al.*, 2007). In der Vergangenheit war angenommen worden, dass der Leuzin-Zipper von MYPT-1 für die Interaktion notwendig ist. Nach Given *et al.* ist der Leuzin-Zipper zwar erforderlich für die MYPT-1-Homodimerisierung, aber nicht für die Interaktion mit der Kinase. Lee *et al.* haben mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie und analytischer Ultrazentrifugation festgestellt, dass MYPT-1 bei Anwesenheit des Leuzin-Zippers über diesen mit dem Leuzin-Zipper von cGKI α interagiert und dadurch ein Heterodimer mit der Kinase ausbildet. Fehlt der Leuzin-Zipper, ist aber eine Interaktion über die C-terminale coiled-coil-Region (cc-Region) von MYPT-1 möglich (Lee *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen in den murinen Glattmuskelgeweben Colon und Uterus keine Wechselwirkung zwischen MYPT-1 und cGKI α detektiert werden. In den

Co-Immünpräzipitationen wurden verschiedene Bindungspuffer getestet, und zusätzlich zu den Fällungen mit anti-cGKI α - und anti-cGKI γ -AK auch cGMP-Agarosefällungen durchgeführt. Es konnte jeweils die cGKI α in relativ großer Menge gebunden werden, der potentielle Interaktionspartner MYPT-1 konnte jedoch im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Bisher war die Interaktion zwischen den beiden Proteinen überwiegend durch Analyse GST-getaggtter cGKI α - und MYPT-1-Fragmente und durch Experimente mit mutierten Proteinen untersucht worden (Surks & Mendelsohn, 2003; Given *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008). Die Interaktion zwischen endogener cGKI α und endogenem MYPT-1-Protein wurde in Zelllysate von kultivierten Zellen der humanen Vena saphena magna (Surks *et al.*, 1999) und in embryonaler Hühneraorta und dem Magen junger Hühner (Tag 7) nachgewiesen (Huang *et al.*, 2004). Hierbei waren jeweils Co-Immünpräzipitationen mit anti-cGKI-AK bzw. anti-MYPT-1-AK durchgeführt worden. In kultivierten glatten Muskelzellen des Hühnermagens (von 15 Tage alten Embryos entnommen und kultiviert) konnte die Interaktion jedoch auch nicht bestätigt werden (Huang *et al.*, 2004). Deshalb ist es möglich, dass die cGKI α -MYPT-1-Wechselwirkung von der Spezies und vom im Versuch verwendeten Gewebe abhängt. Je nach Alter des Versuchstiers und Gewebeart wird außerdem eine Leuzin-Zipper positive oder LZ-negative MYPT-1 Isoform exprimiert, was - wie bereits erwähnt - die Interaktion beeinflussen kann (Lee *et al.*, 2007). In der Pfortader von 3 Tage alten Ratten wird eine Leuzin-Zipper positive (LZ+) Isoform exprimiert, während bei 12 Tage alten und bei adulten Ratten eine Leuzin-Zipper negative (LZ-) Form nachgewiesen werden konnte (Payne *et al.*, 2006). Die Expression des Leuzin-Zippers ist auch von funktioneller Bedeutung: Die Portalvene der 12 Tage alten Ratten zeigte eine sehr stark verminderte 8-Br-cGMP-vermittelte Relaxation nach KCl-stimulierter Vorkontraktion, was mit der Abwesenheit des Leuzin-Zippers erklärt wurde. Bei Expression eines LZ-negativen MYPT-1-Proteins kann somit von einer cGMP-Resistenz gesprochen werden (Payne *et al.*, 2006). Die bei Leuzin-Zipper-Abwesenheit detektierte Interaktion zwischen der cc-Region von MYPT-1 und cGKI α wurde durch Analyse humaner MYPT-1-Fragmente nachgewiesen (Lee *et al.*, 2007). Das in den Interaktionsversuchen in dieser Arbeit eingesetzte murine Uterus- und Colonlysate wurde nicht auf die Expression des Leuzin-Zippers getestet. Deswegen ist es möglich, dass im untersuchten Gewebe Leuzin-Zipper negatives MYPT-1-Protein nicht mit cGKI α interagieren konnte.

Zusätzlich zu MYPT-1 liegt auch der „regulator of G-protein signaling-2“ (RGS-2) in einem Komplex mit der cGKI α -Isoform vor (Tang *et al.*, 2003). cGKI α aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen interagiert mit dem GST-getaggtten N-Terminus (Aminosäuren 1-79) von RGS-2, was unter Verwendung von GST-Agarose ermittelt werden konnte. In einem weiteren Experiment wurde zu gereinigtem cGKI α -Enzym das [³⁵S]RGS-2-Protein gegeben und dann die cGKI α mit anti-cGKI-AK gefällt. Im Immünpräzipitat konnte auch

RGS-2 detektiert werden. RGS-2 ist außerdem ein Substrat der cGKI α und kann cGMP-vermittelt durch die cGKI α phosphoryliert werden, was zu einer Steigerung der GTPase-Aktivität führte (Osei-Owusu *et al.*, 2007). Da funktionell ein enger Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen besteht, wäre ein genaueres Untersuchen dieser Interaktion sicher sinnvoll. Außerdem fehlt noch ein Nachweis der Interaktion zwischen den endogen vorkommenden Proteinen, weswegen murine Gewebe und Zelllysate getestet werden sollten.

Die im Rahmen dieser Arbeit in den murinen Thrombozyten und im Colongewebe nachgewiesenen Interaktionen werden in Abb. 47 zusammenfassend dargestellt:

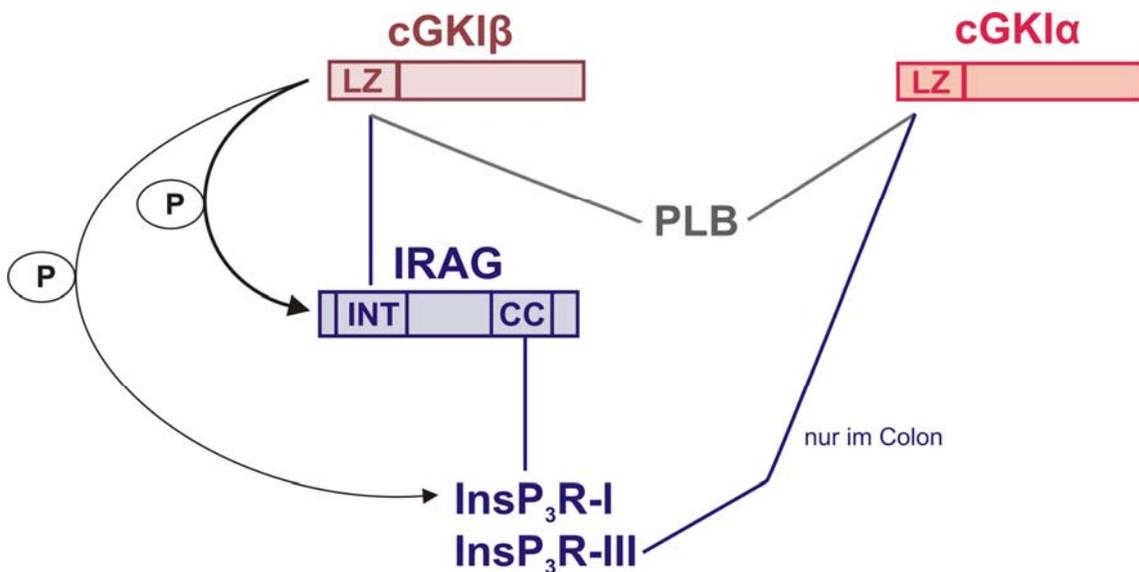


Abb. 47: Im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene cGKI-Komplexe

Die geraden Linien zeigen identifizierte Interaktionen zwischen zwei Proteinen mit den jeweiligen Interaktionsstellen – wenn diese bekannt sind - an. Die Pfeile stehen für Phosphorylierungen durch die cGKI β , der dünnere Pfeil zum InsP₃R-I sagt aus, dass diese Phosphorylierung im Vergleich zur IRAG-Phosphorylierung funktionell unbedeutend ist.

LZ: Leuzin-Zipper; INT: IRAG-Interaktionsstelle mit der cGKI β ; CC: coiled-coil Domäne.

E. Zusammenfassung

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs) haben als Bestandteile des NO/cGMP/cGK-Signalwegs in einer Vielzahl von Organen und Zellen eine große physiologische Bedeutung. Sie werden unter anderem in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen oder Gastrointestinaltrakt, in Thrombozyten, in der Niere und im Gehirn exprimiert. Darin spielen cGKs eine wichtige Rolle zum Beispiel bei der Vasorelaxation oder der Hemmung der Thrombozytenaggregation. Es werden zwei Isoformen der cGKI, die in ihrem N-Terminus unterschiedlichen Kinasen cGKI α und cGKI β , und die cGKII unterschieden. Die mannigfaltigen Effekte der cG-Kinasen werden durch ihre verschiedenen Substratproteine vermittelt. Diese werden durch die Kinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert oder gehemmt, oder interagieren mit ihnen in diversen Proteinkomplexen.

Ein Substratprotein der cGKI β -Isoform ist IRAG, das InsP₃Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinasesubstrat. Dieses ist in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert und liegt in einem Makrokomples mit der cGKI β und dem Calciumkanal InsP₃R-I (Inositoltrisphosphatrezeptor I) vor. Durch cGKI β -vermittelte IRAG-Phosphorylierung wird die InsP₃-induzierte Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum gehemmt. Der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration ist Voraussetzung für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Thrombozytenaggregation oder Muskelkontraktion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion einer cGKI-abhängigen Phosphorylierung des InsP₃R-I untersucht. Bislang war unklar, ob die periphere S²-Form des InsP₃R-I, welche auch in Thrombozyten exprimiert wird, direkt durch die cGK phosphoryliert werden kann, und ob dadurch die Calciumfreisetzung beeinflusst wird. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die cGMP-stimulierte Phosphorylierung des InsP₃R-I in murinen Wildtyp- und IRAG-KO-Thrombozyten untersucht. Sowohl die Phosphorylierung an Ser1755, der bekannten cGK-Phosphorylierungsstelle, als auch die Gesamtphosphorylierung des Rezeptors waren in Wildtyp- und IRAG-KO-Blutplättchen gleich. Unter den gleichen Bedingungen, unter welchen die InsP₃R-I-Phosphorylierung detektiert wurde, wurden Aggregationsexperimente durchgeführt. Durch cGMP konnte die Aggregation der Wildtyp-, aber nicht die der IRAG-KO-Thrombozyten gehemmt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung des InsP₃R-I nicht erforderlich oder nicht ausreichend für eine Hemmung der Aggregation ist.

Die weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen IRAG und cGKI β war ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Die IRAG-Interaktionsstelle mit der cGKI β war mittels Hefe-zwei-Hybrid-System bereits im Jahr 2001 identifiziert worden. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde nun eine IRAG-Mutante hergestellt, bei der jene Interaktionsstelle fehlt (IRAG Δ Int). In cGMP-Agarosefällungen zeigte sich, dass durch die Deletion die Interaktion tatsächlich aufgehoben wird. Darüber hinaus wurden das IRAG Δ Int-Protein und das WT-IRAG gemeinsam mit der cGKI β in COS-7-Zellen exprimiert. Es konnte beobachtet werden, dass das WT-IRAG die Kinase im Zytosol verankert. Bei Expression von IRAG Δ Int war jedoch nach cGMP-Stimulation der Zellen eine Translokation der Kinase in den Zellkern zu beobachten. Dies kann durch die fehlende Interaktion mit der Kinase erklärt werden.

Zusätzlich zum trimeren Makrokomplex sind in der Literatur weitere cGK-Komplexe beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Interaktionen auch in murinen Thrombozyten oder in der glatten Muskulatur des Colons auftreten. Es wurden WT- und IRAG-KO-Mäuse verwendet, um herauszufinden, ob IRAG ein essentieller Bestandteil der Komplexe ist. Außerdem konnte dadurch der Aufbau der Proteinkomplexe weiter analysiert werden. Es zeigte sich, dass neben dem InsP₃R-I auch der InsP₃R-III einen Komplex mit IRAG und cGKI β bildet. Die dritte InsP₃R-Isoform, der InsP₃R-II, konnte nicht als Interaktionspartner nachgewiesen werden. Sowohl in Thrombozyten, als auch in Colongewebe konnte aber Phospholamban, welches die Aufnahme von Ca²⁺ ins ER reguliert, als zusätzlicher Bestandteil des Makrokomplexes identifiziert werden. Zudem konnte eine Interaktion zwischen Phospholamban und der cGKI α -Isoform detektiert werden. In der Literatur wurde auch die Phosphodiesterase 5 als Bestandteil des trimeren Makrokomplexes in humanen Thrombozyten beschrieben. Dies konnte in murinen Blutplättchen und Colongewebe nicht bestätigt werden. Ebenso wurde keine Interaktion zwischen der cGKI α -Isoform und MYPT-1, der regulatorischen Untereinheit der Myosinleichtkettenphosphatase, detektiert, obwohl diese Wechselwirkung von mehreren anderen Arbeitsgruppen dargestellt wurde. Diese Interaktion wurde in Experimenten mit murinen Colon- und Uteruslysaten untersucht. Neben dem trimeren Komplex existieren somit noch verschiedene andere cG-Kinasekomplexe, deren Funktion und Interaktionsstellen jedoch häufig noch unklar sind.

F. Literaturverzeichnis

F.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Alverdi V, Mazon H, Versluis C, Hemrika W, Esposito G, van den Heuvel R, Scholten A & Heck AJ. (2008). cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain. *Journal of molecular biology* **375**, 1380-1393.
- Ammendola A, Geiselhoring A, Hofmann F & Schlossmann J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *The Journal of biological chemistry* **276**, 24153-24159.
- Antl M, von Bruhl ML, Eiglsperger C, Werner M, Konrad I, Kocher T, Wilm M, Hofmann F, Massberg S & Schlossmann J. (2007). IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood* **109**, 552-559.
- Bessay EP, Blount MA, Zoraghi R, Beasley A, Grimes KA, Francis SH & Corbin JD. (2008). Phosphorylation increases affinity of the phosphodiesterase-5 catalytic site for tadalafil. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **325**, 62-68.
- Betzenhauser MJ, Fike JL, Wagner LE, 2nd & Yule DI. (2009). Protein kinase A increases type-2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activity by phosphorylation of serine 937. *The Journal of biological chemistry* **284**, 25116-25125.
- Biel M & Michalak S. (2009). Cyclic nucleotide-gated channels. *Handbook of experimental pharmacology*, 111-136.
- Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S & Bell GI. (1993). Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *The Journal of biological chemistry* **268**, 11356-11363.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Bultynck G, Sienaert I, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H, Boens N, Dehaen W & Missiaen L. (2003). Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. *Pflugers Arch* **445**, 629-642.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J & Walter U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *The Journal of biological chemistry* **269**, 14509-14517.
- Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K & Gaestel M. (2001). Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants. *The Journal of biological chemistry* **276**, 7108-7113.
- Butt E, Pohler D, Genieser HG, Huggins JP & Bucher B. (1995). Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. *British journal of pharmacology* **116**, 3110-3116.
- Casteel DE, Boss GR & Pilz RB. (2005). Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I β and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif. *The Journal of biological chemistry* **280**, 38211-38218.
- Casteel DE, Smith-Nguyen EV, Sankaran B, Roh SH, Pilz RB & Kim C. (2010). A crystal structure of the cyclic GMP-dependent protein kinase I β dimerization/docking domain reveals

- molecular details of isoform-specific anchoring. *The Journal of biological chemistry* **285**, 32684-32688.
- Casteel DE, Zhang T, Zhuang S & Pilz RB. (2008). cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity. *Cellular signalling* **20**, 1392-1399.
- Cavallini L, Coassin M, Borean A & Alexandre A. (1996). Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **271**, 5545-5551.
- Chen J, Crossland RF, Noorani MM & Marrelli SP. (2009). Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H417-424.
- Chester MA, Seedorf GJ, Tourneux P, Gien J, Tseng N, Grover TR, Wright J, Stasch JP & Abman SH. (2011). Cinaciguat, a Soluble Guanylate Cyclase Activator, Augments cGMP after Oxidative Stress and Causes Pulmonary Vasodilation in Neonatal Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T & Hidaka H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *The Journal of biological chemistry* **265**, 5267-5272.
- Corbin JD, Turko IV, Beasley A & Francis SH. (2000). Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 2760-2767.
- Desch M, Sigl K, Hieke B, Salb K, Kees F, Bernhard D, Jochim A, Spiessberger B, Hocherl K, Feil R, Feil S, Lukowski R, Wegener JW, Hofmann F & Schlossmann J. (2010). IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovascular research* **86**, 496-505.
- Dostmann WR, Tegge W, Frank R, Nickl CK, Taylor MS & Brayden JE. (2002). Exploring the mechanisms of vascular smooth muscle tone with highly specific, membrane-permeable inhibitors of cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha. *Pharmacology & therapeutics* **93**, 203-215.
- EI-Daher SS, Patel Y, Siddiqua A, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, Patel G, Goulding D, Lupu F, Wojcikiewicz RJ & Authi KS. (2000). Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood* **95**, 3412-3422.
- Ertl C, Lukowski R, Sigl K, Schlossmann J, Hofmann F & Wegener JW. (2011). Kinetics of relaxation by cGMP/cGKI signaling in fundus smooth muscle. *European journal of pharmacology* **670**, 266-271.
- Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, Weber SE, Duerschmied D, Wagner DD, Watson SP & Hartwig JH. (2010). A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1967-1979.
- Ferris CD, Cameron AM, Bredt DS, Haganir RL & Snyder SH. (1991). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochemical and biophysical research communications* **175**, 192-198.
- Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S & Snyder SH. (1989). Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature* **342**, 87-89.

- Forn J & Greengard P. (1978). Depolarizing agents and cyclic nucleotides regulate the phosphorylation of specific neuronal proteins in rat cerebral cortex slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 5195-5199.
- Forstermann U & Sessa WC. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD & Sibley D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological reviews* **62**, 525-563.
- Frei E, Huster M, Smital P, Schlossmann J, Hofmann F & Wegener JW. (2009). Calcium-dependent and calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle. *American journal of physiology* **297**, G834-839.
- Furchgott RF & Vanhoutte PM. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* **3**, 2007-2018.
- Futatsugi A, Nakamura T, Yamada MK, Ebisui E, Nakamura K, Uchida K, Kitaguchi T, Takahashi-Iwanaga H, Noda T, Aruga J & Mikoshiba K. (2005). IP3 receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science (New York, NY)* **309**, 2232-2234.
- Gao Y, Portugal AD, Liu J, Negash S, Zhou W, Tian J, Xiang R, Longo LD & Raj JU. (2008). Preservation of cGMP-induced relaxation of pulmonary veins of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia: role of PKG and Rho kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L889-896.
- Geiselhoring A, Gaisa M, Hofmann F & Schlossmann J. (2004a). Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS letters* **575**, 19-22.
- Geiselhoring A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F & Schlossmann J. (2004b). IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *The EMBO journal* **23**, 4222-4231.
- Ghofrani HA, Hoepfer MM, Halank M, Meyer FJ, Staehler G, Behr J, Ewert R, Weimann G & Grimminger F. (2010). Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. *Eur Respir J* **36**, 792-799.
- Given AM, Ogut O & Brozovich FV. (2007). MYPT1 mutants demonstrate the importance of aa 888-928 for the interaction with PKGIalpha. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C432-439.
- Glaves JP, Trieber CA, Ceholski DK, Stokes DL & Young HS. (2011). Phosphorylation and mutation of phospholamban alter physical interactions with the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Journal of molecular biology* **405**, 707-723.
- Gonzalez-Cobos JC & Trebak M. (2010). TRPC channels in smooth muscle cells. *Front Biosci* **15**, 1023-1039.
- Griffith OW & Stuehr DJ. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual review of physiology* **57**, 707-736.
- Hammelmann V, Zong X, Hofmann F, Michalakis S & Biel M. (2011). The cGMP-dependent protein kinase II is an inhibitory modulator of the hyperpolarization-activated HCN2 channel. *PLoS one* **6**, e17078.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557-580.
- Hanke SE, Bertinetti D, Badel A, Schweinsberg S, Genieser HG & Herberg FW. (2011). Cyclic nucleotides as affinity tools: Phosphorothioate cAMP analogues address specific PKA subproteomes. *New biotechnology* **28**, 294-301.

- Hofmann F. (2005). The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1-4.
- Hofmann F, Dostmann W, Keilbach A, Landgraf W & Ruth P. (1992). Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochimica et biophysica acta* **1135**, 51-60.
- Hofmann F, Feil R, Kleppisch T & Schlossmann J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological reviews* **86**, 1-23.
- Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K & Walter U. (1994). Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *European journal of biochemistry / FEBS* **225**, 21-27.
- Huang QQ, Fisher SA & Brozovich FV. (2004). Unzipping the role of myosin light chain phosphatase in smooth muscle cell relaxation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 597-603.
- Jensen BO, Kleppe R, Kopperud R, Nygaard G, Doskeland SO, Holmsen H & Selheim F. (2010). Dipyridamole synergizes with nitric oxide to prolong inhibition of thrombin-induced platelet shape change. *Platelets* **22**, 7-18.
- Kaboord B & Perr M. (2008). Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **424**, 349-364.
- Kass DA, Takimoto E, Nagayama T & Champion HC. (2007). Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovascular research* **75**, 303-314.
- Kawaai K, Hisatsune C, Kuroda Y, Mizutani A, Tashiro T & Mikoshiba K. (2009). 80K-H interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors and regulates IP3-induced calcium release activity. *The Journal of biological chemistry* **284**, 372-380.
- Kim JJ, Casteel DE, Huang G, Kwon TH, Ren RK, Zwart P, Headd JJ, Brown NG, Chow DC, Palzkill T & Kim C. (2011). Co-crystal structures of PKG Ibeta (92-227) with cGMP and cAMP reveal the molecular details of cyclic-nucleotide binding. *PLoS one* **6**, e18413.
- Kim M & Perrino BA. (2007). CaM kinase II activation and phospholamban phosphorylation by SNP in murine gastric antrum smooth muscles. *American journal of physiology* **292**, G1045-1054.
- Koller A, Schlossmann J, Ashman K, Uttenweiler-Joseph S, Ruth P & Hofmann F. (2003). Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochemical and biophysical research communications* **300**, 155-160.
- Komalavilas P & Lincoln TM. (1994). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **269**, 8701-8707.
- Komalavilas P & Lincoln TM. (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. *The Journal of biological chemistry* **271**, 21933-21938.
- Krumenacker JS, Hanafy KA & Murad F. (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain research bulletin* **62**, 505-515.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* **10**, 203-209.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lalli J, Harrer JM, Luo W, Kranias EG & Paul RJ. (1997). Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle. *Circulation research* **80**, 506-513.
- Lee E, Hayes DB, Langsetmo K, Sundberg EJ & Tao TC. (2007). Interactions between the leucine-zipper motif of cGMP-dependent protein kinase and the C-terminal region of the targeting subunit of myosin light chain phosphatase. *Journal of molecular biology* **373**, 1198-1212.
- Lin CS. (2004). Tissue expression, distribution, and regulation of PDE5. *International journal of impotence research* **16 Suppl 1**, S8-S10.
- Lin CS, Lin G, Xin ZC & Lue TF. (2006). Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. *Current pharmaceutical design* **12**, 3439-3457.
- Lochner A & Moolman JA. (2006). The many faces of H89: a review. *Cardiovascular drug reviews* **24**, 261-274.
- Lugnier C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & therapeutics* **109**, 366-398.
- MacDonald JA, Borman MA, Muranyi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ & Haystead TA. (2001). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2419-2424.
- MacLennan DH & Kranias EG. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews* **4**, 566-577.
- Magnusson A, Haug LS, Walaas SI & Ostvold AC. (1993). Calcium-induced degradation of the inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor/Ca(2+)-channel. *FEBS letters* **323**, 229-232.
- Margarucci L, Roest M, Preisinger C, Bleijerveld OB, van Holten TC, Heck AJ & Scholten A. (2011). Collagen stimulation of platelets induces a rapid spatial response of cAMP and cGMP signaling scaffolds. *Molecular bioSystems* **7**, 2311-2319.
- Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U & Gawaz M. (2004). Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* **103**, 136-142.
- Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F & Hofmann F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *The Journal of experimental medicine* **189**, 1255-1264.
- Masuda W, Betzenhauser MJ & Yule DI. (2010). InsP3R-associated cGMP kinase substrate determines inositol 1,4,5-trisphosphate receptor susceptibility to phosphoregulation by cyclic nucleotide-dependent kinases. *The Journal of biological chemistry* **285**, 37927-37938.
- Meinecke M, Geiger J, Butt E, Sandberg M, Jahnsen T, Chakraborty T, Walter U, Jarchau T & Lohmann SM. (1994). Human cyclic GMP-dependent protein kinase I beta overexpression increases phosphorylation of an endogenous focal contact-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein without altering the thrombin-evoked calcium response. *Molecular pharmacology* **46**, 283-290.
- Michael SK, Surks HK, Wang Y, Zhu Y, Blanton R, Jamnongjit M, Aronovitz M, Baur W, Ohtani K, Wilkerson MK, Bonev AD, Nelson MT, Karas RH & Mendelsohn ME. (2008). High blood pressure arising from a defect in vascular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6702-6707.

- Mikoshiba K. (2007). IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *Journal of neurochemistry* **102**, 1426-1446.
- Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T & Iino M. (1999). Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP3 receptor subtypes. *The EMBO journal* **18**, 1303-1308.
- Murthy KS & Zhou H. (2003). Selective phosphorylation of the IP3R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *American journal of physiology* **284**, G221-230.
- Nickl CK, Raidas SK, Zhao H, Sausbier M, Ruth P, Tegge W, Brayden JE & Dostmann WR. (2010). (D)-Amino acid analogues of DT-2 as highly selective and superior inhibitors of cGMP-dependent protein kinase I α . *Biochimica et biophysica acta* **1804**, 524-532.
- Noe L, Di Michele M, Giets E, Thys C, Wittevrongel C, De Vos R, Overbergh L, Waelkens E, Jaeken J, Van Geet C & Freson K. (2010). Platelet Gs hypofunction and abnormal morphology resulting from a heterozygous RGS2 mutation. *J Thromb Haemost* **8**, 1594-1603.
- Okamoto R, Ito M, Suzuki N, Kongo M, Moriki N, Saito H, Tsumura H, Imanaka-Yoshida K, Kimura K, Mizoguchi A, Hartshorne DJ & Nakano T. (2005). The targeted disruption of the MYPT1 gene results in embryonic lethality. *Transgenic research* **14**, 337-340.
- Orstavik S, Natarajan V, Tasken K, Jahnsen T & Sandberg M. (1997). Characterization of the human gene encoding the type I α and type I β cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics* **42**, 311-318.
- Payne MC, Zhang HY, Prosdocimo T, Joyce KM, Koga Y, Ikebe M & Fisher SA. (2006). Myosin phosphatase isoform switching in vascular smooth muscle development. *Journal of molecular and cellular cardiology* **40**, 274-282.
- Poulos TL. (2006). Soluble guanylate cyclase. *Current opinion in structural biology* **16**, 736-743.
- Reed RB, Sandberg M, Jahnsen T, Lohmann SM, Francis SH & Corbin JD. (1997). Structural order of the slow and fast intrasubunit cGMP-binding sites of type I α cGMP-dependent protein kinase. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* **31**, 205-217.
- Ruth P, Pfeifer A, Kamm S, Klatt P, Dostmann WR & Hofmann F. (1997). Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase I α . *The Journal of biological chemistry* **272**, 10522-10528.
- Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Hofmann F & Beavo JA. (2002). Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 3310-3317.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)* **239**, 487-491.
- Saqueton CB, Miller RB, Porter VA, Milla CE & Cornfield DN. (1999). NO causes perinatal pulmonary vasodilation through K⁺-channel activation and intracellular Ca²⁺ release. *The American journal of physiology* **276**, L925-932.
- Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M & Ruth P. (2005). Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* **112**, 60-68.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P & Loirand G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway

- inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* **275**, 21722-21729.
- Schinner E, Salb K & Schlossmann J. (2011). Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation. *Platelets* **22**, 217-227.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F & Ruth P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**, 197-201.
- Schlossmann J & Hofmann F. (2005). cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug discovery today* **10**, 627-634.
- Scholten A, Aye TT & Heck AJ. (2008). A multi-angular mass spectrometric view at cyclic nucleotide dependent protein kinases: in vivo characterization and structure/function relationships. *Mass spectrometry reviews* **27**, 331-353.
- Schubert R & Nelson MT. (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends in pharmacological sciences* **22**, 505-512.
- Serysheva, II, Bare DJ, Ludtke SJ, Kettlun CS, Chiu W & Mignery GA. (2003). Structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor revealed by electron cryomicroscopy. *The Journal of biological chemistry* **278**, 21319-21322.
- Sharma AK, Zhou GP, Kupferman J, Surks HK, Christensen EN, Chou JJ, Mendelsohn ME & Rigby AC. (2008). Probing the interaction between the coiled coil leucine zipper of cGMP-dependent protein kinase I α and the C terminus of the myosin binding subunit of the myosin light chain phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **283**, 32860-32869.
- Smith JA, Francis SH, Walsh KA, Kumar S & Corbin JD. (1996). Autophosphorylation of type I β cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP. *The Journal of biological chemistry* **271**, 20756-20762.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological reviews* **83**, 1325-1358.
- Soulsby MD, Alzayady K, Xu Q & Wojcikiewicz RJ. (2004). The contribution of serine residues 1588 and 1755 to phosphorylation of the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by PKA and PKG. *FEBS letters* **557**, 181-184.
- Soulsby MD & Wojcikiewicz RJ. (2007). Calcium mobilization via type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors is not altered by PKA-mediated phosphorylation of serines 916, 934, and 1832. *Cell calcium* **42**, 261-270.
- Surks HK & Mendelsohn ME. (2003). Dimerization of cGMP-dependent protein kinase I α and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cellular signalling* **15**, 937-944.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM & Mendelsohn ME. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . *Science (New York, NY)* **286**, 1583-1587.
- Tada M & Toyofuku T. (1998). Molecular regulation of phospholamban function and expression. *Trends in cardiovascular medicine* **8**, 330-340.
- Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y & Mendelsohn ME. (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature medicine* **9**, 1506-1512.

- Taylor CW, Prole DL & Rahman T. (2009). Ca²⁺ channels on the move. *Biochemistry* **48**, 12062-12080.
- Taylor CW & Tovey SC. (2011). IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a004010.
- Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM & Malik AB. (2002). Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular pharmacology* **39**, 173-185.
- Tu H, Wang Z, Nosyreva E, De Smedt H & Bezprozvanny I. (2005). Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Biophysical journal* **88**, 1046-1055.
- Uchida K, Miyauchi H, Furuichi T, Michikawa T & Mikoshiba K. (2003). Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16551-16560.
- Valtcheva N, Nestorov P, Beck A, Russwurm M, Hillenbrand M, Weinmeister P & Feil R. (2009). The commonly used cGMP-dependent protein kinase type I (cGKI) inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS can activate cGKI in vitro and in intact cells. *The Journal of biological chemistry* **284**, 556-562.
- Varga-Szabo D, Braun A & Nieswandt B. (2009). Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* **7**, 1057-1066.
- Villanueva C & Giulivi C. (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free radical biology & medicine* **49**, 307-316.
- von Werder A, Mayr M, Schneider G, Oesterle D, Fritsch RM, Seidler B, Schlossmann J, Hofmann F, Schemann M, Allescher HD, Schmid RM & Saur D. (2011). Truncated IRAG Variants Modulate cGMP Mediated Inhibition of Human Colonic Smooth Muscle Cell Contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Wagner LE, 2nd, Li WH, Joseph SK & Yule DI. (2004). Functional consequences of phosphomimetic mutations at key cAMP-dependent protein kinase phosphorylation sites in the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *The Journal of biological chemistry* **279**, 46242-46252.
- Wagner LE, 2nd, Li WH & Yule DI. (2003). Phosphorylation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cyclic nucleotide-dependent protein kinases: a mutational analysis of the functionally important sites in the S2+ and S2- splice variants. *The Journal of biological chemistry* **278**, 45811-45817.
- Walter U & Gambaryan S. (2009). cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handbook of experimental pharmacology*, 533-548.
- Wentworth JK, Pula G & Poole AW. (2006). Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *The Biochemical journal* **393**, 555-564.
- Werner K, Schwede F, Genieser HG, Geiger J & Butt E. (2011). Quantification of cAMP and cGMP analogs in intact cells: pitfalls in enzyme immunoassays for cyclic nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*.
- Wilson LS, Elbatarny HS, Crawley SW, Bennett BM & Maurice DH. (2008). Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13650-13655.
- Yuasa K, Michibata H, Omori K & Yanaka N. (2000). Identification of a conserved residue responsible for the autoinhibition of cGMP-dependent protein kinase I α and I β . *FEBS letters* **466**, 175-178.

- Yule DI, Betzenhauser MJ & Joseph SK. (2010). Linking structure to function: Recent lessons from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutagenesis. *Cell calcium* **47**, 469-479.
- Yule DI, Straub SV & Bruce JI. (2003). Modulation of Ca²⁺ oscillations by phosphorylation of Ins(1,4,5)P₃ receptors. *Biochemical Society transactions* **31**, 954-957.
- Zhang Q, Scholz PM, Pilzak A, Su J & Weiss HR. (2007). Role of phospholamban in cyclic GMP mediated signaling in cardiac myocytes. *Cell Physiol Biochem* **20**, 157-166.
- Zhao J, Trehwella J, Corbin J, Francis S, Mitchell R, Brushia R & Walsh D. (1997). Progressive cyclic nucleotide-induced conformational changes in the cGMP-dependent protein kinase studied by small angle X-ray scattering in solution. *The Journal of biological chemistry* **272**, 31929-31936.
- Zhuang S, Nguyen GT, Chen Y, Gudi T, Eigenthaler M, Jarchau T, Walter U, Boss GR & Pilz RB. (2004). Vasodilator-stimulated phosphoprotein activation of serum-response element-dependent transcription occurs downstream of RhoA and is inhibited by cGMP-dependent protein kinase phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 10397-10407.

F.2 Eigene Veröffentlichungen

F.2.1 Poster

Hieke B., Salb K., Schlossmann J. (2009), Subcellular distribution of cGMP signalling proteins in vascular smooth muscle cells of IRAG-KO mice; *4th International Conference on cGMP, cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic implications (Regensburg, Germany)*.

Salb K., Schinner E., Schlossmann J. (2011), Function of IRAG and the phosphorylation of the InsP₃R-I for the NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation; *5th International Conference on cGMP, cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic implications (Halle/Saale, Germany)*.

F.2.2 Vorträge

Vortrag im Rahmen der Forschergruppe 923 (2009):

Dissection of IRAG function in smooth muscle; *Forschergruppe 923: Molecular Dissection of Cardiovascular Functions (Colloquium 25.09.2009, Universität Regensburg)*

Ausgewählter Vortrag bei der 77. Jahrestagung der DGPT (März 2011) im Rahmen des Forums Junge Wissenschaft:

Salb K., Schinner E., Schlossmann J., Function of IRAG and the phosphorylation of the InsP₃R-I for the NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and activation; *77. Jahrestagung der DGPT (Frankfurt am Main, Germany)*.

F.2.3 Originalarbeiten

Desch M., Sigl K., Hieke B., Salb K., Kees F., Bernhard D., Jochim A., Spiessberger B., Höcherl K., Feil R., Feil S., Lukowski R., Wegener JW., Hofmann F., Schlossmann J.; IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res. 2010 Jun 1; 86(3): 496-505. Epub 2010 Jan 15.*

Schinner E., Salb K., Schlossmann J.; Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation. *Platelets 2011; 22(3): 217-227. Epub 2011 Jan 18.*

Salb K., Schinner E., Schlossmann, J., Identification of cGMP-Kinase complexes by affinity chromatography. *InTech: Affinity chromatography (Book chapter); accepted 2011 Sep.*

G. Anhang

G.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: NO/cGMP-Bildung und cGMP-Zielproteine	3
Abb. 2: Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	5
Abb. 3: Trimerer Komplex bestehend aus cGKI β , IRAG und InsP ₃ R-I	7
Abb. 4: Aktivierende und hemmende Signalwege in Thrombozyten	11
Abb. 5: Signalwege von cGKI-Substraten in einer glatten Muskelzelle	15
Abb. 6: Kalibriergerade für die Densitometrie	35
Abb. 7: Bestimmung der Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation	36
Abb. 8: Formel zur Berechnung der Aggregationshemmung	41
Abb. 9: Darstellung von IRAG Δ Int im pcDNA3.1(-)-Vektor	45
Abb. 10: Expression diverser Proteine in WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten	56
Abb. 11: Der trimere Komplex in Thrombozyten: cGMP-Agarose	57
Abb. 12: Nachweis des trimeren Komplexes in Thrombozyten: Co-Immunpräzipitationen	59
Abb. 13: Darstellung der S2-Spleißpositionen des InsP ₃ R-I (Wagner <i>et al.</i> , 2004).....	60
Abb. 14: Spleißvarianten des InsP ₃ R-I in humanen und murinen Thrombozyten.....	61
Abb. 15: Stimulation von murinen Thrombozyten mit steigenden Konzentrationen 8-Br- cGMP	62
Abb. 16: cGMP-stimulierte Phosphorylierung von InsP ₃ R-I und VASP in WT-, IRAG-KO- und IRAG Δ 12-Thrombozyten.....	63
Abb. 17: <i>In-vivo</i> -Stimulation von Thrombozyten mit 8-pCPT-cGMP über 10, 20 und 30 min	65
Abb. 18: Hemmung der cGKI in Thrombozyten durch Rp-8-Br-PET-cGMPS	67
Abb. 19: Hemmung der cGKI in Thrombozyten durch (D)-DT-2.....	68
Abb. 20: Hemmung der PKA in Thrombozyten durch H89	69
Abb. 21: Statistik zur cGMP-stimulierten Phosphorylierung von InsP ₃ R-I, IRAG und VASP in WT-Thrombozyten	70
Abb. 22: <i>in-vivo</i> -Phosphorylierung in Thrombozyten und Autoradiographie.....	72
Abb. 23: cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation.....	74
Abb. 24: InsP ₃ R-I-Phosphorylierung (an Ser1755) in humanen Thrombozyten und in murinem Aortenlysat.....	76
Abb. 25: Zeitabhängige Phosphorylierung von InsP ₃ R-I und VASP in Thrombozyten durch PKA-Stimulation mit cBIMPS	78
Abb. 26: Hemmung von PKA und cGKI in WT-Thrombozyten	79

Abb. 27: Gs/AC/cAMP-vermittelte Phosphorylierung von InsP ₃ R-I und VASP in Thrombozyten	80
Abb. 28: Hemmung der Forskolin- und Iloprost-stimulierten Phosphorylierung in WT-Thrombozyten durch H89	80
Abb. 29: Aufreinigung der InsP ₃ R mittels Heparin-Agarose	82
Abb. 30: Heparin-Agarosefällung nach cBIMPS-Stimulation	83
Abb. 31: Sequenzierung von Proteinen nach cBIMPS-Stimulation und nachfolgender Heparin-Agarosefällung	85
Abb. 32: Interaktion zwischen IRAG-WT oder IRAG Δ Int und cGKI β nach transienter Expression in COS-7-Zellen	86
Abb. 33: Lokalisation von cGKI β und IRAG nach heterologer Expression in COS-7-Zellen	88
Abb. 34: InsP ₃ R-I/II-Fällung mittels cGMP/cAMP-Agarose und Co-Immunpräzipitation ...	90
Abb. 35: Expression des InsP ₃ R-III in Thrombozyten und in WT-Glattmuskelgewebe.....	92
Abb. 36: InsP ₃ R-III: cGMP-Agarosefällungen und Immunpräzipitationen mit Thrombozyten	92
Abb. 37: InsP ₃ R-III: cGMP-Agarosefällungen und Immunpräzipitationen mit Colonlysat ..	93
Abb. 38: Interaktion Phospholamban-cGKI in WT- und IRAG-KO-Thrombozyten	96
Abb. 39: Interaktion zwischen PLB und den cGKI-Isoformen in WT-Thrombozyten	96
Abb. 40: Interaktion zwischen PLB und cGKI in WT- und IRAG-KO-Colongewebe	97
Abb. 41: PLB: Interaktion mit cGKI α/β in murinem WT- und IRAG-KO-Colongewebe	97
Abb. 42: PDE5: InsP ₃ R-I-Immunpräzipitation und cGMP-Agarosefällung mit WT- und IRAG-KO-Thrombozytenlysate und cGMP-Stimulation von WT-Thrombozyten..	100
Abb. 43: PDE5: Bestandteil des Makrokomplexes in murinem Colongewebe?	101
Abb. 44: Interaktion cGKI α -MYPT-1 in murinem WT-Uterus- und WT-Colongewebe	104
Abb. 45: Interaktion cGKI α -MYPT-1 in murinem WT-Uterus- und WT-Colongewebe: Analyse verschiedener Bindungspuffer	105
Abb. 46: MYPT-1: cGMP-Agarosefällungen mit WT- und IRAG-KO-Uteruslysate	105
Abb. 47: Im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene cGKI-Komplexe	118

G.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Arzneistoffe

Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 8: Zusammensetzung Polyacrylamidgele für Tricin-SDS-PAGE

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 10: Konzentration der Protease-Inhibitoren

Tabelle 11: Zusammensetzung Hepespuffer B/C

Tabelle 12: Mastermix für die Reverse Transkription

Tabelle 13: Verwendete Primer zur Herstellung der IRAG Δ Int-cDNA

Tabelle 14: Verwendete Antikörper für Immunzytochemie

G.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Als Erstes Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung innerhalb der letzten Jahre.

Unseren technischen Assistentinnen Katharina, Gertraud, Astrid und Susanne für die bereitwillige Hilfe bei Laborproblemen aller Art. Ich möchte mich vor allem bei Katharina bedanken, die mir beim Klonieren geholfen hat und immer wieder Maxi- und Minipreps für mich durchgeführt hat.

Meinen Kollegen und Kolleginnen Lisa, Andrea, Petra, Steffi, Irena, Franzi, Julia und Johannes am Pharmakologie-Lehrstuhl und den Ex-Kollegen/innen Higgl, Matthias, Meli, Heidrun und Miriam, die mir immer wieder mit zahlreichen Tips und Tricks geholfen haben. Ohne sie wäre der Arbeitsalltag längst nicht so lustig und abwechslungsreich gewesen.

Herrn Dr. Jörg Reinders vom Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg für die schnelle und bereitwillige Sequenzierung der Proteinproben.

Den „Buschauer“ für die Einführung am Densitometer und den Mitarbeitern des Lehrstuhl Thomm für das Erklären des Phospho-Imagers.

Herrn Prof. Frieder Kees, der immer ein offenes Ohr für die Probleme der Doktoranden hatte und uns mit seinen nachmittäglichen Tee-/Kaffeepausen und seinen vielen Witzen immer wieder die Arbeit erleichtert hat.

Julia fürs Korrekturlesen der Doktorarbeit.

Allen anderen, die in irgendeiner Weise zu dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

G.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

