

**Charakterisierung der Funktion des
Guaninnukleotid-Austauschfaktors RhoGEF17
in glatten Muskelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Humanbiologin Julia Rauch

geboren in Malsch

Februar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichst danken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben:

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland für die Vergabe des Themas, für seine Unterstützung und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz. Sie hatte auch nach ihrem Weggang aus Mannheim immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme. Für ihre zahlreichen Anregungen, ihre unermüdliche Unterstützung und ihre Geduld möchte ich Ihr in besonderem Maße danken.

Meinen Kollegen Sabrina Del Galdo, Shalini Gross, Christiane Vettel, Karola Wittig, Christina Würtz, Cleo Aron-Weis, Akos Lorincz, Doris Baltus, Anna Hahn, Kristina Stephan-Schnatz, Heike Rauscher, Zenon Baraniak, Heinz Scheffel, Stefan Gorbey, Yuxi Feng und Irene Rupprecht danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft, für anregende Diskussionen sowie für die zahlreichen „kulinarischen Experimente“, die zur Auflockerung des Arbeitsalltags beitrugen.

Meiner Familie und meinem Freund Rainer Zordick möchte ich für die fortwährende, liebevolle Unterstützung und den motivierenden Zuspruch danken.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	1
II. Abkürzungsverzeichnis	3
III. Abbildungsverzeichnis	8
IV. Tabellenverzeichnis.....	10
1. Zusammenfassung	11
2. Summary.....	12
3. Einleitung.....	13
3.1. Monomere GTPasen.....	13
3.2. RhoGTPasen und ihre Funktion.....	13
3.3. Regulatoren der RhoGTPase-Aktivität	16
3.4. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren	17
3.5. Physiologische Bedeutung der GTPase RhoA für das vaskuläre System.....	18
3.6. Die cGMP/cGKI-vermittelte Regulation glatter Gefäßmuskelzellen	19
3.7. Voraussetzungen und Ziele	22
4. Material und Methoden	25
4.1. Material	25
4.2. Nährmedien und Puffer	27
4.3. Methoden	35
5. Ergebnisse.....	49
5.1. Analyse der endogenen Funktion von RhoGEF17 in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen.....	49
5.1.1. Suppression der Expression von RhoGEF17 in glattmuskulären Zellen der thorakalen Rattenaorta.....	49
5.1.2. Einfluss des Knockdown von RhoGEF17 auf das Actin-Zytoskelett von RASMC.....	50
5.1.3. Untersuchung der Expression von RhoA und Cadherinen nach partieller Depletion von RhoGEF17	51
5.1.4. Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von RhoGEF17-Knockdown-Zellen	52

5.2. Einfluss von cGMP auf isolierte glatte Gefäßmuskelzellen	55
5.2.1. Einfluss von cGMP auf die RhoA-Aktivität in RASMC.....	55
5.2.2. Generierung eines cGKI α -Adenovirus	57
5.2.3. Einfluss der Überexpression der cGKI α auf die Phosphorylierung von VASP.....	58
5.2.4. Einfluss der Überexpression der cGKI α auf die cGMP-induzierte Aktivierung von RhoA in RASMC.....	60
5.3. Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des cGMP/cGKI α / RhoGEF17-Signalweges in RASMC	61
5.3.1. Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von RASMC in An- und Abwesenheit von RhoGEF17	61
5.3.2. Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP-induzierte Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen	64
5.4. Einfluss von RhoGEF17 auf isolierte glatte Muskelzellen der Trachea	66
5.4.1. Inhibition der Expression von RhoGEF17 in glattmuskulären Zellen der Rattentrachea	66
5.4.2. Einfluss von RhoGEF17 auf die Organisation des Actin-Zytoskeletts von RTSMC	66
5.4.3. Einfluss von RhoGEF17 auf die Expression und Aktivität von RhoA und Rac1 in RTSMC	67
5.4.4. Einfluss von RhoGEF17 auf die Proliferation von trachealen glatten Muskel- zellen	69
5.4.5. Einfluss von cGMP auf die RhoA-Aktivität in RTSMC.....	70
6. Diskussion.....	72
6.1. Die Auswirkungen der Reduktion der RhoGEF17-Expression auf vaskuläre und tracheale glatte Muskelzellen	72
6.2. Einfluss von RhoGEF17 auf die Adhäsionsgeschwindigkeit der RASMC	74
6.3. Die cGMP-induzierte RhoGEF17-abhängige Aktivierung von RhoA	76
6.4. Der Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von RASMC in An- und Abwesenheit von RhoGEF17	79
6.5. Der Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP-induzierte Relaxation von RASMC	80
6.6. Ausblick.....	81
7. Literaturverzeichnis	82

II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
8-pCPT-cGMP	para-Chlorophenylthioguanosine-3',5'-cyclic monophosphate
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	engl.: atrial natriuretic peptide
AS	Aminosäure
BNP	engl.: brain natriuretic peptide
BSA	engl.: bovine serum albumin dt.: Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
CaM	Calmodulin
cDNA	engl.: complementary DNA dt.: komplementäre DNS
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CNBr	Cyanogen-Bromid-aktivierte Agarose
CNP	engl.: natriuretic peptide type C
CO ₂	Kohlendioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
d. h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DH	Dbl homolog
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid dt.: Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein dt.: verstärktes grün fluoreszierendes Protein
engl.	englisch
F	Farad
FCS	engl.: fetal calf serum dt.: Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAP	engl.: GTPase activating protein dt.: GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDI	engl.: guanine nucleotide dissociation inhibitor dt.: Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	engl.: guanine nucleotide exchange factor dt.: Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	engl.: Hank's buffered salt solution dt.: Hanks gepufferte Salzlösung
HCl	Salzsäure
HEK	engl.: human embryonic kidney dt.: Humane embryonale Niere
HEK293A-Zellen	adenoviral transformierte humane embryonale Nierenzellen
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRAG	engl.: IP ₃ receptor-associated cGK substrate dt.: IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGK Substrat
K ⁺	Kaliumion
kb	Kilobase (= 1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli (10 ⁻³)

m	Meter
M	Molar (mol/l)
m ²	Quadratmeter
mDia	mammalian homolog of <i>Drosophila diaphanous</i>
min	Minute
MLC	leichte Kette des Myosin II
MLCK	engl.: myosin light chain kinase dt.: Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MLCP	engl.: myosin light chain phosphatase dt.: Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
MOI	engl.: multiplicity of infection dt.: Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
N	Normal
n	Nano (10 ⁻⁹)
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	engl.: nitric oxide dt.: Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
P	Passage
P	Phosphat
PBD	p21-Bindedomäne von Pak1
PBS	engl.: Phosphate buffered saline dt.: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PH	Pleckstrin homolog
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
RASMC	engl.: rat aortic smooth muscle cells dt.: glatte Muskelzellen aus der Rattenaorta
rel.	relativ
RGS2	engl.: regulator of G protein signaling 2
Rho	engl.: Ras homologous dt.: Ras homolog

RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
rpm	engl.: rounds per minute dt.: Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RTSMC	engl.: rat tracheal smooth muscle cells dt.: glatte Muskelzellen aus der Rattentrachea
s.	siehe
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate dt.: Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	engl.: standard error of the mean dt.: Standardfehler
sh	short hairpin
si	small interfering
sm	engl.: smooth muscle dt.: glatter Muskel
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TBS	engl.: Tris buffered saline dt.: Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
U	engl.: Unit dt.: Einheit
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
vs.	versus
w/v	engl.: weight/volume dt.: Masse/Volumen
z. B.	zum Beispiel
Ω	Ohm

Aminosäuren

Cystein, Cys (C)

Glutamin, Gln (Q)

Glutaminsäure, Glu (E)

Glycin, Gly (G)

Histidin, His (H)

L-Isoleucin, Ile (I)

Prolin, Pro (P)

Serin, Ser (S)

Threonin, Thr (T)

Tyrosin, Tyr (Y)

Tryptophan, Trp (W)

L-Valin, Val (V)

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Rho-Familie	14
Abb. 2: Einfluss der RhoGTPasen auf das Actin-Zytoskelett von Swiss 3T3 Fibroblasten	15
Abb. 3: Regulation der RhoGTPase-Aktivität	16
Abb. 4: Ca ²⁺ -abhängige und Ca ²⁺ -unabhängige Kontraktion in glatten Muskelzellen.....	19
Abb. 5: Die NO/cGMP/cGKI-vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen	21
Abb. 6: Nachweis der endogenen Expression von RhoGEF17 in der thorakalen Rattenaorta	23
Abb. 7: Inhibition der cGMP-vermittelten RhoA-Aktivierung in RASMC durch die RhoGEF17-spezifische shRNA	24
Abb. 8: Reduktion der Expression von RhoGEF17 in RASMC durch eine RhoGEF17- spezifische shRNA.....	49
Abb. 9: Einfluss der Reduktion der RhoGEF17-Expression auf das Actin-Zytoskelett von RASMC	50
Abb. 10: Analyse der Expression von RhoA und Cadherinen in RASMC mit vermindertem RhoGEF17-Proteingehalt	52
Abb. 11: Untersuchung des Adhäsionsverhalten von RASMC mit verminderter RhoGEF17-Expression	54
Abb. 12: Untersuchung der RhoA-Aktivität in RASMC nach Stimulation mit cGMP	56
Abb. 13: Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung	57
Abb. 14: Generierung eines cGKI α -Adenovirus.....	58
Abb. 15: Einfluss der cGKI α -Überexpression auf die Phosphorylierung von VASP	59
Abb. 16: Einfluss der cGKI α -Überexpression auf die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC	60
Abb. 17: Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von EGFP- bzw. shRhoGEF17-infizierten RASMC.....	63
Abb. 18: Einfluss einer verminderten RhoGEF17-Expression auf die cGMP-induzierte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen.....	64
Abb. 19: Inhibition der Expression von RhoGEF17 in RTSMC durch das RhoGEF17- spezifische shRNA-Konstrukt.....	66
Abb. 20: Einfluss der Reduktion der RhoGEF17-Expression auf das Actin-Zytoskelett von RTSMC	67
Abb. 21: Analyse der Expression von RhoA und Rac1 in RhoGEF17-Knockdown-Zellen	68

Abb. 22: Untersuchung der basalen RhoA- und Rac1-Aktivität in RTSMC mit verminderter RhoGEF17-Expression	69
Abb. 23: Einfluss des RhoGEF17-Knockdown auf die Proliferation von RTSMC.....	70
Abb. 24: Untersuchung der RhoA-Aktivität in RTSMC nach Stimulation mit cGMP	71

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Feinchemikalien und Zellkultursubstanzen	25
Tab. 2: Sonstige Materialien und Reagenzien	26
Tab. 3: Geräte	27
Tab. 4: Verwendete Primärantikörper	33
Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper	33
Tab. 6: Verwendete Adenoviren	33
Tab. 7: Verwendete Bakterienstämme.....	34
Tab. 8: Zusammensetzung der Collagen-Zell-Suspension	38

1. Zusammenfassung

Die monomere GTPase RhoA und der Signalmediator cGMP sind in vaskulären glatten Muskelzellen entscheidend an der Regulation verschiedener Prozesse wie Kontraktion, Relaxation und Differenzierung beteiligt. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass der Guanin-nukleotid-Austauschfaktor RhoGEF17 in glatten Muskelzellen der Rattenaorta exprimiert wird und dort für die Vermittlung einer cGMP-induzierten Aktivierung von RhoA verantwortlich ist. Basierend auf diesen Daten war es das Ziel dieser Arbeit die basale sowie die cGMP-abhängige Funktion von RhoGEF17 in isolierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta (RASMC) näher zu untersuchen. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Expression von RhoGEF17 auch in trachealen glatten Muskelzellen von Bedeutung ist. Hierfür wurde die endogene Expression von RhoGEF17 mit Hilfe eines shRNA-Adenovirus in den Zellen reduziert. Dabei zeigte sich, dass die Verminderung des RhoGEF17-Proteingehalts sowohl in vaskulären als auch in trachealen glatten Muskelzellen mit einer Veränderung der Zellmorphologie, dem Verlust von Actin-Stressfasern sowie einer verminderten Expression der GTPase RhoA einherging. Zudem führte die shRNA-vermittelte partielle Depletion von RhoGEF17 zu einer signifikanten Verzögerung des Adhäsionsprozesses der glatten Gefäßmuskelzellen sowie zu einer deutlich verringerten Proliferation von trachealen glatten Muskelzellen. In weiteren Untersuchungen konnte auch die bereits in den Vorarbeiten beschriebene cGMP/RhoGEF17-vermittelte Aktivierung von RhoA in vaskulären glatten Muskelzellen reproduziert werden. In diesem Zusammenhang konnte zudem gezeigt werden, dass die adenovirale Überexpression der cGMP-abhängigen Kinase cGKI α , welche für die Aktivierung von RhoGEF17 verantwortlich ist, in den RASMC eine zusätzliche Steigerung der cGMP-induzierten RhoA-Aktivierung hervorruft. In trachealen glatten Muskelzellen führte die Stimulation mit cGMP dagegen nicht zu einer Aktivierung von RhoA. Weiterführende Experimente zur Untersuchung der physiologischen Relevanz des cGMP/cGKI α /RhoGEF17-Signalweges in glatten Gefäßmuskelzellen zeigten schließlich, dass cGMP in RASMC mit verminderter RhoGEF17-Expression keine Relaxation hervorrufen konnte. Die Serum-induzierte Kontraktion wurde durch die partielle Depletion von RhoGEF17 dagegen nicht beeinflusst. Desweiteren hatte cGMP, welches unter Kontrollbedingungen die Adhäsion der isolierten glatten Gefäßmuskelzellen förderte, keinen Einfluss auf die Adhäsionsgeschwindigkeit von RASMC mit reduzierter Expression von RhoGEF17. Zusammengefasst deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass RhoGEF17 in vaskulären sowie trachealen glatten Muskelzellen für die Erhaltung der Zellintegrität von Bedeutung ist und speziell in Gefäßmuskelzellen eine Rolle bei der Vermittlung cGMP-abhängiger Signale übernimmt.

2. Summary

The monomeric GTPase RhoA and the second messenger cGMP play important roles in the regulation of different processes in vascular smooth muscle cells like contraction, relaxation and differentiation. Preliminary work in our group identified the guanine nucleotide exchange factor RhoGEF17 as a mediator of a cGMP-induced activation of RhoA, which is expressed in vascular smooth muscle cells. Based on this data the present work aimed to investigate the function of RhoGEF17 in vascular as well as in tracheal smooth muscle cells. Therefore, the endogenous expression of RhoGEF17 in isolated rat aortic and tracheal smooth muscle cells was suppressed by an adenovirus encoding a specific shRNA targeting RhoGEF17 mRNA. The knockdown of RhoGEF17 resulted in a change of smooth muscle cell morphology, a loss of actin stress fibers and a decreased expression of the GTPase RhoA. Moreover the expression level of RhoGEF17 influenced the attachment of vascular smooth muscle cells to a surface after detachment and affected the proliferation of tracheal smooth muscle cells. The knockdown experiments confirmed the requirement of RhoGEF17 for the cGMP-induced activation of RhoA in vascular smooth muscle cells. Overexpression of the cGMP-dependent kinase cGKI α , which activates RhoGEF17 through phosphorylation, caused an additional increase in the cGMP induced RhoA activity. A stimulation of tracheal smooth muscle cells with cGMP, however, did not elicit an activation of RhoA. Several lines of evidence for a physiological relevance of the cGMP/cGKI α /RhoGEF17 signaling pathway in vascular smooth muscle cells were obtained. Knockdown of RhoGEF17 ablated cGMP-induced relaxation in a 3D culture model of vascular smooth muscle cells whereas the contraction in response to serum was not affected. With regard to cell adhesion, cGMP stimulated the attachment of isolated vascular smooth muscle cells to a surface under control conditions, but had no effect on the adhesion process of cells with a reduced expression of RhoGEF17.

In summary, the data collected indicate that RhoGEF17 is required for the regulation of vascular as well as tracheal smooth muscle cell integrity. Especially in vascular smooth muscle cells, it additionally plays a role as a mediator of cGMP-dependent signaling.

3. Einleitung

3.1. Monomere GTPasen

Zur Familie der monomeren GTPasen, der sogenannten Ras („rat sarcomeric oncogene“)-Superfamilie, gehören über 150 strukturell homologe Proteine, die teilweise evolutionär hochkonserviert sind [1]. Die monomeren GTPasen, die auch als monomere oder „kleine“ G-Proteine bezeichnet werden, sind GTP-bindende Proteine und verfügen außerdem über eine geringe, intrinsische GTPase-Aktivität. In der Zelle liegen die monomeren GTPasen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor: dem inaktiven, GDP-gebundenen sowie dem aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Der Wechsel zwischen den beiden Nukleotid-gebundenen Formen ist mit einer Konformationsänderung verbunden, die es der GTPase ermöglicht im aktiven Zustand mit ihren jeweiligen Effektorproteinen zu interagieren und dadurch zelluläre Prozesse zu beeinflussen [2], [3].

Die GTPasen der Ras-Superfamilie werden, basierend auf strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten, in die folgenden fünf Subfamilien unterteilt: Ras, Rab, Arf, Ran und Rho. Diese Subfamilien sind an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt [1]. So spielen die Proteine der Ras-Familie eine wichtige Rolle bei der Genexpression sowie bei der Regulation der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen [4]. Die Mitglieder der Rab („Ras-like proteins in brain“)- sowie der Arf („ADP-ribosylation factor“)-Familie sind an der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt. Während die Rab-GTPasen für den geordneten Ablauf der einzelnen Schritte, wie die Vesikelbildung, den zielgerichteten Transport und die Exozytose, verantwortlich sind, regulieren die Arf-GTPasen die Ausbildung der Vesikelumhüllung [5], [6]. Die GTPase Ran („Ras-like nuclear“), die das einzige Mitglied der Ran-Familie darstellt, ist in den Transport von RNA und Proteinen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma involviert [7]. Auf die GTPasen der Rho („Ras homologous“)-Familie, die an der Organisation des Actin-Zytoskeletts sowie der Regulation des Zellzyklus und der Genexpression beteiligt sind, wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

3.2. RhoGTPasen und ihre Funktion

Die monomeren GTPasen der Rho-Familie stellen einen wichtigen Zweig der Ras-Superfamilie dar. Bisher wurden 22 humane Gene beschrieben, die für 25 RhoGTPasen kodieren. Die Rho-Familie wird in die folgenden sechs Subfamilien unterteilt: 1.) RhoA (RhoA, B, C); 2.) Rac1 (Rac1, 1b, 2, 3, RhoG); 3.) Cdc42 (Cdc42, Cdc42-G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1); 4.) Rnd (Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3); 5.) RhoBTB (RhoBTB1, 2, 3); 6.) Miro (Miro-1,

Miro-2). Weitere Mitglieder der Rho-Familie sind die Proteine RhoD, Rif und TTF/RhoH, die sich jedoch keiner der oben genannten Subfamilien zuordnen lassen.

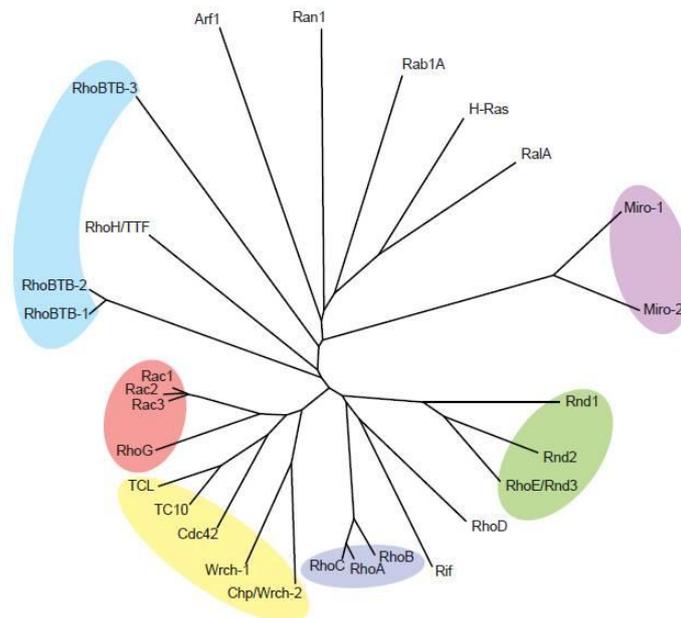


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Rho-Familie. Die sechs Unterfamilien der Rho-Familie: RhoBTB, Rac1, Cdc42, RhoA, Rnd und Miro (Wennerberg et al., 2004).

Die meisten Mitglieder der Rho-Familie sind relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 – 25 kDa, die nur aus einer zentralen GTPase-Domäne und kurzen N- und C-terminalen Sequenzen bestehen [8]. Ihre Besonderheit gegenüber den anderen monomeren GTPasen besteht im Vorhandensein einer sogenannten Rho-Insertdomäne, die innerhalb der GTPase-Domäne liegt und für die Interaktion oder die Aktivierung von Effektoren von Bedeutung zu sein scheint [9], [10].

Die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 wurden in der Vergangenheit besonders intensiv untersucht. Dabei zeigte sich, dass sie in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert sind. Eine besonders wichtige Rolle spielen die RhoGTPasen bei der Organisation des Actin-Zytoskeletts ([11], [12]) und folglich auch bei davon abhängigen Vorgängen wie Zellteilung, Morphogenese, Zellmigration, Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte sowie Pino- und Phagozytose [13-19]. Außerdem sind diese Proteine an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose sowie der Genexpression beteiligt [20-24]. Dabei interagieren sie mit über 30 verschiedenen Effektormolekülen, zu denen zahlreiche Serin/Threonin-Kinasen und Gerüstproteine sowie Lipid-Kinasen, Lipasen, Tyrosin-Kinasen und Oxidasen gehören [25].

Im folgenden Abschnitt wird nun ein kurzer Überblick über die RhoA-, Rac1- und Cdc42-vermittelte Reorganisation des Actin-Zytoskeletts (Abb. 2) und über die daran beteiligten Effektorproteine gegeben.

Erste Anhaltspunkte für die zelluläre Funktion der RhoGTPasen wurden durch die Mikroinjektion von konstitutiv aktivem RhoA in Swiss 3T3 Fibroblasten gewonnen, die eine Veränderung der Zellmorphologie sowie die Ausbildung von Actin-Stressfasern und Fokaladhäsionen auslöste [26], [27]. Actin-Stressfasern sind kontraktile Bündel aus Actin- und Myosin II-Filamenten, welche über Fokaladhäsionen mit der extrazellulären Matrix verbunden sind [28]. Ihre Entstehung erfordert die Rho-vermittelte Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK) und des Formins mDia1 („mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous“). ROCK trägt durch direkte Phosphorylierung sowie indirekt, durch die Inhibition der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase, zur vermehrten Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette der Myosinmoleküle bei und begünstigt damit die Zusammenlagerung von Actin- und Myosin II-Filamenten. Dies erhöht auch deren Kontraktilität [29], [30]. Außerdem fördert ROCK die Stabilisierung der Actinfilamente, indem es die LIM-Kinase aktiviert, die wiederum das Actin-destabilisierende Protein Cofilin phosphoryliert und somit inhibiert [31]. Daneben beschleunigt der Rho-Effektor mDia1 die Actin-Polymerisation, indem er Profilin-gebundene Actin-Monomere an die Spitze entstehender Actin-Filamente leitet [32], [33].

Neben der Rho-Subfamilie beeinflussen auch die GTPasen Rac1 und Cdc42 die Reorganisation des Actin-Zytoskeletts [34], [17]. Beide GTPasen aktivieren über verschiedene Effektorproteine den Arp2/3-Komplex, der die Actin-Polymerisation stimuliert [35], [36]. Im Fall von Rac1 führt dies zur Ausbildung eines Actinfilament-Netzwerks in der Zellperipherie, wodurch Lamellipodien entstehen. Im Gegensatz dazu resultiert die Cdc42-induzierte Actin-Polymerisation in der Bildung von fingerartigen Zellfortsätzen, den Filopodien.

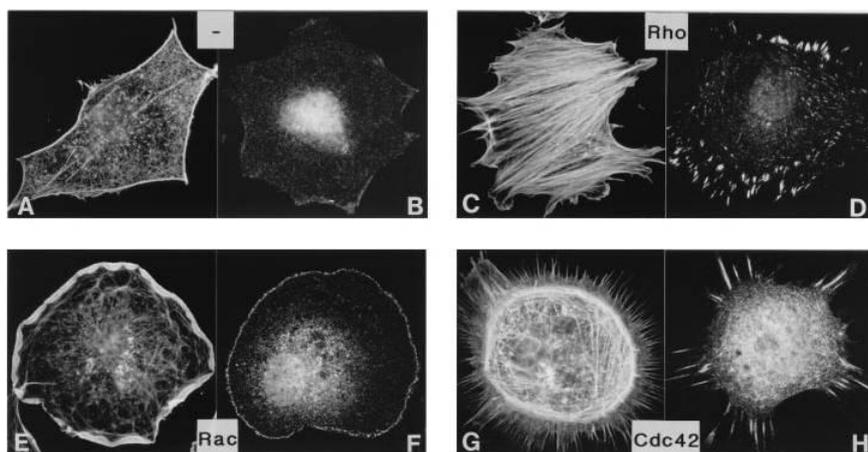


Abb. 2: Einfluss der RhoGTPasen auf das Actin-Zytoskelett von Swiss 3T3 Fibroblasten. A), C), E) und G) Färbung der Actin-Filamente mit Phalloidin; B), D), F) und H) Detektion der Adhäsionskomplexe mit Hilfe eines Vinculin-Antikörpers (Hall, 1998).

3.3. Regulatoren der RhoGTPase-Aktivität

Die Aktivität der RhoGTPasen wird durch drei Klassen regulatorischer Proteine kontrolliert (Abb. 3):

- 1.) Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs; „Rho guanine nucleotide exchange factors“),
- 2.) GTPase-aktivierende Proteine (RhoGAPs; „Rho GTPase-activating proteins“) und
- 3.) Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (RhoGDIs; „Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors“).

Die RhoGEFs aktivieren die RhoGTPasen, indem sie den Austausch des im inaktiven Zustand an die GTPase gebundenen GDP zu GTP katalysieren. Sie werden im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. Die Inaktivierung der RhoGTPasen erfolgt durch die RhoGAPs. Diese regulatorischen Proteine stimulieren die schwache intrinsische GTPase-Aktivität der RhoGTPasen, wodurch es zur Hydrolyse des gebundenen GTP kommt und damit zum Übergang in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand der GTPase [37]. Die inaktive Form wird durch RhoGDIs stabilisiert, welche die GTPasen von der Membran ins Zytosol verlagern und einen basalen Austausch von GDP mit GTP verhindern [38].

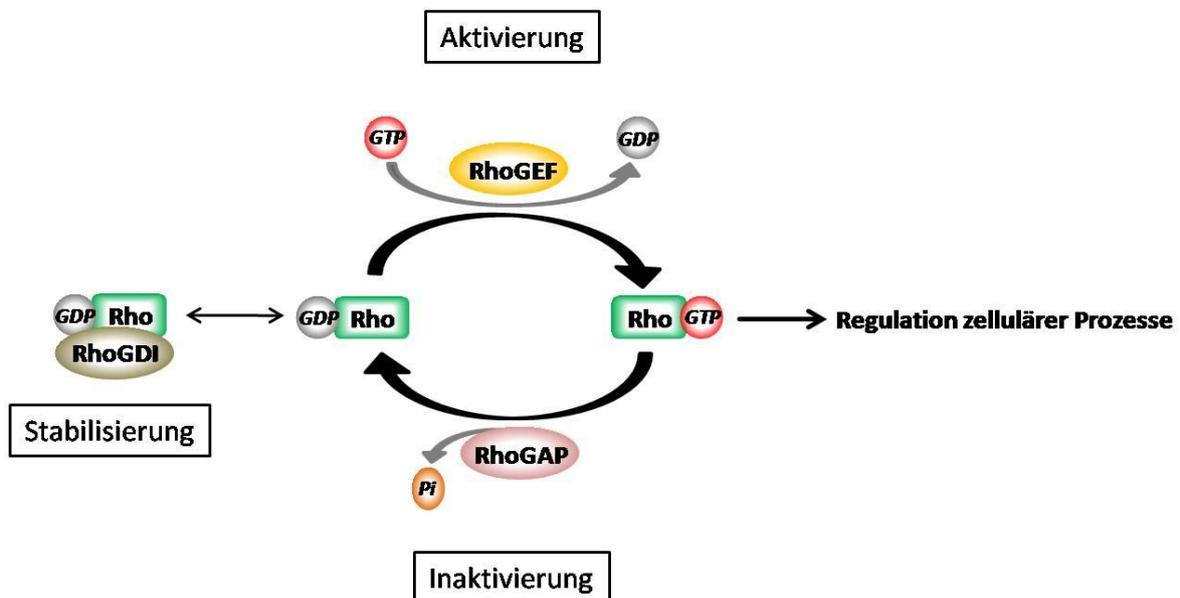


Abb. 3: Regulation der RhoGTPase-Aktivität.

GEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor, GAP: GTPase-aktivierendes Protein; GDI: Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; Pi: anorganisches Phosphat

3.4. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

Das erste Säugetier-RhoGEF, Dbl, wurde 1985 als Onkogen aus einem diffusen B-Zell-Lymphom isoliert [39]. Später konnte gezeigt werden, dass Dbl die humane RhoGTPase Cdc42 aktiviert, indem es den Guaninnukleotid-Austausch katalysiert [40]. Für die GEF-Aktivität des Proteins ist eine etwa 200 Aminosäuren umfassende Region verantwortlich, die als DH-Domäne (Dbl homolog) bezeichnet wird [41], [42]. Mittlerweile wurden 69 humane Proteine identifiziert, die eine DH-Domäne besitzen und aufgrund dieses gemeinsamen Merkmals der Dbl-Proteinfamilie zugeordnet werden [43].

Die DH-Domäne ist durch drei konservierte Regionen (CR1, CR2 und CR3) gekennzeichnet, von denen CR1 und CR3 an der Interaktion mit der RhoGTPase und dem Guaninnukleotid-Austausch beteiligt sind. GEFs katalysieren den Nukleotid-Austausch, indem sie mit der GDP-gebundenen GTPase interagieren und dabei den GDP-GTPase-Komplex destabilisieren. Dadurch kommt es zur Freisetzung des gebundenen GDP. Das GEF stabilisiert dann den Nukleotid-freien Zustand der GTPase und erleichtert damit die Bindung von freiem GTP. Die Spezifität eines GEFs für eine oder mehrere bestimmte GTPasen wird vermutlich durch die Interaktion von nicht-konservierten Regionen innerhalb der DH-Domäne und der GTPase bestimmt [43], [44], [45].

Fast alle Mitglieder der Dbl-Familie weisen zudem eine C-terminal von der DH-Domäne gelegene PH-Domäne (Pleckstrin homolog) auf, die in Abhängigkeit vom jeweiligen GEF unterschiedliche Funktionen übernimmt. So konnte gezeigt werden, dass die PH-Domänen der GEFs Dbs und LARG direkt mit der GTPase interagieren und für einen effektiven Nukleotid-Austausch benötigt werden [46], [47], [48]. Außerdem kann die PH-Domäne wie im Fall von p63RhoGEF auch an der Interaktion des GEFs mit seinem übergeordneten Aktivator beteiligt sein [49]. In anderen Fällen ist die PH-Domäne für die subzelluläre Lokalisation des GEFs verantwortlich [50], [51].

Neben dem charakteristischen DH-PH-Tandemmotiv besitzen die meisten GEFs der Dbl-Familie noch weitere Proteindomänen, welche für die jeweilige Funktion der GEFs von Bedeutung sind.

Da RhoGEFs als Aktivatoren der RhoGTPasen eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse spielen, wird ihre eigene Aktivität ebenfalls durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert. Zu diesen Regulationsmechanismen gehört unter anderem die Inhibition der katalytischen Aktivität durch inter- oder intramolekulare Interaktionen, welche die DH-Domäne blockieren und somit das GEF in einen inaktiven Zustand versetzen. Auch die Aktivierung von GEFs durch Phosphorylierung, Oligomerisierung oder die Interaktion mit anderen Proteinen wurde beschrieben. Außerdem kann die Aktivität auch durch die subzelluläre Lokalisation des GEFs kontrolliert werden. Über die Inaktivierung von GEFs ist bisher nur wenig bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die Aktivierung durch De-

phosphorylierung oder die Auflösung von Protein-Protein- bzw. Protein-Lipid-Interaktionen rückgängig gemacht wird. Auch die Ubiquitinylierung und der anschließende Abbau von GEFs scheint eine Rolle bei der Inaktivierung zu spielen [42], [43], [45].

3.5. Physiologische Bedeutung der GTPase RhoA für das vaskuläre System

Die GTPase RhoA ist an der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse beteiligt (siehe 3.2, Seite 13), so dass es nicht verwunderlich ist, dass sie auch in vaskulären Zellen, wie Endothel- und glatten Muskelzellen, in verschiedene Vorgänge involviert ist und auf diese Weise für die Funktion von Blutgefäßen von Bedeutung ist [52]. So kontrolliert RhoA, im Zusammenspiel mit den RhoGTPasen Rac und Cdc42, die Barrierefunktion des Endothels und ist damit an der Regulation der Permeabilität der Blutgefäße beteiligt [53]. Desweiteren nimmt RhoA auch Einfluss auf den Gefäßtonus, indem es die Kontraktilität vaskulärer glatter Muskelzellen fördert (Abb. 4). Diese Modulation der Kontraktilität erfolgt unabhängig von Calcium und wird durch die Aktivierung eines $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptors oder, wie kürzlich von Würtz und Kollegen gezeigt werden konnte, auch durch die Stimulation eines $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptors ausgelöst. In beiden Fällen kommt es im Anschluss zur Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges. Die aktivierte ROCK phosphoryliert daraufhin die Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase („myosin light chain phosphatase“, MLCP) und inhibiert dadurch deren Aktivität. Auf diese Weise wird die Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosin II („myosin light chain“, MLC) verhindert und somit ihr Phosphorylierungsgrad indirekt erhöht und die Kontraktion gefördert [54], [55], [56].

Dem gegenüber steht die eigentliche Initiierung der Kontraktion durch einen Calcium-abhängigen Signalweg. Die Ca^{2+} -abhängige Kontraktion wird durch eine elektromechanisch- oder Rezeptor-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst. Im ersten Fall führt die Depolarisation der Membran der glatten Muskelzelle zur Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle, wodurch es zum Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle kommt. Der Rezeptor-vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird durch die Bindung eines Agonisten (z. B. Noradrenalin oder Angiotensin II) an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor ausgelöst (Abb. 4). Das an den Rezeptor gekoppelte $G_{q/11}$ -Protein aktiviert dann die membrangebundene Phospholipase C (PLC), die ihrerseits das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, stimuliert IP_3 die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytosol. Dort binden die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen an das Protein Calmodulin (CaM). Der gebildete Ca^{2+} -

Calmodulin-Komplex aktiviert dann die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase („myosin light chain kinase“, MLCK), die daraufhin die leichte Kette des Myosin II phosphoryliert und damit den für die Kontraktion erforderlichen Actin-Myosin-Querbrückenzyklus in Gang setzt [57], [55].

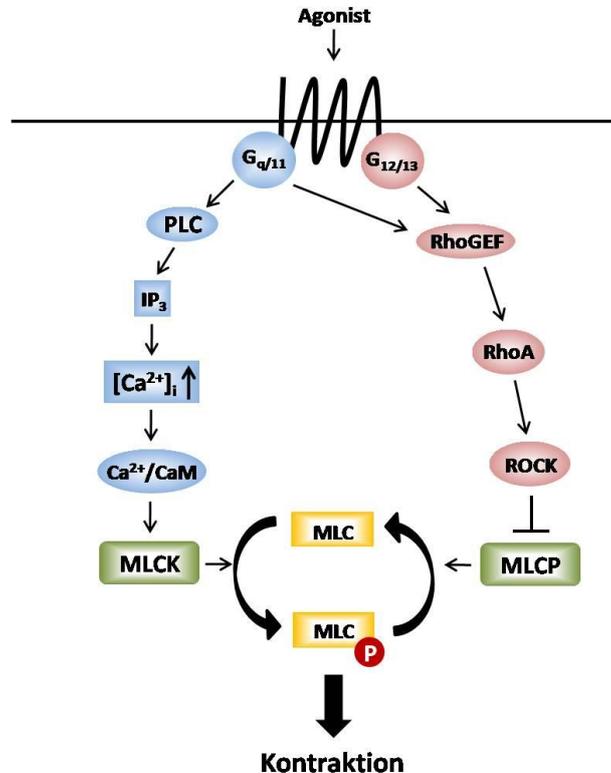


Abb. 4: Ca²⁺-abhängige und Ca²⁺-unabhängige Kontraktion in glatten Muskelzellen.

PLC: Phospholipase C; IP₃: Inositoltrisphosphat; CaM: Calmodulin; MLCK: Myosin-Leichte-Ketten-Kinase; MLC: leichte Kette von Myosin II; GEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor; ROCK: Rho-Kinase; MLCP: Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase; P: Phosphat

Neben der Kontraktion beeinflussen RhoA-abhängige Signalwege auch die Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen [52]. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF („serum response factor“) induziert RhoA die Transkription spezifischer Gene, die für kontraktile Proteine, wie z. B. „ α -sm-Actin“ oder „sm-Myosin-Heavy-Chain“, kodieren. Dadurch fördert RhoA den kontraktilen Phänotyp der glatten Muskelzelle, der dem synthetischen Phänotyp gegenübersteht [58], [59].

3.6. Die cGMP/cGKI-vermittelte Regulation glatter Gefäßmuskelzellen

Den kontraktile Mechanismen in glatten Muskelzellen stehen verschiedene relaxierende Mechanismen gegenüber. In diesem Zusammenhang spielt insbesondere der „second messenger“ cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) eine wichtige Rolle.

Dieses zyklische Nukleotid wird durch die lösliche bzw. die partikuläre Guanylylzyklase aus GTP gebildet. Die lösliche Guanylylzyklase („soluble guanylate cyclase“, sGC) liegt im Zytosol der Zelle vor und wird durch die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert [60]. Die partikuläre Guanylylzyklase („particulate guanylate cyclase“, pGC) ist ein Transmembranprotein. Der extrazelluläre Teil der pGC fungiert als Rezeptor für die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, durch deren Bindung die intrazellulär lokalisierte Guanylylzyklase aktiviert wird [61]. Das gebildete cGMP interagiert dann direkt mit seinen intrazellulären Effektoren, zu denen cGMP-regulierte Ionenkanäle, cGMP-regulierte Phosphodiesterasen sowie die cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehören [62]. Der Abbau von cGMP zu 5'-Guanosinmonophosphat wird durch spezifische Phosphodiesterasen katalysiert [63].

Wie in den meisten Zelltypen, gelten die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs) auch in glatten Gefäßmuskelzellen als wichtigste Mediatoren cGMP-abhängiger Prozesse. Die cGKs, die auch als Proteinkinase G (PKG) bezeichnet werden, gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden durch die Bindung von cGMP aktiviert. Zur Familie der cGKs gehören die cGKI α und I β sowie die cGKII. Die cGKI und die cGKII werden durch zwei verschiedene Gene kodiert, während die α - und β -Isoform der cGKI durch alternatives Splicen des cGKI-Gens entstehen und sich nur durch ihren N-Terminus voneinander unterscheiden. Die cGKI wird überwiegend in der glatten Muskulatur, in Thrombozyten, im Gehirn und in der Niere sowie in geringerem Umfang auch in Kardiomyozten und Endothelzellen exprimiert. Im Allgemeinen werden beide Isoformen der cGKI coexprimiert, wobei je nach Gewebe die α - oder die β -Isoform überwiegen kann. Die cGKII wird im Gehirn, in der intestinalen Mukosa, in der Niere und im Knochen exprimiert [64].

In glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt die cGKI unter anderem die cGMP-abhängige Relaxation, indem sie eine Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie eine Verminderung des Phosphorylierungsgrades der leichten Kette des Myosin II (MLC) bewirkt. Dadurch inhibiert die cGKI sowohl die Ca^{2+} -abhängige als auch die Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion. An der für die Relaxation notwendigen Absenkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sind mehrere cGKI-regulierte Vorgänge beteiligt. So fördert die cGKI die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das Sarkoplasmatische Retikulum, indem sie die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase durch Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins Phospholamban stimuliert [65], [66]. Außerdem phosphoryliert die cGKI das mit dem IP_3 -Rezeptor assoziierte Protein IRAG („ IP_3 receptor-associated cGK substrate“) und hemmt dadurch die IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR [67]. Desweiteren inhibiert die cGKI, durch Aktivierung des regulatorischen Proteins RGS2 („regulator of G protein signaling 2“), auch die $G_{q/11}$ /PLC-vermittelte Bildung von IP_3 [68], [69]. Darüber hinaus scheint die cGKI auch den Ausstrom von intrazellulärem Ca^{2+} in den Extrazellularraum zu erhöhen, indem sie die in der

Plasmamembran lokalisierte Ca^{2+} -ATPase stimuliert [70], [71], [72]. Die cGKI ist auch in die Regulation von K^+ -Kanälen involviert, deren Öffnung zum Ausstrom von K^+ führt und in der Folge eine Hyperpolarisation der Zellmembran hervorruft. Dies wiederum wirkt dem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über spannungsgesteuerte Kanäle entgegen [73], [74], [75].

Die cGKI-vermittelte Absenkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration resultiert letztendlich in einer Reduktion der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Aktivität der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase. Die cGKI greift jedoch auch direkt in die Regulation der MLC ein, indem sie die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase aktiviert und dadurch den dephosphorylierten, inaktiven Zustand der MLC begünstigt [76], [77], [78]. Überdies phosphoryliert die cGKI auch die GTPase RhoA und verhindert dadurch die RhoA/ROCK-vermittelte Inhibition der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase [79].

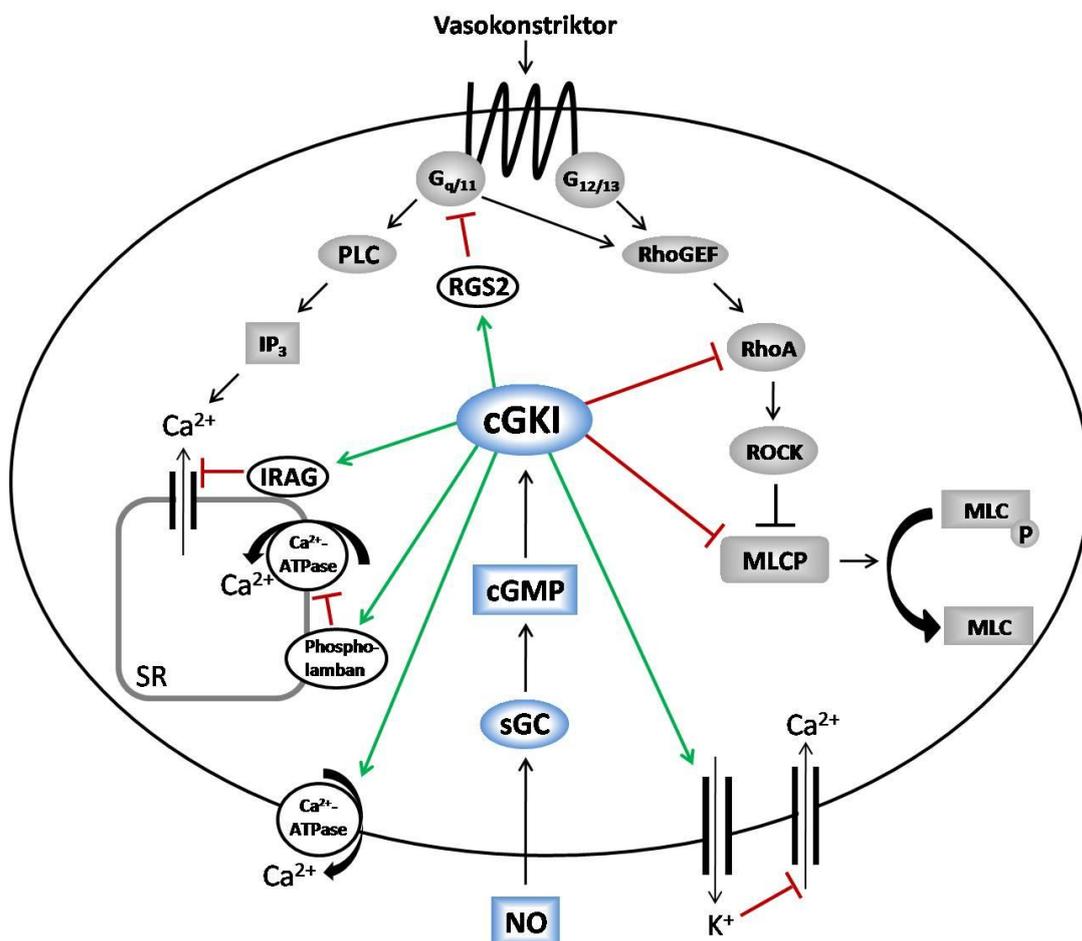


Abb. 5: Die NO/cGMP/cGKI-vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen.

NO: Stickstoffmonoxid; sGC: lösliche Guanylylzyklase; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I; RGS2: „regulator of G protein signaling 2“; PLC: Phospholipase C; IP_3 : Inositoltrisphosphat; IRAG: IP_3 -Rezeptor assoziiertes cGK Substrat; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; GEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor; ROCK: Rho-Kinase; MLCP: Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase; MLC: leichte Kette von Myosin II; P: Phosphat

Neben der Regulation der Relaxation ist die cGKI auch für die Aufrechterhaltung eines kontraktile Phänotyps von glatten Gefäßmuskelzellen von Bedeutung, da sie die Expression von Genen für kontraktile Proteine sowie für Matrixproteine beeinflusst [80], [81], [82].

3.7. Voraussetzungen und Ziele

2002 wurde erstmals ein Teilstück des Guaninnukleotid-Austauschfaktors RhoGEF17, das sogenannte p164-RhoGEF, anhand seiner Homologie zu bereits bekannten GEFs der Dbl-Familie identifiziert und kloniert sowie dessen Spezifität gegenüber der RhoGTPase RhoA charakterisiert [83]. Im Rahmen der Dissertationsarbeit von Marion Mohl (2007, Universität Heidelberg) wurde dieses Fragment komplementiert und die Spezifität des vollständigen Proteins konnte auf RhoB und RhoC erweitert werden. Im Gegensatz zu ersten Vermutungen, dass RhoGEF17 keine PH-Domäne besitzt, konnte mit Hilfe von Modelling-Programmen, welche die dreidimensionale Struktur berücksichtigen, die Existenz einer PH-ähnlichen Domäne abgeleitet werden. Diese scheint jedoch nur eine geringe strukturelle Ähnlichkeit mit den PH-Domänen der meisten GEFs der Dbl-Familie aufzuweisen. Neben dem DH-PH-Tandemmotiv besitzt RhoGEF17 auch eine WD40-ähnliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Die Proteindomänenstruktur von RhoGEF17 ist in Abbildung 8 (siehe 5.1.1, Seite 49) schematisch dargestellt. Zusammen mit den Proteinen RhoGEF10 und GrinchGEF, die eine ähnliche Gesamtstruktur aufweisen und ebenfalls über eine ungewöhnliche PH-Domäne verfügen, wurde RhoGEF17 einer neuen Subfamilie von Rho-spezifischen GEFs innerhalb der Dbl-Proteinfamilie zugeordnet [84].

Ähnlich wie andere GEFs scheint auch RhoGEF17 über autoinhibitorische Domänen zu verfügen, welche die katalytische Aktivität regulieren. Im Rahmen ihrer Dissertation konnte Marion Mohl zeigen, dass diese Autoinhibition durch die Phosphorylierung von RhoGEF17 durch die cGMP-abhängige Kinase I α (cGKI α) aufgehoben wird. Studien mit rekombinant überexprimierten Proteinen in HEK-Zellen ließen den Schluss zu, dass die cGMP-aktivierte cGKI α direkt mit RhoGEF17 interagiert und dessen katalytische Aktivität gegenüber der GTPase RhoA durch die koordinierte Phosphorylierung der Serinreste 43 und 1331 stimuliert. Andere Aktivatoren für RhoGEF17 wurden bisher nicht beschrieben.

In weiteren Untersuchungen konnten schließlich Anhaltspunkte für die Existenz einer cGKI α /RhoGEF17-abhängigen Regulation von RhoA gewonnen werden. Neben dem Nachweis, dass die Stimulation der cGKI α durch verschiedene cGMP-Analoga nur in Anwesenheit von RhoGEF17 zu einer Steigerung der RhoA-Aktivität führt, konnte auch eine cGKI α /RhoGEF17-vermittelte Aktivierung des Rho-Effektors ROCK sowie der Rho-abhängigen Genexpression gezeigt werden. Hierbei stellte sich auch heraus, dass die Aktivierung der ROCK über einen positiven Rückkopplungsmechanismus eine Verstärkung

der RhoGEF17-induzierten RhoA-Aktivierung bewirkt, die vermutlich auf eine ROCK-abhängige Inhibition von Proteinphosphatasen zurückzuführen ist.

Diese positive Regulation der RhoA-Aktivität durch den cGMP/cGKI α -Signalweg stand jedoch im Widerspruch zur Literatur, in der von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Phosphorylierung von RhoA durch die cGK beschrieben wurde, die mit einer Hemmung der RhoA-Aktivität einhergeht [79], [85], [86], [87]. In weiteren Untersuchungen konnte Marion Mohl schließlich zeigen, dass der von ihr beobachtete positive Effekt, den cGMP auf die RhoA-Aktivität ausübte, allein von der Anwesenheit von RhoGEF17 abhing. So konnte in HEK-Zellen, in denen kein RhoGEF17 exprimiert wurde, die in der Literatur beschriebene Hemmung der Serum-induzierten RhoA-Aktivierung durch cGMP/cGKI [86], ebenfalls beobachtet werden. Allerdings ließ sich diese Inhibition allein durch die Expression von RhoGEF17 in eine Stimulation der RhoA-Aktivität umkehren. Zudem konnte gezeigt werden, dass RhoGEF17 in der Lage ist, auch phosphoryliertes RhoA zu aktivieren.

Neben der Charakterisierung von rekombinant exprimiertem RhoGEF17 in HEK-Zellen untersuchte Marion Mohl auch die endogene Expression von RhoGEF17. Mittels RT-PCR, Immunoblot und immunhistologischen Färbungen (Abb. 6) konnte die Expression von RhoGEF17 in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte nachgewiesen werden.

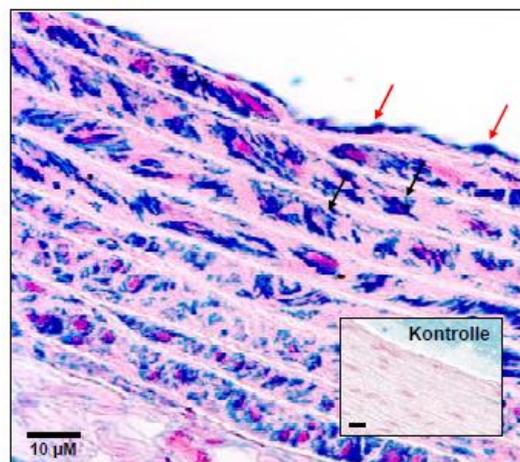


Abb. 6: Nachweis der endogenen Expression von RhoGEF17 in der thorakalen Rattenaorta.

RhoGEF17 wurde in Paraffinschnitten der thorakalen Rattenaorta sowohl im glattmuskulären Gewebe (schwarzer Pfeil) als auch im Endothel (roter Pfeil) mit Hilfe eines RhoGEF17-spezifischen Antikörpers detektiert. Die Kontroll-Färbung (Inset) erfolgte nur mit dem Zweitantikörper. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Dr. Martin Thomas).

Im Einklang mit den in HEK-Zellen erhobenen Daten konnte dann auch in isolierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta (RASMC) eine cGMP-vermittelte Aktivierung von RhoA beobachtet werden. Um die Beteiligung von RhoGEF17 an dieser Signalkaskade in RASMC untersuchen zu können, wurde die endogene Expression des Proteins mit Hilfe eines adeno-

viralen Konstrukts, welches für eine RhoGEF17-spezifische shRNA kodiert, inhibiert. Da die Stimulation von shRhoGEF17-inifizierten RASMC mit cGMP eine Inhibition der RhoA-Aktivierung hervorrief (Abb. 7), konnte davon ausgegangen werden, dass RhoGEF17 auch in isolierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta als Mediator der cGMP-induzierten RhoA-Aktivierung fungiert.



Abb. 7: Inhibition der cGMP-vermittelten RhoA-Aktivierung in RASMC durch die RhoGEF17-spezifische shRNA. RASMC wurden mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Nach 94-stündiger Infektion wurden die Zellen für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert und anschließend die RhoA-Aktivität mittels Effektorpulldown-Assay und nachfolgender Analyse der Präzipitate und Lysate im Immunoblot bestimmt. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marion Mohl).

Basierend auf diesen Daten war es das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, die endogene Funktion von RhoGEF17 sowie die Bedeutung der cGMP-induzierten Aktivierung von RhoGEF17 in glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta zu untersuchen. Zudem sollte untersucht werden, ob die Expression von RhoGEF17 auch in trachealen glatten Muskelzellen von Bedeutung ist.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Tiere

Wistar-Kyoto-Ratten

4.1.2. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden analysenrein, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Calbiochem, Fluka, Roth, Serva, Sigma-Aldrich und Merck bestellt.

4.1.3. Feinchemikalien und Zellkultursubstanzen

8-pCPT-cGMP	Biolog, Bremen
Accutase	PAA, Cölbe
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagen I	BD Bioscience, Heidelberg
Collagenase II	Worthington, Lakewood, USA
Cyanogen-Bromid-aktivierte Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	PAA, Cölbe
Glutathion-Sepharose Beads	GE Healthcare, München
IPTG	PeqLab, Erlangen
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PolyFect	Qiagen, Hilden
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA 0,05 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 1: Feinchemikalien und Zellkultursubstanzen

4.1.4. Sonstige Materialien und Reagenzien

Bio-Safe Coomassie Stain	Bio-Rad, München
Dialyseschlauch	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Größenmarker „DNA-Leitermix“	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Ladepuffer 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
Einfrierbehälter für Zellen	Nalgene
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim
Nitrozellulosemembran Protran	Whatman Schleicher&Schuell, Dassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
Plasmid Mini/Midi Kit	Qiagen, Hilden
Protein-Marker „Roti-Mark Standard“	Carl Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot Invitrogen, Darmstadt New England BioLabs, Frankfurt/Main
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beraneck Laborgeräte, Weinheim
Zellkulturmaterial	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tab. 2: Sonstige Materialien und Reagenzien

4.1.5. Geräte

Gerät	Typ	Firma
Agarosegelelektrophorese-kammer		OWL Scientific
Bakterieninkubator		Memmert, Schwabach
Blotkammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Elektroporator	Gene Pulser	Bio-Rad, München
Feinwaage		Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Imaging-System	AlphamagerTM 2200	Alpha-Innotech, Hessisch Oldendorf
Mikroskope	Axiovert 25 Cell M Imaging System	Zeiss, Göttingen Olympus, Hamburg
Mikroskopkamera	XM 10	Olympus, Hamburg

pH-Meter	Microprocessor pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Multiskan MCC/340 Ultraspec 2000	Titertek Thermo Labsystems Pharmacia Biotech
Schwenkbecher-Rotor für Ultrazentrifuge	SW-27	Beckman, Krefeld
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heraeus, Langenselbold
Ultraschall-Homogenisator	Braun-Sonic 300	Quigley, Rochester, USA
Ultrazentrifuge	L7-55	Beckman, Krefeld
Zellinkubator	HeraCell	Heraeus, Langenselbold
Zentrifugen	Biofuge fresco Centrifuge 54125C Hettich Rotixa/K	Heraeus, Langenselbold Eppendorf, Hamburg

Tab. 3: Geräte

4.2. Nährmedien und Puffer

1.1.1. Medien für die Zellkultur

Wachstumsmedium:

DMEM mit 4,5 g/l Glukose
10 % FCS (v/v)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Serumreduziertes Medium:

DMEM mit 4,5 g/l Glukose
0,5% FCS (v/v)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Serumfreies Medium:

DMEM mit 4,5 g/l Glukose
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Einfriermedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose
10 % FCS (v/v)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin
10 %DMSO (v/v)

1.1.2. Medien für die Bakterienzucht

LB-Medium: 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
→ ad 1 l mit dest. H₂O auffüllen; autoklavieren

2x YT-Medium: 16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
→ ad 1 l mit dest. H₂O auffüllen; autoklavieren

SOC-Medium: 2 % Trypton (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose
→ mit einem 0,45 µm-Filter steril filtrieren

SOB-Medium: 2 % Trypton (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
→ autoklavieren

LB-Platten: 2,8 g Agar-Agar
200 ml autoklaviertes LB-Medium
→ Zusätze: 100 µg/ml Ampicillin oder
33 µg/ml Kanamycin

SOB-Platten: 1,8 % Agar-Agar (w/v)
20 mM Glukose
250 ml autoklaviertes SOB-Medium
→ Zusätze: 100 µg/ml Ampicillin oder
33 µg/ml Kanamycin

4.2.1. Puffer für proteinbiochemische Methoden

Probenvorbereitung für die SDS-PAGE:

RIPA-Puffer: 50 mM Tris
150 mM NaCl
1 % TritonX-100 (v/v)
1 % Natriumdeoxycholat (w/v)
0,1 % SDS (w/v)
1 mM EDTA
→ pH 7,4

SDS-PAGE:

4x SDS-Probenpuffer:
(Laemmli-Puffer) 300 mM Tris
7,5 % SDS (w/v)
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
50 % Glycerin (v/v)
10 % β-Mercaptoethanol (v/v)
→ pH 6,8

4x SDS-Probenpuffer ohne Glycerin: 300 mM Tris
7,5 % SDS (w/v)
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
10 % β -Mercaptoethanol (v/v)
→ pH 6,8

SDS-Elektrophorese-Puffer: 125 mM Tris
1,25 M Glycin
0,5 % SDS (w/v)
→ pH 8,3

Immunoblot:

Immunoblot-Puffer: 25 mM Tris
190 mM Glycin
20 % Methanol (v/v)

10x TBS-Puffer: 100 mM Tris
1,5 M NaCl
→ pH 7,4

TBST-Puffer: 10 % 10x TBS-Puffer (v/v)
0,1 % Tween-20 (v/v)

Ponceau-S-Lösung: 0,2 % Ponceau-S (w/v)
3 % Essigsäure (v/v)

Bestimmung der Proteinkonzentration:

5x Bradford-Reagenz: 125 mg Coomassie G-250
60 ml Ethanol
125 ml 85%ige Phosphorsäure
→ ad 250 ml mit dest. H₂O auffüllen

Kopplung des RhoGEF17-spezifischen Peptids an CNBr-aktivierte Agarose:

Puffer I: 0,1 M NaHCO₃
0,5 M NaCl
→ pH 8,3 – 8,5

Puffer II: 0,1 M NaAc
0,5 M NaCl
→ pH 4,0

Effektorpulldown-Assay:

Einfrierpuffer: 50 mM Tris
0,5 % Triton X-100 (v/v)
150 mM NaCl
5 mM MgCl₂
10 % Glycerin (v/v)
1 mM DTT
0,1 mM PMSF
→ pH 7,5

GST-Fish-Puffer: 50 mM Tris
150 mM NaCl
4 mM MgCl₂
10 % Glycerin (v/v)
1 % Igepal CA630 (v/v)
→ pH 7,4

4.2.2. Puffer für molekularbiologische Methoden**Adenovirus-Aufreinigung:**

Cäsiumchlorid "light": 11,02 g CsCl ad 50 g 1x VSB-Puffer
(= 1,209 g CsCl/ml)

Cäsiumchlorid "heavy": 21,1 g CsCl ad 50 g 1x VSB-Puffer
(= 1,459 g CsCl/ml)

10x VSB-Puffer: 100 mM Tris
1,37 M NaCl
50 mM KCl
10 mM MgCl₂
→ pH 7,4

DNA-Gelelektrophorese:

50x TAE-Puffer: 2 M Tris
5,7 % Essigsäure (v/v)
50 mM EDTA (pH 8,0)

4.2.3. Primärantikörper

Die Primärantikörper wurden in TBST verdünnt.

Primärantikörper gegen	Verdünnung	Firma & Katalognummer	Generiert in:
cGK (PKG), polyklonal	1:1 000	Assay Designs, KAP-PK005	Kaninchen
GAPDH,	1:8 000	Biodesign, H86504M	Maus
Gβ (T-20), polyklonal	1:1 000	Santa Cruz, sc-378	Maus
Pan Cadherin, monoclonal	1:1 000	Sigma-Aldrich, C1821	Maus
Phospho-VASP (Ser239), polyklonal	1:1 000	Cell Signaling, #3114	Kaninchen
Rac1, monoklonal	1:1 000	BD Bioscience, 610650	Maus
RhoA, monoklonal	1:200	Santa Cruz, sc-418	Maus

RhoGEF17 , polyklonal (Kaninchen-Serum; affinitätsaufgereinigt)	1:100	BioGenes, Affinitäts- aufreinigung siehe 4.3.2.7, Seite 42	Kaninchen
β-Actin , monoklonal	1:2 000	Sigma Aldrich, A2228	Maus
VASP , monoklonal	1:1 000	Cell Signaling, #3132	Kaninchen

Tab. 4: Verwendete Primärantikörper

4.2.4. Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper wurden in TBST verdünnt.

Sekundärantikörper gegen	Verdünnung	Firma & Katalognummer	Hergestellt in
anti-Kaninchen-IgG- Peroxidase-Konjugat	1:80 000	Sigma Aldrich, A9169	Ziege
anti-Maus-IgG- Peroxidase-Konjugat	1:10 000	Sigma Aldrich, A9044	Ziege

Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper

4.2.5. Vektoren

- pAdEasy-1
- pAdTrack-CMV

bereitgestellt durch Bert Vogelstein, Baltimore, USA

4.2.6. Adenoviren

Adenovirus	Klonierte Sequenz	Bereitgestellt durch
cGKIα	Bovine cGKIα	
EGFP		Susanne Lutz, Mannheim
shRhoGEF17	5'-CAGTGTCATTGATACAGCCAGCAA-3'	Susanne Lutz, Mannheim

Tab. 6: Verwendete Adenoviren

Das cGKI α - sowie das shRhoGEF17-Adenovirus kodierten zusätzlich für das verstärkt grün-fluoreszierende Protein („enhanced green fluorescent protein“; EGFP).

Die RhoGEF17-spezifische shRNA (shRhoGEF17) wurde in einen modifizierten pAdTrack-Vektor kloniert. Dieser verfügt über einen H1-Promoter, der die Expression der shRNA steuert.

4.2.7. Bakterien

Stamm	Genotyp	Firma
Rosetta™	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm pRARE^2 (Cam^R)$	Novagen, Darmstadt
BJ5183	$endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR(Str^I)$	Stratagene

Tab. 7: Verwendete Bakterienstämme

4.2.8. Enzyme und Kits

Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot Invitrogen, Darmstadt New England BioLabs, Frankfurt am Main
Plasmid Mini Kit Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

4.2.9. Software

Für die Aufnahme von Fluoreszenzbildern und die Bestimmung der Oberfläche von Zellen und Collagenplättchen wurde das Programm Cell M der Firma Olympus verwendet. Die Visualisierung, Dokumentation und Auswertung von Immunoblots und DNA-Gelen sowie die Dokumentation von Coomassie- und Ponceau-S-Färbungen erfolgte mit Hilfe des Programms AlphaEaseFC oder der Quantity one-Software. Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen und die Absorptionsmessungen im Rahmen des MTT-Assay wurde die Ascent Software, Version 2.6 eingesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism. Für die schematische Darstellung von Vektoren wurde das Programm Vector NTI Advance® 11.5.1 von Invitrogen verwendet.

4.3. Methoden

4.3.1. Zellbiologische Methoden

4.3.1.1. Kultivierung von Primärzellen sowie HEK293A-Zellen

Folgende Zelltypen wurden verwendet:

Primärzellen

- Glattmuskuläre Zellen der thorakalen Rattenaorta (RASMC)
- Glattmuskuläre Zellen der Rattentrachea (RTSMC)

Permanente Zelllinie

- Adenoviral transformierte humane embryonale Nierenzellen (HEK293A-Zellen)

Die Kultivierung der Primärzellen wie auch der HEK293A-Zellen erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Zellinkubationsschrank. Als Wachstumsmedium wurde DMEM mit 4,5 g/l Glukose verwendet dem 10 % FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugesetzt wurden.

4.3.1.2. Isolation von thorakalen Aorten sowie Tracheen zur Gewinnung der glattmuskulären Zellen (RASMC bzw. RTSMC)

Die thorakalen Aorten sowie die Tracheen wurden aus 6 – 8 Wochen alten Wistar-Kyoto-Ratten (5 - 15 Tiere) präpariert, die zuvor narkotisiert und durch Dekapitation getötet wurden. Die isolierten Aorten bzw. Tracheen wurden sofort in PBS gelegt, mit einer Pinzette von Fett- und Bindegewebe befreit, anschließend in 4°C kaltes PBS gegeben und auf Eis gelagert bis alle Aorten bzw. Tracheen entnommen waren. Dann wurden die Aorten bzw. Tracheen in einer 0,2%igen Collagenase II-Lösung in 37°C warmem DMEM (ohne Zusätze) mit einer Schere in 2 – 3 mm kleine Ringe geschnitten und anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach 20 – 30 min wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Gewebe ausreichend angedaut waren. Dann wurde der Verdau durch Zugabe eines adäquaten Volumen an Wachstumsmedium abgebrochen und die Ringe dreimal gewaschen. Dazu wurden die Aorten- bzw. Tracheenringe in Wachstumsmedium vorsichtig geschwenkt und bei RT für 5 min mit 150 g abzentrifugiert. Abschließend wurden die Ringe von 3 – 4 Aorten bzw. Tracheen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Um das Auswachsen der Zellen aus den Ringen zu ermöglichen, wurde nur gerade so viel Wachstumsmedium zugegeben, dass die Ringe noch Kontakt mit dem Flaschenboden hatten. Alle 2 -3 Tage wurde das Wachstumsmedium erneuert und das Auswachsen der glattmuskulären Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert.

Etwa 7 Tage nach der Isolation waren ausreichend Zellen vorhanden, um die Aorten- bzw. Tracheenringe aus der Flasche zu entfernen. Diese wurden dann in neue Zellkulturflaschen überführt um weitere Zellen zu gewinnen. Die bereits ausgewachsenen Zellen wurden mit 5 ml Wachstumsmedium pro 25 cm²-Zellkulturflasche noch weitere 2 – 3 Tage bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert und dann, wie in Abschnitt 4.3.1.3 beschrieben, passagiert.

4.3.1.3. Passagieren von Primärzellen (RASMC und RTSMC)

Sobald die Primärzellen eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Das hierfür benötigte Wachstumsmedium, PBS und Accutase wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Für die Subkultivierung wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (5 ml/10 cm-Schale) gespült. Um die Primärzellen vom Schalenboden abzulösen, wurden sie für 15 - 30 min bei 37°C mit Accutase (3 ml/10 cm-Schale) inkubiert. Anschließend wurde ein der Accutase äquivalentes Volumen an Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellen bei RT für 2 min mit 150 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in einem adäquaten Volumen an Wachstumsmedium resuspendiert und nach Bedarf auf neue Zellkulturschalen verteilt. Die Primärzellen wurden bis einschließlich Passage 5 für die weiteren Experimente verwendet.

4.3.1.4. Passagieren von HEK293A-Zellen

Die HEK293A-Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Das hierfür benötigte Wachstumsmedium, PBS und Trypsin-EDTA wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zum Passagieren der Zellkulturen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (5 ml/10 cm-Schale) gespült. Anschließend wurden die HEK293A-Zellen mit 0,05%iger Trypsin-EDTA-Lösung (3 ml/10 cm-Schale) für 3 min bei 37°C inkubiert und dann durch vorsichtiges Klopfen vollständig vom Schalenboden abgelöst. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde schließlich Wachstumsmedium (7 ml/10 cm-Schale) hinzugegeben, die Zellen durch Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette vereinzelt und nach Bedarf auf neue Zellkulturschalen verteilt.

4.3.1.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie unter 4.3.1.3 bzw. 4.3.1.4 beschrieben von der Zellkulturschale abgelöst, vereinzelt und im Anschluss für 2 min mit 150 g bei RT abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (Wachstumsmedium mit 10 % DMSO (v/v)) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter kontrolliert (Absenkung der Temperatur um 1°C/min) auf -60°C herunter gekühlt. Die langfristige Lagerung der eingefrorenen Zellen erfolgte bei -80°C. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen mit 37°C warmem Wachstumsmedium aufgefüllt und mit der Hand angewärmt bis die Zellen vollständig aufgetaut waren. Um eine Schädigung durch das zytotoxische Einfriermedium zu verhindern, wurden die aufgetauten Zellen dann so schnell wie möglich in eine mit Wachstumsmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt.

4.3.1.6. Adenovirale Infektion von Primärzellen

Zunächst wurde die benötigte Menge des jeweiligen rekombinanten Adenovirus in ein adäquates Volumen an serumfreiem Zellkulturmedium gegeben. Dann wurde das Wachstumsmedium von den Primärzellen abgesaugt und durch das virushaltige Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann für 24 - 96 h mit dem rekombinanten Adenovirus inkubiert. Die Primärzellen wurden mit einer MOI (Multiplizität der Infektion: Anzahl der biologisch aktiven Viren pro Zelle) von 100 - 500 infiziert. Da alle verwendeten rekombinanten Adenoviren für das Reporter-gen EGFP kodieren, konnte die Infektionseffizienz, die in der Regel 70 - 100 % betrug, mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kontrolliert werden.

4.3.1.7. Analyse der Zelladhäsion

Für die Analyse der Zelladhäsion wurde je ein well einer 6well-Zellkulturplatte mit 80 – 100 % konfluenten RASMC wie unter 4.3.1.6 beschrieben mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Nach 72 h wurden die infizierten Zellen wie in Abschnitt 4.3.1.3 beschrieben von der Zellkulturschale abgelöst, abzentrifugiert und in Wachstumsmedium resuspendiert.

Für die Versuche ohne cGMP wurde die Hälfte der jeweiligen Zellsuspension in ein well einer 6well-Zellkulturplatte überführt und bei 37°C inkubiert.

Für die Versuche mit cGMP wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dann wurden je $7,5 \times 10^4$ Zellen in Wachstumsmedium, welchem 100 μM 8-pCPT-cGMP bzw. das gleiche Volumen an H_2O als Negativkontrolle zugefügt wurde, zunächst für 30 min bei 37°C in einer stehenden 25 cm^2 -Zellkulturflasche vorinkubiert. Um das Absetzen der Zellen zu verhindern, wurden die Flaschen alle 10 min vorsichtig hin und her bewegt.

Anschließend wurden die jeweiligen Ansätze komplett in je ein well einer 6well-Zellkulturplatte überführt und bei 37°C inkubiert.

Die Adhäsion der Zellen wurde 6, 12 und 24 h nach der Aussaat an einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus dokumentiert. Für jede Bedingung und jeden Zeitpunkt wurden 12 - 17 zufällig ausgewählte Bilder gemacht und die Anzahl an infizierten adhärennten bzw. nicht-adhärennten Zellen pro Bild bestimmt. Die Auswertung der Zelloberfläche erfolgte mit Hilfe der Cell M Software von Olympus.

4.3.1.8. Färbung des Zellkerns und des Actin-Zytoskeletts

Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und mit 3%igem Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Dann wurden die fixierten Zellen dreimal mit PBS gespült und mit 0,1%igem Triton X-100 in PBS für 3 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und für 45 min mit 0,5%igem BSA in PBS bei 4°C blockiert. Nachdem die Zellen erneut zweimal mit PBS gespült wurden, erfolgte die Färbung des Actin-Zytoskeletts mit 0,5 µg/ml TRITC-Phalloidin in PBS, sowie des Zellkerns mit 1 µg/ml DAPI in PBS für mindestens 1 h bei 4°C im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült. Für die Lagerung, die bei 4°C im Dunkeln erfolgte, wurde ausreichend PBS auf die Zellen gegeben, um das Austrocknen zu verhindern. Die Dokumentation der Färbung wurde an einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus durchgeführt.

4.3.1.9. Collagen-Kontraktions-Assay

Um die Kontraktionsfähigkeit von isolierten glatten Gefäßmuskelzellen zu untersuchen, wurde der Collagen-Kontraktions-Assay verwendet. Hierfür wurden RASMC wie unter 4.3.1.6 beschrieben adenoviral infiziert. Nach 48 – 72 h wurden die Zellen wie unter 4.3.1.3 beschrieben vom Schalenboden abgelöst, abzentrifugiert und in Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im nächsten Schritt wurde dann auf Eis eine Collagen-Zell-Suspension vorbereitet. Die Zusammensetzung ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Collagen I (ca. 3 - 4 mg/ml)	1 110 µl
10X HBSS	100 µl
serumfreies DMEM	5 200 µl
NaOH (1N)	10 µl
RASMC in Wachstumsmedium	711 µl (2,5 x 10 ⁵ Zellen)

Tab. 8: Zusammensetzung der Collagen-Zell-Suspension

Einem Teil der Suspension wurden zudem 100 μM 8-pCPT-cGMP hinzugefügt. Die Collagen-Zell-Suspension wurde dann in eine 24well-Zellkulturplatte pipettiert (400 μl /well), deren wells zuvor mit je 300 μl 1%iger Agarose in PBS beschichtet worden waren. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit polymerisiert das Collagen, wodurch stabile Collagen-Zell-Plättchen entstehen. Diese Plättchen wurden mit einem Spatel vorsichtig von der Agarose abgelöst und in eine 6well-Zellkulturplatte überführt (ein Plättchen/well), deren wells mit je 2 ml serumfreiem Medium bzw. Wachstumsmedium mit und ohne 100 μM 8-pCPT-cGMP gefüllt waren. Die Plättchen, die bereits 8-pCPT-cGMP enthielten, wurden in die wells mit Wachstumsmedium und 8-pCPT-cGMP überführt. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Größe der Plättchen mittels eines Imaging-Systems dokumentiert und die Oberfläche mit Hilfe der Cell M Software von Olympus ermittelt.

4.3.1.10. MTT-Assay

Der MTT-Assay wird zur Untersuchung der Proliferation sowie der Vitalität von Zellen angewandt. Das Prinzip des kolorimetrischen Assays beruht auf der Reduktion des gelb gefärbten Tetrazoliumsals MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu blau-violett gefärbtem Formazan [88]. Diese Reduktionsreaktion wird durch zelluläre Enzyme katalysiert und findet somit nur in lebenden, metabolisch aktiven Zellen statt.

Für den MTT-Assay wurden die Zellen zunächst wie unter 4.3.1.6 beschrieben mit dem EGFP- bzw. shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Nach 6 h wurden die infizierten Zellen wie unter 4.3.1.3 beschrieben von der Zellkulturschale abgelöst und abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet in serumfreiem Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden $1,12 \times 10^6$ Zellen entnommen und mit serumfreiem Zellkulturmedium auf 32 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde dann in vier Ansätze mit je 8 ml aufgeteilt. Zu drei Ansätzen wurden jeweils 2, 5 bzw. 10 % Serum (v/v) hinzugegeben. Schließlich wurden die Ansätze in 96well-Zellkulturplatten überführt (100 μl /well; 3 500 Zellen/well) und bei 37°C inkubiert. Jeweils 24, 48, 72 und 96 h nach der Infektion wurde dann ein MTT-Assay durchgeführt. Hierfür wurden 5 mg/ml MTT in PBS gelöst und steril filtriert. Die MTT-Lösung wurde dann direkt zu den Zellen in das im well vorliegende Medium pipettiert (10 μl MTT-Lösung in 100 μl Medium). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und das gebildete Formazan durch Zugabe von 0,04 M HCl in Isopropanol gelöst. Der Ansatz wurde zunächst für 5 min ruhend bei RT inkubiert und anschließend für weitere 5 min bei RT auf einem Horizontalschüttler für Mikrotiterplatten durchmischt. Daraufhin wurde die Absorption des gelösten Formazans bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

4.3.2. Proteinbiochemische Methoden

4.3.2.1. Proteingewinnung aus Zellen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellen wurden mit kaltem PBS (5 ml/6 cm-Zellkulturschale) gespült und mit einem adäquaten Volumen an kaltem RIPA-Puffer vom Schalenboden abgeschabt. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -60°C zwischengelagert. Für die SDS-PAGE wurden die tiefgefrorenen Proben auf Eis aufgetaut. Dann wurden die Zelltrümmer für 15 min mit 16 000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Proben, welche für die immunologische Detektion des Proteins RhoGEF17 vorgesehen waren, wurden für 15 min bei 40°C erwärmt, um das hitzeempfindliche Protein zu schonen.

4.3.2.2. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteingemischen für die Coomassie-Färbung oder die immunologische Detektion einzelner Proteine eingesetzt. Dafür wurden die Proben, wie unter 4.3.2.1 beschrieben, durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE bei 200 V aufgetrennt [89]. Für die Trenngele wurde je nach Größe des nachzuweisenden Proteins eine Acrylamid-Bisacrylamidkonzentration (Verhältnis 37,5:1) von 5 – 15 % verwendet. Die Acrylamid-Bisacrylamidkonzentration der Sammelgele betrug 4 – 5 %. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine durch eine anschließende Coomassie-Färbung oder eine immunologische Detektion mittels Immunoblot sichtbar gemacht. Die Größe der aufgetrennten Proteine wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards bestimmt.

4.3.2.3. Immunoblot (Western Blot)

Beim Immunoblot wurden die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch das Nassblotverfahren in einer Blotkammer bei 100 V. Die Transferzeit betrug 1 h bzw. 1,5 h bei Proteinen, welche ein Molekulargewicht von mehr als 120 kDa aufwiesen. Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit einer 0,2%igen Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt und mit einem Imaging-System dokumentiert. Anschließend wurde die Ponceau-S-Färbung mit TBST entfernt und die Membran für 1 h mit Roti-Block

inkubiert um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nachdem die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler. Die verwendeten Primärantikörper sowie die jeweils eingesetzte Verdünnung sind in Tabelle 4 aufgelistet. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tab. 5) inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und mit einem Chemolumineszenz-Substrat, welches durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase umgesetzt wird, entwickelt. Die Signale wurden mit einem Imaging-System dokumentiert.

4.3.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Probe wurde der Bradford-Test angewandt. Bei dieser Methode bindet der Farbstoff Coomassieblau G-250 an die in der Lösung enthaltenen Proteine. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 365 auf 595 nm [90]. Um eine Konzentrationsbestimmung durchzuführen, wurden die Proben sowie die Proteinstandardreihe (Endkonzentration bei der Messung: 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 µg/µl BSA) in Triplikaten vorgelegt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurden je 200 µl Bradford-Reagenz, welches zuvor 1:4 in destilliertem Wasser verdünnt worden war, zu den Proben und der Standardreihe gegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen.

4.3.2.5. Coomassie-Färbung

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurde die Färbelösung „Bio-Safe Coomassie Stain“ der Firma Bio-Rad verwendet. Das Gel wurde zunächst für 1 h in ausreichend Färbelösung gelegt und auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Dann wurde das Gel bis zur gewünschten Verringerung der Hintergrundfärbung mit Wasser gewaschen. Die angefärbten Proteine wurden mit Hilfe eines Imaging-Systems dokumentiert.

4.3.2.6. Kopplung des RhoGEF17-spezifischen Peptids an Cyanogen-Bromid (CNBr)-aktivierte Agarose

Für die unter 4.3.2.7 beschriebene Aufreinigung des RhoGEF17-spezifischen Antikörpers musste zunächst das Peptid (CSSETVGRDDSTNHLLLRV), gegen welches der Antikörper

gerichtet ist, kovalent an eine Cyanogen-Bromid-aktivierte Agarosesäule gekoppelt werden. Dafür wurden 0,57 g CNBr-aktivierte Agarose zweimal in 50 ml kalter 1 mM HCl für 30 min auf Eis rehydriert. Anschließend wurde die Agarose mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen, für 5 min mit 3 000 g bei 4°C zentrifugiert, schließlich in 5 ml destilliertem Wasser aufgenommen und in eine Säule überführt. Unter Berücksichtigung der Bindungskapazität der Agarose wurden 2,7 mg des Peptids in 4 ml Puffer I aufgenommen. Alle weiteren Schritte wurden dann bei 4°C in einem Kühlraum durchgeführt. Um das Peptid nun an die CNBr-aktivierte Agarose zu koppeln, wurde die Säule zunächst mit 3 ml Puffer I gewaschen. Anschließend wurde sofort das gelöste Peptid auf die Säule gegeben und ü. N. bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule fünfmal mit Puffer I gewaschen. Um noch vorhandene freie reaktive Gruppen zu blockieren, wurde die Säule einmal mit 5 ml 0,2 M Glycinlösung (pH 8,0) gewaschen und anschließend mit dieser Lösung ü. N. bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule abwechselnd je viermal mit 5 ml Puffer I und 5 ml Puffer II gewaschen. Die Säule wurde dann in 5 ml 1 M NaCl mit 0,1 % NaN₃ (w/v) bei 4°C gelagert.

4.3.2.7. Aufreinigung des RhoGEF17-spezifischen polyklonalen Antikörpers

Das RhoGEF17-spezifische Antiserum wurde von der Firma BioGenes durch Immunisierung von Kaninchen mit dem unter 4.3.2.6 beschriebenen Peptid hergestellt. Zur Aufreinigung des erhaltenen Antiserums wurde eine Affinitätschromatographie über eine CNBr-aktivierte Agarosesäule mit kovalent gekoppeltem Peptid durchgeführt (siehe 4.3.2.6). Die Aufreinigung fand bei 4°C in einem Kühlraum statt. Zunächst wurde die Säule fünfmal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden 10 ml des RhoGEF17-spezifischen Antiserums auf die Säule gegeben und ü. N. bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule viermal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde der reversibel an das Peptid gebundene RhoGEF17-spezifische Antikörper mit 100 mM Glycin (pH 2,5) in 10 Fraktionen mit jeweils 1,8 ml eluiert. Daraufhin wurden die Fraktionen, welche den aufgereinigten Antikörper enthielten, mit einer Proteinbestimmung detektiert und zusammengeführt. Eine Probe der vereinigten Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung auf seine Reinheit sowie die Anwesenheit der leichten und der schweren Ketten des Antikörpers überprüft. Der aufgereinigte Antikörper wurde schließlich in 20 % Glycerin (v/v) mit 0,02 % NaN₃ (w/v) aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert. Für die Detektion von RhoGEF17 im Immunoblot wurden 1 – 2 µg/ml des aufgereinigten Antikörpers eingesetzt.

4.3.2.8. Effektorpulldown-Assay

Der Effektorpulldown-Assay wurde eingesetzt, um die Aktivität der GTPasen RhoA und Rac1 in Zelllysaten zu bestimmen. Da die aktive, GTP-beladene GTPase im Gegensatz zur inaktiven GDP-beladenen Form mit hoher Affinität an die GTPase-bindende Domäne (GBD) ihrer jeweiligen Effektormoleküle bindet, kann im Pulldown-Assay die aktivierte, GTP-beladene Form durch Bindung an eine immobilisierte GBD selektiv aus dem Zelllysate präzipitiert werden [91]; [92]. Für die Präzipitation von RhoA-GTP wurde die Rho-Bindedomäne von Rhotekin (Rhotekin-RBD) als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein in *E. coli* Rosetta-Bakterien exprimiert und anschließend an Glutathion-Sepharose gebunden. Für die Präzipitation von Rac1-GTP wurde GST-PBD (p21-Bindedomäne von Pak1) verwendet.

Im Folgenden wird nun zunächst die Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine sowie ihre Kopplung an die Glutathion-Sepharose beschrieben. Im Anschluss wird dann die Durchführung des Effektorpulldown-Assays genauer erläutert.

Für die Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde zunächst eine Übernachtskultur der transformierten *E. coli* Rosetta-Bakterien in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Am nächsten Tag wurden 8 ml aus der Übernachtskultur in 800 ml frisches 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und bei 37°C und 250 rpm inkubiert bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 erreichte. Dann wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 800 µl 1 M IPTG induziert und die Kultur für 1 h bei RT und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min mit 3 000 g bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 10 - 20 ml kaltem PBS resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurde die Suspension dann auf Eis sechsmal für jeweils 30 sec mit Ultraschall behandelt. Daraufhin wurde der Ansatz für 10 min mit 20 000 g bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 800 µl Glutathion-Sepharose zweimal in jeweils 10 ml kaltem PBS gewaschen. Dann wurde der Überstand des zentrifugierten Bakterienlysats für 1 h schüttelnd auf Eis mit der Glutathion-Sepharose inkubiert, um die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose zu ermöglichen. Danach wurde der Ansatz für 2 min mit 1 000 g bei 4°C zentrifugiert. Die Glutathion-Sepharose, an welche nun die GST-Fusionsproteine gebunden waren, wurde dann zweimal in jeweils 20 ml kaltem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 1 ml abgenommen. Die Glutathion-Sepharose wurde mit dem restlichen Überstand resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung abgeschätzt. Dann wurde der Ansatz entsprechend aliquotiert, jedes Aliquot mit je 100 µl Einfrierpuffer versetzt und bis zum Gebrauch bei -60°C gelagert.

Für den Effektorpulldown-Assay wurden die Zellen zunächst je nach Versuch entsprechend vorbehandelt. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgeschüttet und die Zell-

kulturschalen senkrecht auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden dann bei 4°C in einem Kühlraum durchgeführt. Hier wurde das restliche Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe vollständig abgesaugt und die Zellen in einem adäquaten Volumen an GST-Fish-Puffer abgeschabt und die Lysate für 5 min mit 16 000 g bei 4°C abzentrifugiert. Um den Gesamtgehalt der GTPase RhoA in der Probe mittels Immunoblot zu bestimmen, wurden 60 µl Überstand entnommen und später mit 4x SDS-Probenpuffer ohne Glycerin versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Der restliche Überstand wurde vollständig mit einer adäquaten Menge an GST-Fusionsproteinen (40 - 50 µg), welche an Glutathion-Sepharose gebunden waren, für 1 h auf Eis in einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Proben für 2 min mit 16 000 g bei 4°C abzentrifugiert, dreimal mit jeweils 1 ml GST-Fish-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Zum Abschluss wurde der Überstand nahezu vollständig abgesaugt und die Proben dann mit 5 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

4.3.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.3.1. Herstellung von rekombinanten Adenoviren

Die Herstellung von rekombinanten Adenoviren erfolgte mit Hilfe des AdEasy-1-Systems [93], [94]. Hierbei wird der adenovirale Vektor pAdEasy-1 mit einem Shuttle-Vektor, der für das gewünschte Zielgen kodiert, rekombiniert. Der pAdEasy-1 kodiert für einen Großteil des Genoms des humanen Adenovirus Serotyp 5 (Ad 5), jedoch nicht für die Gene der Transkriptionseinheit E1, die für die Replikation der Viren essentiell sind. Aus diesem Grund sind die rekombinanten Adenoviren zwar infektiös, aber replikationsdefizient.

In den folgenden Abschnitten wird nun die Generierung des rekombinanten adenoviralen Vektors, die Produktion der Viren in HEK293A-Zellen sowie die anschließende Aufreinigung der infektiösen Viruspartikel genauer beschrieben.

Zunächst wurde die cDNA für das gewählte Zielgen, in diesem Fall die cGKI α , in den Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV kloniert. Hierfür wurde die cGKI α -cDNA durch einen präparativen Verdau mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI aus dem pcDNA3.1-Vektor ausgeschnitten und anschließend mit dem ebenfalls KpnI/XbaI-verdauten Vektor pAdTrack-CMV ligiert. Das Ligationsprodukt pAdTrack-CMV-cGKI α wurde dann mit dem Restriktionsenzym PmeI linearisiert. Danach wurden 100 ng des linearisierten Vektors zusammen mit 1 µg des pAdEasy-1-Vektors, wie unter 4.3.3.3 beschrieben, in BJ5183-Bakterien transformiert. In den Bakterien findet dann eine homologe Rekombination der beiden Vektoren statt, bei der es unter anderem zur Übertragung des Zielgens auf das Virusgenom kommt. Da zudem ein Austausch der Ampicillin-Resistenz des pAdEasy-1-Vektors gegen die Kanamycin-Resistenz

des pAdTrack-CMV-Vektors erfolgt, konnten die Bakterien, welche den rekombinierten Vektor enthielten, mit dem Antibiotikum Kanamycin selektiert werden. Die rekombinierten Vektoren wurden dann durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym PacI analysiert. Bei erfolgreich rekombinierten Vektoren konnte nach dem PacI-Verdau ein ca. 30 kb großes Fragment sowie ein kleines Fragment mit 3 bzw. 4,5 kb im Agarosegel detektiert werden. Die Größe des kleinen Fragments hängt davon ab, ob die homologe Rekombination zwischen den jeweiligen „ori“-Regionen oder den homologen Regionen des linken und rechten Arms der beiden Ursprungsvektoren stattfindet.

Im nächsten Schritt erfolgte nun die Produktion der rekombinanten Adenoviren in HEK293A-Zellen. Diese adenoviral transformierte Zelllinie exprimiert die für die Replikation der Viren benötigten Gene der E1-Region des adenoviralen Genoms und ermöglicht somit die Erzeugung infektiöser Viruspartikel [95]. Bei Zellen, wie z. B. glatten Muskelzellen, die den Replikationsdefekt nicht ausgleichen können, führt eine Infektion mit den replikationsdefizienten Adenoviren dagegen nicht zur Entstehung neuer infektiöser Viren. Für die Produktion der Viren in den HEK293A-Zellen wurde der rekombinierte Vektor mit dem Restriktionsenzym PacI linearisiert. Dann wurde eine 6 cm-Zellkulturschale mit HEK293A-Zellen mit 4 µg des linearisierten Vektors wie unter 4.3.3.2 beschrieben transfiziert. Da der rekombinierte Vektor auch für das verstärkt grün-fluoreszierende Protein EGFP kodiert, konnte der Verlauf der Transfektion und später auch der Infektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet werden. Nach ca. 2 – 3 Wochen wurden die nun vollständig infizierten Zellen mit Medium von der Zellkulturschale ab gespült, dann dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren um die Zellen aufzubrechen und die Viren freizusetzen. Das Lysat wurde dann für 5 min mit 1 000 g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der virushaltige Überstand auf eine 10 cm-Zellkulturschale mit HEK293A-Zellen gegeben. Sobald alle Zellen infiziert waren, wurden diese wie bereits beschrieben von der Schale ab gespült, in flüssigem Stickstoff lysiert und zentrifugiert. Dann wurden jeweils 1 - 2 ml des virushaltigen Überstands auf zwei 15 cm Schalen mit HEK293A-Zellen gegeben. In der letzten Produktionsrunde wurde der virushaltige Überstand dieser beiden Schalen dann auf zwanzig 15 cm-Zellkulturschalen mit HEK293A-Zellen verteilt. Um am Ende einen möglichst hohen Virustiter zu erhalten, wurden die Zellen geerntet bevor die Lyse durch die produzierten Viren einsetzte. Die infizierten, noch intakten HEK293A-Zellen wurden von der Zellkulturschale ab gespült, in 50 ml-Röhrchen überführt und für 5 min mit 150 g bei 20°C zentrifugiert. Anschließend wurden alle Zellpellets in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt, in 30 – 40 ml PBS resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 5 -7 ml PBS aufgenommen, dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich für 5 min mit 2 600 g bei 4°C abzentrifugiert. Nun konnte die Aufreinigung der rekombinanten Adenoviren mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgen. Dafür wurde ein zweistufiger

Cäsiumchlorid-Gradient (1,209 und 1,459 g CsCl/ml) in einem 17 ml-Ultrazentrifugationsröhrchen vorbereitet. Anschließend wurde der virushaltige Überstand auf den Gradienten pipettiert und mit 87 000 g in einer L7-55 Beckmann-Ultrazentrifuge mit einem SW-27 Schwenkbecher-Rotor bei 4°C ü. N. zentrifugiert. Die rekombinanten Adenoviren sammeln sich dann aufgrund ihrer Dichte an der Phasengrenze zwischen den beiden CsCl-Lösungen und erscheinen als weißlich-blaue Interphase. Etwas oberhalb davon kann oftmals eine weitere weiße Bande detektiert werden, in der sich Viruskapside, die keine DNA enthalten, angesammelt haben. Die Viren wurden mit einer Spritze abgesaugt, in einen Dialyseschlauch überführt und zunächst für 6 h und anschließend ü. N gegen das 1 000-fache Volumen an PBS dialysiert. Zum Abschluss erfolgte eine 4 – 6-stündige Dialyse gegen das 1 000-fache Volumen an 1x VSB-Puffer. Dann wurden die rekombinanten Adenoviren im Verhältnis 1:2 in einer 90%igen Glycerinlösung (v/v) in 1x VSB-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.3.3.2. Transiente Transfektion von HEK293A-Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNA in HEK293A-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz PolyFect der Firma Qiagen. Für die transiente Transfektion einer 6 cm-Zellkulturschale mit 70 – 80 % konfluenten Zellen wurden 4 µg DNA eingesetzt. Zunächst wurde die in destilliertem Wasser gelöste DNA mit DMEM (ohne Zusätze) auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 40 µl PolyFect-Reagenz hinzugegeben, der Ansatz durchmischt und 10 min bei RT inkubiert, um die Komplexbildung zwischen der DNA und dem PolyFect-Reagenz zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt und durch serumreduziertes Medium (0,5 % FCS (v/v)) ersetzt. Schließlich wurde der Transfektionsansatz mit 1 ml serumreduziertem Medium gemischt und tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Diese wurden dann bei 37°C inkubiert.

4.3.3.3. Transformation von BJ5183-Bakterien

Die Transformation der BJ5183-Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Dafür wurden 100 ng des linearisierten pAdTrack-CMV-Vektors zusammen mit 1 µg des pAdEasy-1-Vektors vorsichtig mit 50 µl elektrokompenten BJ5183-Bakterien gemischt und der Ansatz in eine kalte Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand pipettiert. Die Küvette wurde in einen Elektroporator (Gene Pulser) gestellt und ein Puls mit den Einstellungen 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω appliziert. Daraufhin wurden sofort 200 µl SOC-Medium, das zuvor auf 37°C erwärmt wurde, direkt in die Küvette zu den Bakterien pipettiert. Dann wurde der

Ansatz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 40 min bei 37°C in einem Heizblock geschüttelt. Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes auf einer Selektions-SOB-Agar-Platte mit 33 µg/ml Kanamycin ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

4.3.3.4. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zunächst wurde eine Übernachtskultur der Bakterien in 5 ml bzw. 150 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (33 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin) angesetzt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte je nach Größe des Ansatzes mit dem Plasmid Mini bzw. Midi Kit der Firma Qiagen. Hierbei wird die DNA über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Im Anschluss an die Präparation wurde die DNA mittels Restriktionsverdau (siehe 4.3.3.5) und horizontaler Agarosegelelektrophorese (siehe 4.3.3.6) überprüft.

4.3.3.5. Restriktionsverdau von DNA mittels Endonukleasen

Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen (Endonukleasen), die eine spezifische, meist palindrome Sequenz aus vier bis acht Basenpaaren in einem doppelsträngigen DNA-Molekül erkennen und den DNA-Strang ausschließlich an dieser Erkennungssequenz hydrolytisch spalten, kann ein DNA-Molekül in einzelne Fragmente mit genau definierter Fragmentlänge zerlegt werden [96].

Für einen analytischen Restriktionsverdau (20 µl Ansatz) wurden 1 – 3 µg DNA eingesetzt, für einen präparativen Verdau (100 µl Ansatz) 15 – 20 µg DNA. Es wurden 1 – 10 U Enzym pro 1 µg DNA verwendet und der Ansatz für mindestens 1 h inkubiert. Der Reaktionspuffer sowie die Inkubationstemperatur wurden den Herstellerangaben entsprechend auf das jeweilige Enzym abgestimmt. Der Verdau wurde durch eine horizontale Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und überprüft.

4.3.3.6. DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt [97]. Dabei wandern die DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld durch eine Agarosematrix und werden der Größe nach aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele, deren Agarosegehalt größtenteils 1 % (w/v) betrug, wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgeköcht bis sie vollständig gelöst war. Sobald die Agaroselösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben. Dieser Farbstoff ermöglicht später die

Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente mittels UV-Licht. Nachdem das Agarosegel erstarrt war, wurde die Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt bis das Gel bedeckt war. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und neben einem Größenmarker auf das Gel geladen. Dann erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 120 V. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente mittels UV-Licht (320 nm) und die Dokumentation wurde mit einem Imaging-System durchgeführt.

4.3.3.7. DNA-Fällung

Zunächst wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Na⁺/Acetat⁻-Lösung (pH 5,2) versetzt. Anschließend wurden 0,7 Volumen Isopropanol hinzugegeben, der Ansatz gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde die Probe für 20 min mit 16 000 g bei RT zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen und anschließend für 5 min mit 16 000 g bei RT abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in einem adäquaten Volumen destillierten Wassers gelöst.

5. Ergebnisse

5.1. Analyse der endogenen Funktion von RhoGEF17 in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen

5.1.1. Suppression der Expression von RhoGEF17 in glattmuskulären Zellen der thorakalen Rattenaorta

Um die Bedeutung von RhoGEF17 in glatten Gefäßmuskelzellen zu charakterisieren, sollten zunächst mögliche Auswirkungen einer verminderten Expression des endogenen Proteins in isolierten glattmuskulären Zellen der thorakalen Rattenaorta (RASMC) untersucht werden.

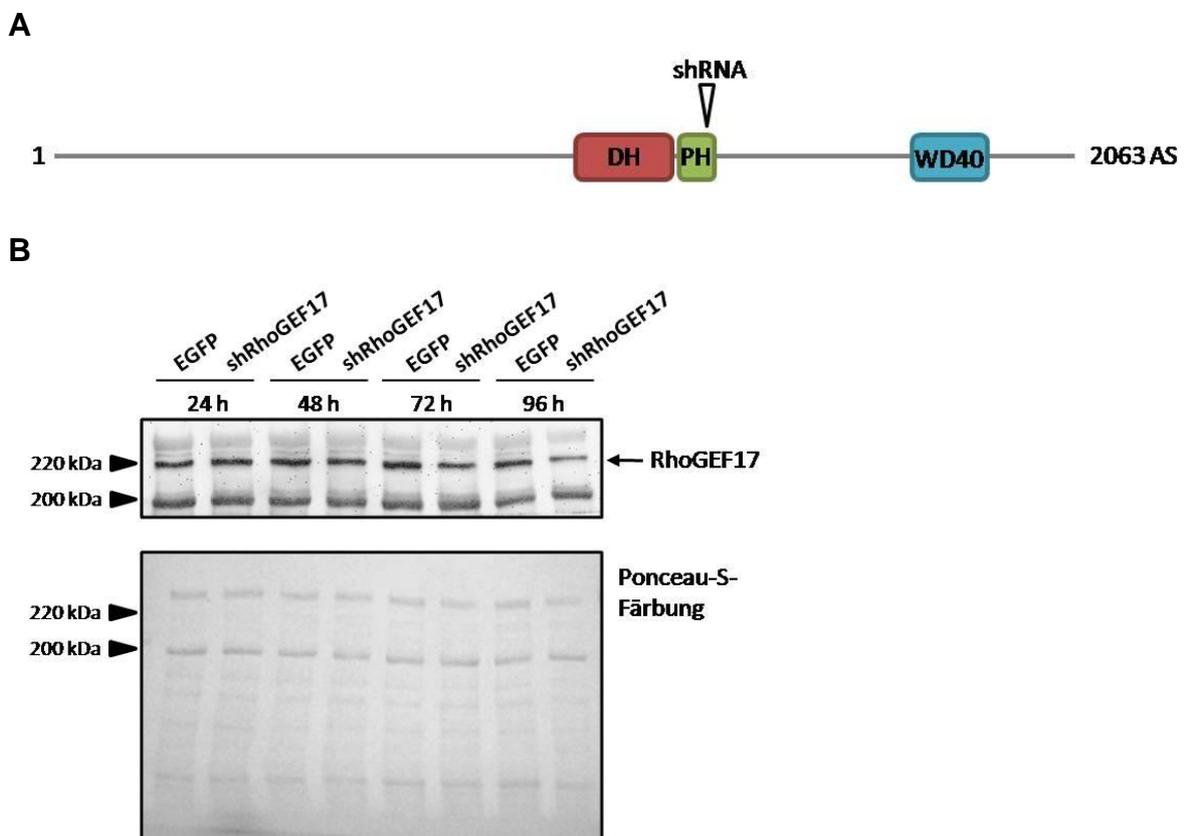


Abb. 8: Reduktion der Expression von RhoGEF17 in RASMC durch eine RhoGEF17-spezifische shRNA. A) Analyse der RhoGEF17-Proteinsequenz mit Lokalisation der shRNA-Zielsequenz in der respektiven mRNA. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Gene3D. DH = Dbl-homologe Domäne, PH = Pleckstrin-homologe Domäne, WD40 = Tryptophan-Asparaginsäure-haltige Domäne. B) RASMC wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA (shRhoGEF17) kodieren, infiziert. Um die Effektivität des shRNA-Konstrukts zu überprüfen, wurden die Zellen 24, 48, 72 und 96 h nach der Infektion mit Lysepuffer abgeschabt und die Expression des ca. 220 kDa großen RhoGEF17-Proteins mit Hilfe eines RhoGEF17-spezifischen Antikörpers im Immunoblot detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot mit der dazugehörigen Ponceau-S-Färbung.

Zur Unterdrückung der endogenen Expression von RhoGEF17 wurde das bereits in den Vorarbeiten verwendete rekombinante Adenovirus (siehe 3.7, Seite 22), welches für eine RhoGEF17-spezifische „short hairpin“-RNA (shRNA) kodiert, eingesetzt. Wie der Zeitverlauf in Abbildung 8 B zeigt, führte die Infektion der RASMC mit diesem Adenovirus innerhalb von 96 h zu einer deutlichen Reduktion der RhoGEF17-Expression (siehe auch Abbildung 10, Seite 52).

5.1.2. Einfluss des Knockdown von RhoGEF17 auf das Actin-Zytoskelett von RASMC

Im Verlauf der Infektion von RASMC mit dem shRhoGEF17-Adenovirus konnte parallel zur Reduktion der RhoGEF17-Expression auch eine morphologische Veränderung der Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden: RASMC mit verminderter RhoGEF17-Expression verloren ihre typische gestreckte Gestalt, rundeten sich ab und nahmen schließlich eine „dendritische“ Zellform an.

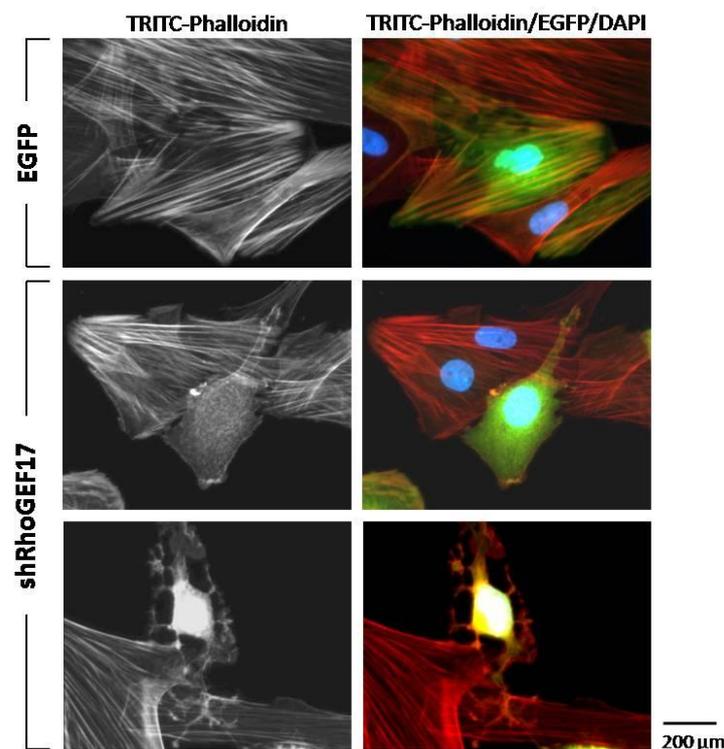


Abb. 9: Einfluss der Reduktion der RhoGEF17-Expression auf das Actin-Zytoskelett von RASMC. RASMC wurden für 72 h in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert. Die Färbung der Actinfilamente erfolgte mit TRITC-Phalloidin und ist als Graustufenbild dargestellt. Die farbigen Bilder zeigen die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von TRITC-Phalloidin (rot), EGFP (grün) und der Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Infizierte Zellen fluoreszieren grün, da sie das Reportergen EGFP exprimieren.

Vergrößerung: 400x.

Da dieser Vorgang auf eine Reorganisation des Zytoskeletts hindeutete, wurde im Folgenden eine Färbung der Actinfilamente mittels TRITC-Phalloidin durchgeführt (Abb. 9). Hierbei zeigte sich, dass Zellen, die für 72 h mit dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert worden waren, im Gegensatz zu Kontroll- und nicht-infizierten Zellen, keine Actin-Stressfasern ausbildeten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass RhoGEF17 möglicherweise eine Rolle bei der Organisation des Actin-Zytoskeletts von glatten Gefäßmuskelzellen spielt.

5.1.3. Untersuchung der Expression von RhoA und Cadherinen nach partieller Depletion von RhoGEF17

Die GTPase RhoA ist ein wichtiger Regulator der Organisation des Actin-Zytoskeletts und für die Ausbildung von Stressfasern verantwortlich [98]. Da die Reduktion der RhoGEF17-Expression in RASMC den Verlust von Stressfasern bewirkte, wurde im nächsten Schritt der Einfluss des RhoGEF17-Knockdown auf die Expression der GTPase RhoA in RASMC untersucht. Die in Abbildung 10 gezeigte Immunoblot-Analyse ergab, dass der Abfall der RhoGEF17-Expression mit einer zeitversetzten Abnahme der RhoA-Expression einherging. So führte die RhoGEF17-spezifische shRNA nach 72 h zu einer signifikanten, ca. 34%igen Reduktion des RhoGEF17-Proteingehalts im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise konnte zu diesem Zeitpunkt auch eine um etwa 17 % verringerte Expression von RhoA nachgewiesen werden. Statistisch signifikant wurde die Reduktion von RhoA jedoch erst nach weiteren 24 h in denen der Proteingehalt nochmals um etwa 23 % zurückging und somit eine totale Reduktion von 40 % aufwies. Der RhoGEF17-Proteingehalt sank in dieser Zeit um insgesamt 64 % ab. Wie bereits beschrieben, führte der Knockdown von RhoGEF17 auch zu einer Veränderung der Zellgestalt, wobei es zum Kontaktverlust zwischen der betroffenen Zelle und den benachbarten Zellen kam. Aus diesem Grund wurde im Folgenden auch die Expression von Cadherinen untersucht, da diese Adhäsionsmoleküle für die Ausbildung von homophilen Zell-Zell-Kontakten verantwortlich sind [99], [100]. In Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopisch beobachteten Zellkontaktverlust, konnte parallel zur Reduktion des RhoGEF17-Proteingehalts auch eine Verringerung der Expression von Cadherinen nachgewiesen werden. Wie die Abbildung 10 zeigt, fiel der Cadherin-Proteingehalt in den RhoGEF17-Knockdown-Zellen nach 72 h um etwa 37 % ab und verringerte sich in den folgenden 24 h nochmals um ca. 18 %.

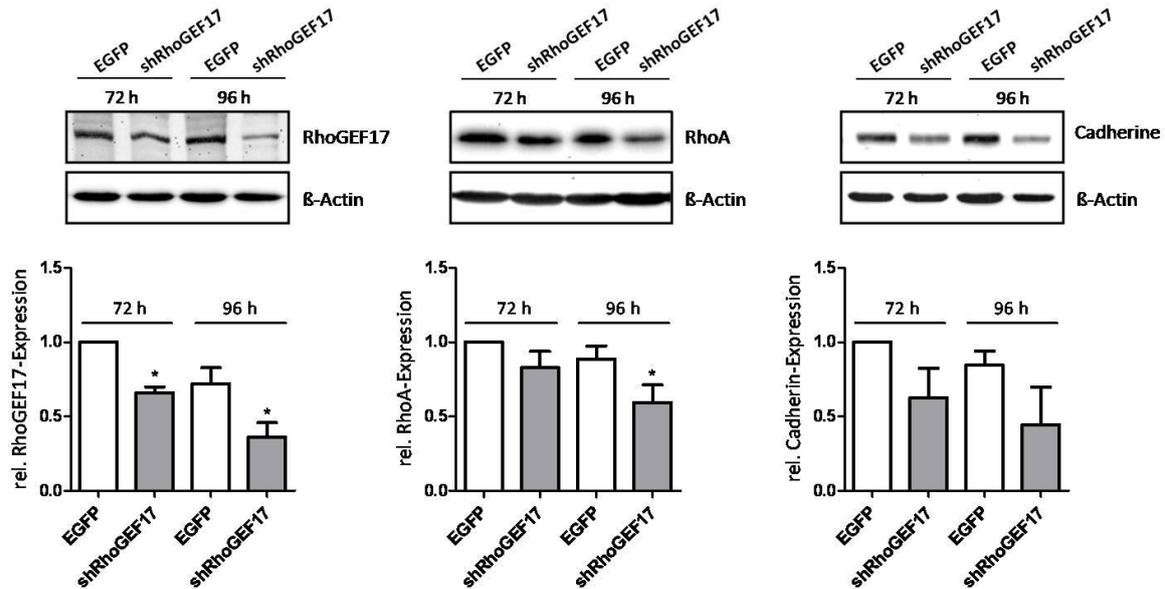
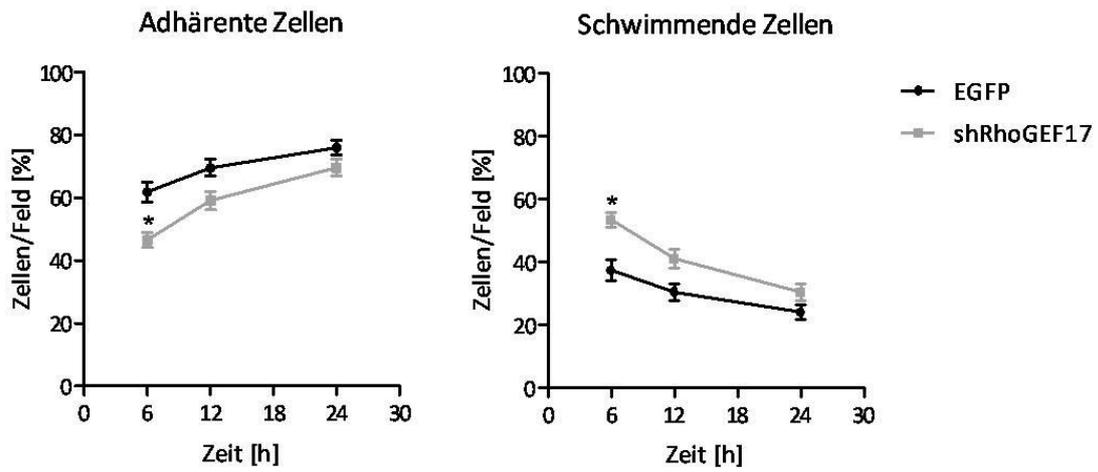


Abb. 10: Analyse der Expression von RhoA und Cadherinen in RASMC mit vermindertem RhoGEF17-Proteingehalt. RASMC wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert. Nach 72 bzw. 96 h wurden die Zellen mit Lysepuffer abgeschabt und die Expression von RhoGEF17, RhoA, Cadherinen und β -Actin mittels Immunoblot analysiert. Für die Auswertung wurde die relative Proteinexpression, die sich aus dem Verhältnis des jeweiligen Proteins zu β -Actin ergibt, ermittelt und auf die entsprechende Kontrolle (EGFP 72 h) normiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM (n = 4; außer rel. Cadherin-Expression n = 2). *p < 0.05 vs. EGFP 72 h (gepaarter t-Test).

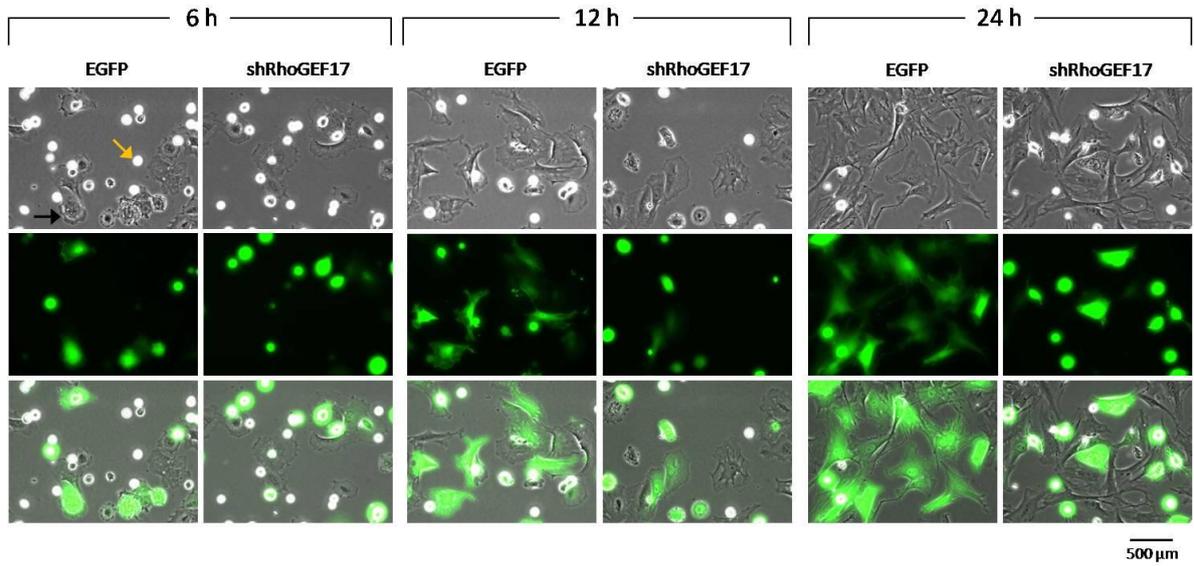
5.1.4. Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von RhoGEF17-Knockdown-Zellen

Da die bisher erhobenen Daten auf eine Rolle von RhoGEF17 in der Aufrechterhaltung der Zelladhäsion hindeuteten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch die Neuanhaftung von Zellen durch eine Reduktion der RhoGEF17-Expression beeinflusst wird. Dafür wurden RASMC nach 72-stündiger Infektion mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus von den Zellkulturschalen abgelöst und der Verlauf der Adhäsion an eine neue Zellkulturschale über 24 h verfolgt. Dabei zeigte sich, dass die Anhaftung der shRhoGEF17-infizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-infizierten Zellen mit einer zeitlichen Verzögerung ablief (Abb. 11 A). Der Zeitverlauf zeigt, dass der Anteil an adhären Zellen an der Gesamtzellzahl in beiden Gruppen im Lauf der Zeit zunahm. Allerdings war der Anteil an adhären Zellen in der RhoGEF17-Knockdown-Gruppe in den ersten 6 h nach der Aussaat signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe. Erst gegen Ende des Beobachtungszeitraums nahm die Anzahl an adhären RhoGEF17-Knockdown-Zellen so weit zu, dass kein nennenswerter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen bestand.

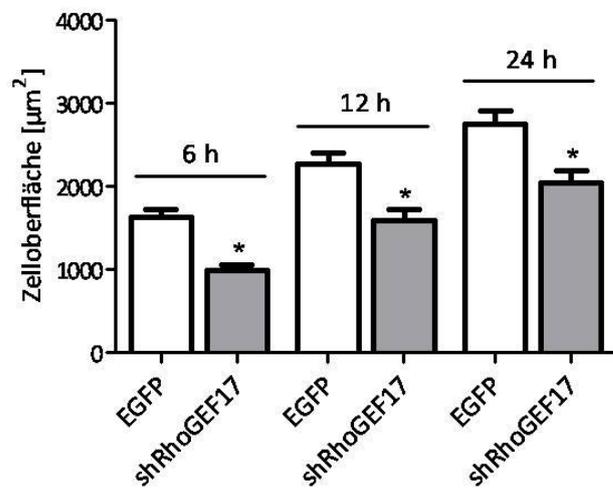
A



B



C



D

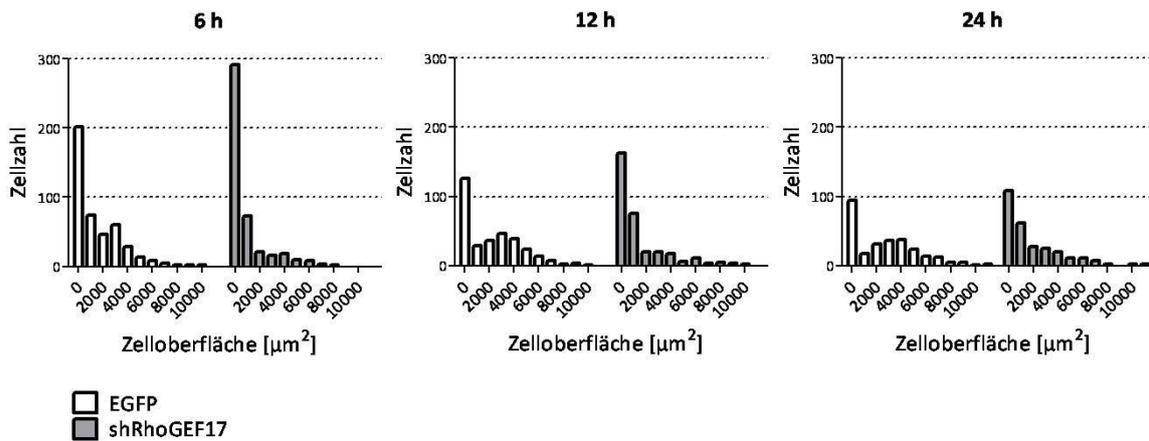


Abb. 11: Untersuchung des Adhäsionsverhalten von RASMC mit verminderter RhoGEF17-Expression. RASMC wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert und nach 72 h vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium aufgenommen und die Hälfte der Suspension in eine neue Zellkulturschale überführt. Die Adhäsion der Zellen wurde durch 12 – 15 zufällige Bilder pro Bedingung und Zeitpunkt dokumentiert. Bei der Auswertung wurden ausschließlich infizierte (grün fluoreszierende) Zellen berücksichtigt.

A) Die Anzahl an adhärenenten bzw. schwimmenden Zellen pro Feld wurde bestimmt und im prozentualen Verhältnis zur Gesamtzellzahl dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM (n = 49 - 61 Felder aus 4 unabhängigen Experimenten). *p < 0.05 vs. EGFP (Tukey's Multiple Comparison Test).

B) Für jeden Zeitpunkt wurde ein repräsentatives Bild der EGFP- bzw. shRhoGEF17-infizierten RASMC abgebildet. Gelber Pfeil: schwimmende Zelle; Schwarzer Pfeil: adhärenente Zelle. Vergrößerung: 200x.

C) und D) Die Oberfläche der infizierten Zellen wurde mit Hilfe der Cell M Software von Olympus ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (C) sowie die entsprechende Häufigkeitsverteilung (D) (n = 283 – 443 Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten). *p < 0.05 vs. EGFP (gepaarter t-Test).

Neben der Bestimmung der Anzahl von adhärenenten bzw. schwimmenden Zellen, wurde im Folgenden auch die durchschnittliche Zelloberfläche als Maß für die Adhäsion herangezogen. Wie die repräsentativen Bilder in Abbildung 11 B zeigen, waren nicht-adhärenente Zellen kugelig und wiesen eine relativ kleine Oberfläche von etwa 200 – 400 µm² auf. Mit fortschreitender Adhäsion der RASMC kam es jedoch zu einer deutlichen Zunahme der Zelloberfläche, da die Zellen nach erfolgter Anhaftung ihre kugelige Form verloren und sich auf der Matrix ausdehnten. Folglich kann über die Messung der Zelloberfläche erfasst werden wie weit die Adhäsion bereits fortgeschritten ist. In Übereinstimmung mit der Zellzählung konnte auch hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen EGFP- und shRhoGEF17-infizierten RASMC festgestellt werden. Wie in Abbildung 11 C erkennbar ist, nahm die durchschnittliche Zelloberfläche in beiden Gruppen mit der Zeit zu. Die Zellen mit verminderter RhoGEF17-Expression wiesen im Schnitt jedoch eine signifikant kleinere Oberfläche auf als die Kontroll-Zellen. Die Knockdown-Zellen waren 6 h nach der Aussaat

um rund 40 % kleiner als die Kontroll-Zellen. Auch nach 12 und 24 h betrug der Größenunterschied zwischen den beiden Gruppen noch etwa 30 % bzw. 26 %. Die Häufigkeitsverteilung in Abbildung 11 D gibt einen genaueren Einblick in die Werte aus denen sich die durchschnittliche Oberfläche zusammensetzt. Sie zeigt, dass es im Verlauf der Zeit in der Kontroll-Gruppe zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Verteilung hin zu einer größeren Zelloberfläche kam. Im Gegensatz dazu war diese Rechtsverschiebung in der shRhoGEF17-Gruppe weniger stark ausgeprägt und der Anteil an kleineren Zellen auch nach 24 h noch deutlich höher als in der Kontroll-Gruppe. Die beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass die Verminderung der Expression von RhoGEF17 den Prozess der Zelladhäsion beeinträchtigt.

5.2. Einfluss von cGMP auf isolierte glatte Gefäßmuskelzellen

5.2.1. Einfluss von cGMP auf die RhoA-Aktivität in RASMC

Wie im Kapitel „Voraussetzungen und Ziele“ (siehe 3.7, Seite 22) bereits beschrieben wurde, konnte Marion Mohl im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit mittels Untersuchungen mit rekombinant überexprimierten Proteinen in HEK-Zellen die Aktivierung von RhoA durch RhoGEF17, sowie dessen Aktivierung über den cGMP/cGKI α -Signalweg, zeigen. Zudem konnte sie auch in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen, d. h. unter endogenen Bedingungen, eine durch cGMP und RhoGEF17 vermittelte RhoA-Aktivierung beobachten. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Versuch wiederholt werden, um eine Quantifizierung der Daten vorzunehmen. Wie in Abbildung 12 A erkennbar ist, konnte die beschriebene cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC in den folgenden Experimenten reproduziert werden. Die densitometrische Auswertung der durchgeführten Effektorpulldown-Assays ergab eine statistisch signifikante, etwa 35%ige Zunahme der RhoA-Aktivität nach Stimulation mit dem cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Um den Einfluss von cGMP auf die RhoA-Aktivität besser beurteilen zu können, wurden parallel RASMC mit 10 % FCS (v/v) als Positivkontrolle stimuliert. Hierdurch wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung der basalen RhoA-Aktivität erzielt, die jedoch mit über 80 % mehr als doppelt so hoch ausfiel wie die cGMP-induzierte Aktivierung.

Basierend auf Veröffentlichungen von verschiedenen Arbeitsgruppen ([79], [101], [102], [103]), die eine Abnahme der Expression der cGMP-abhängigen Kinase (cGK) im Rahmen der Zellkultivierung zeigen, sollte die Expression der cGK in den hier verwendeten, kultivierten RASMC der Passagen 2 bis 5 überprüft werden. Wie die Immunoblot-Analyse in

Abbildung 12 B erkennen lässt, blieb die Expression der Kinase im Verlauf der Kultivierung aber unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen stabil.

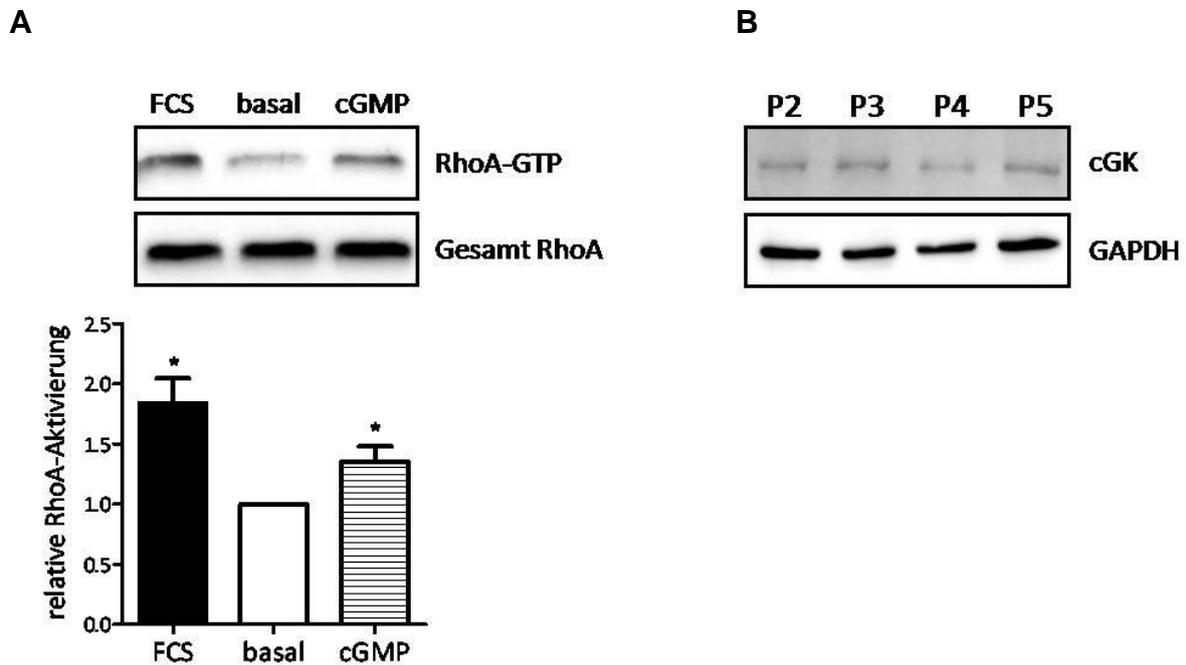


Abb. 12: Untersuchung der RhoA-Aktivität in RASMC nach Stimulation mit cGMP. A) RASMC wurden für 72 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP bzw. mit 10 % FCS (v/v) als Positivkontrolle stimuliert. Die RhoA-Aktivität wurde mittels Effektorpull-down-Assay und nachfolgender Analyse der Präzipitate und Lysate im Immunoblot bestimmt. Die RhoA-Aktivität ergibt sich aus dem Verhältnis von RhoA-GTP zur Gesamtmenge an RhoA. Dargestellt ist die relative RhoA-Aktivierung in Bezug auf den Basalwert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0.05$ vs. Basalwert (gepaarter t-Test). B) Nachweis der Expression der cGMP-abhängigen Kinase (cGK) in unbehandelten RASMC unterschiedlicher Passagen (P2 – P5) mittels eines spezifischen Antikörpers im Immunoblot. Als Beladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH detektiert.

Im nächsten Schritt sollte nun die beschriebene Beteiligung von RhoGEF17 an der cGMP-vermittelten RhoA-Aktivierung in isolierten RASMC überprüft werden. Hierfür wurde die Expression des Proteins mittels des RhoGEF17-spezifischen shRNA-Adenovirus reduziert und die Auswirkungen auf die cGMP-induzierte Erhöhung der RhoA-Aktivität untersucht. Wie die Abbildung 13 A zeigt, resultierte die Behandlung von EGFP-infizierten glatten Muskelzellen mit cGMP in einer etwa 30%igen Steigerung der RhoA-Aktivität, die statistisch signifikant und mit der in uninfizierten RASMC erzielten Aktivierung vergleichbar war (Abb. 12 A). In RASMC, die eine verminderte Expression von RhoGEF17 aufwiesen, konnte cGMP dagegen keine RhoA-Aktivierung hervorrufen. Somit konnte die Annahme, dass cGMP nur in Anwesenheit von RhoGEF17 eine Steigerung der RhoA-Aktivität in RASMC bewirkt, bestätigt werden. Auf die Expression von RhoGEF17 hatte die 2-stündige cGMP-Behandlung keinen Einfluss (Abb. 13 B).

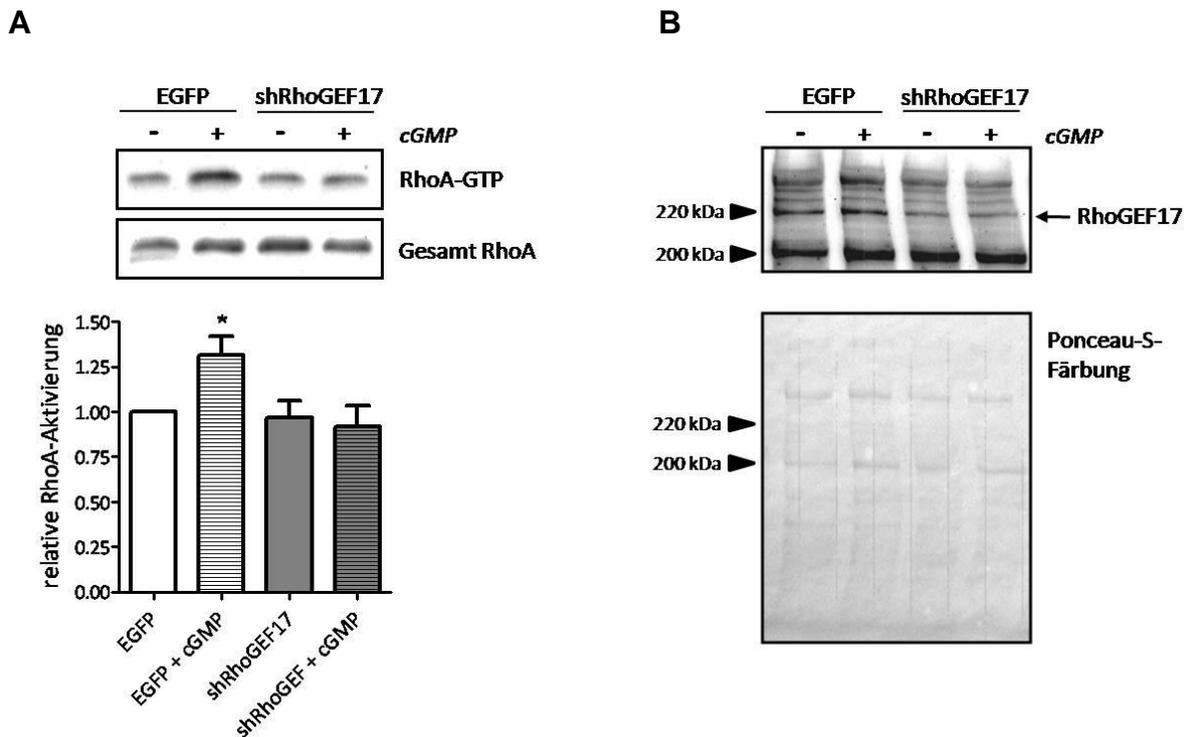


Abb. 13: Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung. RASMC wurden in serumfreiem Medium mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP behandelt. A) Anschließend wurde die RhoA-Aktivität mittels Effektorpull-down-Assay und nachfolgender Immunoblot-Analyse der Präzipitate und Lysate bestimmt. Für die Quantifizierung der RhoA-Aktivität wurde das Verhältnis von RhoA-GTP zur Gesamtmenge an RhoA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 8 - 9$) normiert auf die Kontrolle (EGFP). * $p < 0.05$ vs. EGFP (gepaarter t-Test). B) Nach der 2-stündigen cGMP-Behandlung wurden die Zellen mit Lysepuffer abgeschabt und die RhoGEF17-Expression mittels eines spezifischen Antikörpers im Immunoblot detektiert. Als Beladungskontrolle wurde die Ponceau-S-Färbung des entsprechenden Blots dokumentiert.

5.2.2. Generierung eines cGKI α -Adenovirus

Aufbauend auf den reproduzierten Daten sollte nun die Rolle der cGMP-abhängigen Kinase in der durch cGMP und RhoGEF17 vermittelten RhoA-Aktivierung näher untersucht werden. Um hierfür die Überexpression der Kinase in den isolierten RASMC zu ermöglichen, wurde im Folgenden ein replikationsdefizientes, rekombinantes Adenovirus generiert. Im glatten Muskel der Aorta werden endogen die α - und β -Isoform der cGKI coexpressiert [104], [105], [106]. Analog zu den Vorarbeiten (siehe 3.7, Seite 22) wurde für die Überexpression die cGKI α ausgewählt. Abbildung 14 A zeigt eine schematische Darstellung des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV, in den die cDNA für die cGKI α kloniert wurde. Der pAdTrack-CMV-cGKI α wurde anschließend mit dem adenoviralen pAdEasy-1-Vektor rekombiniert, um die Herstellung infektiöser Viruspartikel zu ermöglichen. Zur Überprüfung des neu generierten Adenovirus, wurden RASMC mit steigenden Viruskonzentrationen inkubiert und die

Expression der cGK analysiert. Wie in Abbildung 14 B erkennbar ist, konnte die Expression der Kinase durch die adenvirale Infektion im Vergleich zur endogenen Expression in den EGFP-infizierten Zellen mit zunehmender MOI („multiplicity of infection“) deutlich gesteigert werden.

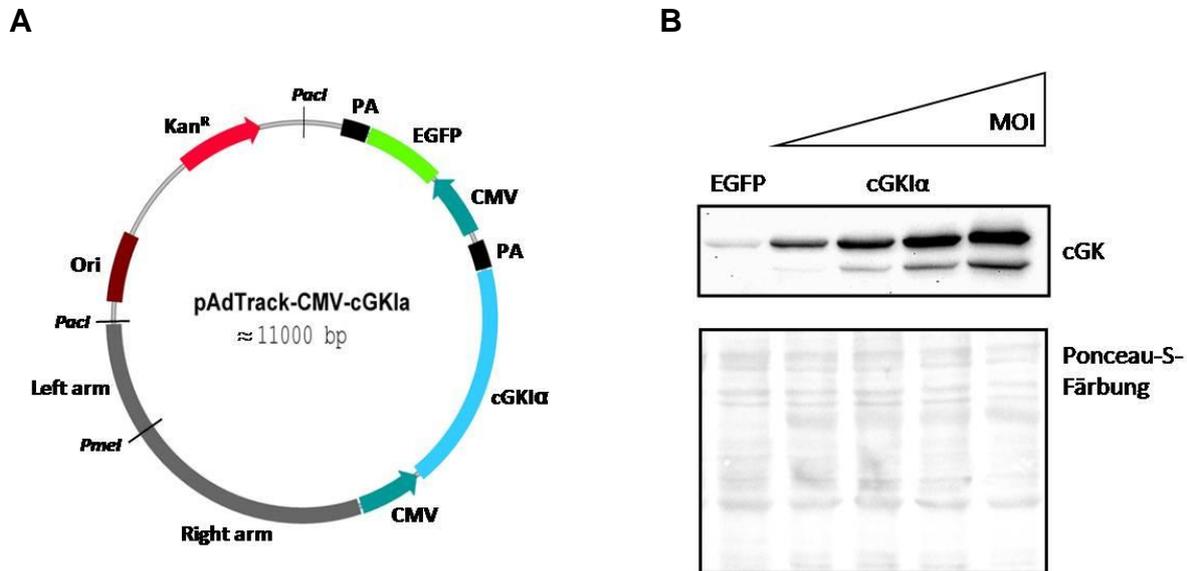


Abb. 14: Generierung eines cGKI α -Adenovirus. A) Schematische Darstellung des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV-cGKI α . B) Nachweis der cGKI α -Überexpression durch das adenvirale Konstrukt in RASMC. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (20 – 400 MOI) des cGKI α -Adenovirus bzw. als Negativkontrolle mit dem EGFP-Adenovirus infiziert. Nach 48 h wurden die infizierten Zellen mit Lysepuffer abgeschabt und die Expression der cGKI α in den Lysaten mittels eines cGK-spezifischen Antikörpers im Immunoblot analysiert. Als Beladungskontrolle wurde die Ponceau-S-Färbung des entsprechenden Blots herangezogen.

5.2.3. Einfluss der Überexpression der cGKI α auf die Phosphorylierung von VASP

Im nächsten Schritt wurde die Funktionalität der überexprimierten Kinase getestet. Als Marker für die Aktivität der cGK wurde die Phosphorylierung des Proteins VASP am Serinrest 236 (entspricht beim Menschen dem Serinrest 239) herangezogen. Diese Phosphorylierungsstelle gilt als cGK-spezifisch und eignet sich somit zur Überprüfung der Kinase-Aktivität [107], [108]. Wie die Abbildung 15 A erkennen lässt, konnte mit ansteigender Viruskonzentration auch eine Zunahme der Phosphorylierung am Serin 236 von VASP in den mit Serum behandelten RASMC beobachtet werden. Dagegen konnte in Kontrollinfizierten, Serum-stimulierten RASMC kein Ser236-phosphoryliertes VASP detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass unter den vorliegenden Bedingungen das Ausmaß der VASP-Phosphorylierung durch die endogene cGK zu gering ist, um mittels Immunoblot nachgewiesen werden zu können. Folglich wurde die in den cGKI α -infizierten RASMC detektierte Phosphorylierung von VASP durch die rekombinant exprimierte Kinase hervorgerufen, deren

Funktionsfähigkeit damit nachgewiesen werden konnte. Im Folgenden wurde nun der Einfluss der Überexpression auf die cGMP-vermittelte Aktivierung der Kinase und die dadurch bedingte Phosphorylierung von VASP untersucht.

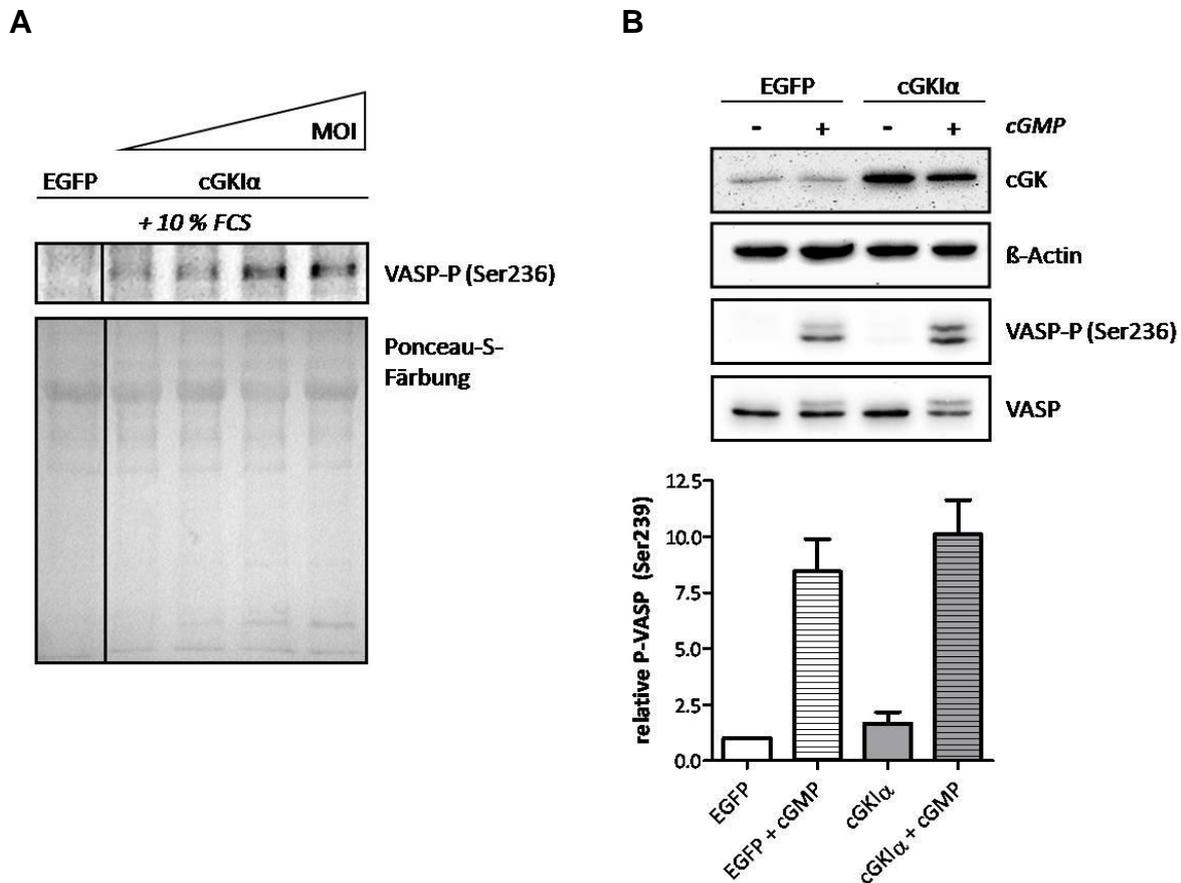


Abb. 15: Einfluss der cGKI α -Überexpression auf die Phosphorylierung von VASP. A) RASMC wurden in serumfreiem Medium mit dem EGFP-Adenovirus bzw. mit steigenden Konzentrationen (20 – 120 MOI) des cGKI α -Adenovirus infiziert und nach 48 h für 2 h mit 10 % FCS (v/v) stimuliert. Die Phosphorylierung von VASP am Serinrest 236 wurde mit einem Phospho-VASP-spezifischen Antikörper mittels Immunoblot detektiert. Als Beladungskontrolle wurde die Ponceau-S-Färbung des entsprechenden Blots dokumentiert. B) RASMC wurden in serumfreiem Medium mit Adenoviren, die für EGFP bzw. cGKI α kodieren, infiziert und nach 48 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Die Phosphorylierung von VASP am Serin 236 wurde mit dem entsprechenden Antikörper im Immunoblot detektiert und mittels Pixelauswertung quantifiziert. Dargestellt ist die relative VASP-Phosphorylierung am Serin 236 als Vielfaches der unbehandelten EGFP-Kontrolle. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM (n = 3). Die Gesamtmenge an VASP sowie die Expression der cGK wurde im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper überprüft. Als Beladungskontrolle wurde β -Actin detektiert.

Wie in Abbildung 15 B zu sehen ist, resultierte die Aktivierung der endogenen cGK mit cGMP in Kontroll-infizierten RASMC in einer deutlichen Zunahme der VASP-Phosphorylierung am Serin 236. Diese wurde durch die Überexpression der cGKI α kaum beeinflusst. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Menge an endogener cGK ausreichend ist, um nach ihrer

Aktivierung durch cGMP eine maximale Phosphorylierung von VASP zu gewährleisten. Zudem zeigt dieser Versuch, dass die Überexpression keinen nennenswerten Anstieg der Basalaktivität der Kinase, zumindest im Hinblick auf die Phosphorylierung von VASP, hervorruft.

5.2.4. Einfluss der Überexpression der cGKI α auf die cGMP-induzierte Aktivierung von RhoA in RASMC

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nach Behandlung von RASMC mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP eine Steigerung der RhoA-Aktivität nachgewiesen werden (siehe 5.2.1, Seite 55). Um die Rolle der cGK in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wurden RASMC mit dem cGKI α -Adenovirus infiziert und der Einfluss der Überexpression auf die cGMP-induzierte RhoA-Aktivität mittels Effektorpulldown-Assay bestimmt (Abb. 16).

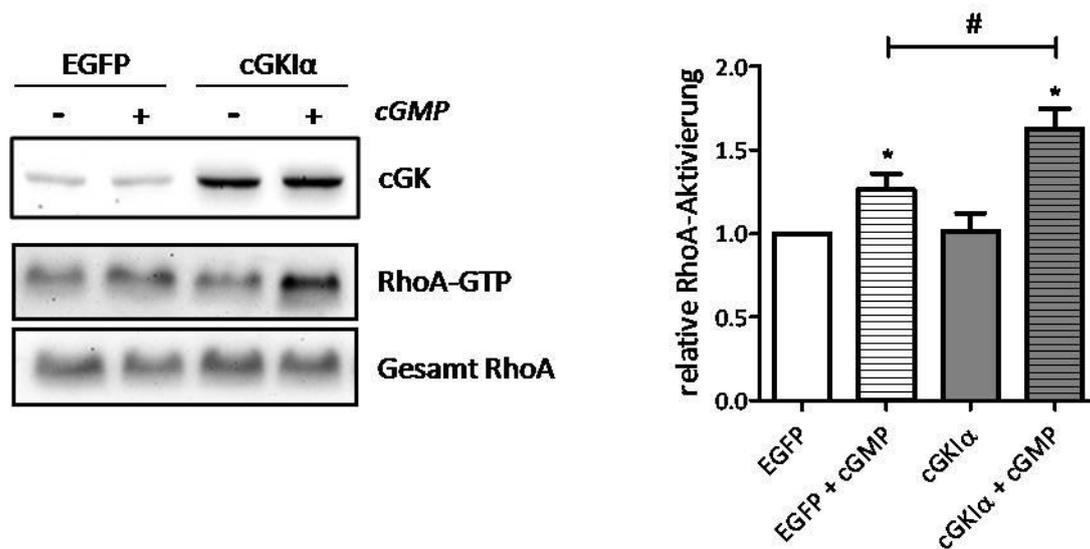


Abb. 16: Einfluss der cGKI α -Überexpression auf die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die cGKI α kodieren, infiziert und nach 48 - 72 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Zur Bestimmung der RhoA-Aktivität wurde ein Effektorpulldown-Assay mit anschließender Immunoblot-Analyse durchgeführt und die Aktivität aus dem Verhältnis von RhoA-GTP zur Gesamtmenge an RhoA ermittelt. Dargestellt ist die relative RhoA-Aktivierung bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM (n = 8). *p < 0.05 vs. die jeweilige unbehandelte Kontrolle; #p < 0.05 (gepaarter t-Test). Die Expression der cGK wurde im Immunoblot mittels eines cGK-spezifischen Antikörpers überprüft.

Vergleichbar mit den vorigen Beobachtungen induzierte cGMP in den Kontroll-Zellen wieder eine statistisch signifikante, etwa 25%ige Erhöhung der basalen RhoA-Aktivität. Interessanterweise fiel die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC, welche eine

erhöhte Expression der cGKI α aufwiesen, mit einer über 60%igen Zunahme gegenüber dem Basalwert, mehr als doppelt so hoch aus wie in den cGMP-behandelten Kontroll-Zellen. Diese zusätzliche Steigerung der cGMP-induzierten RhoA-Aktivität in Zellen mit erhöhter Expression der cGKI α war statistisch signifikant. In Abwesenheit von cGMP hatte die Überexpression der cGKI α keinen Einfluss auf die basale RhoA-Aktivität.

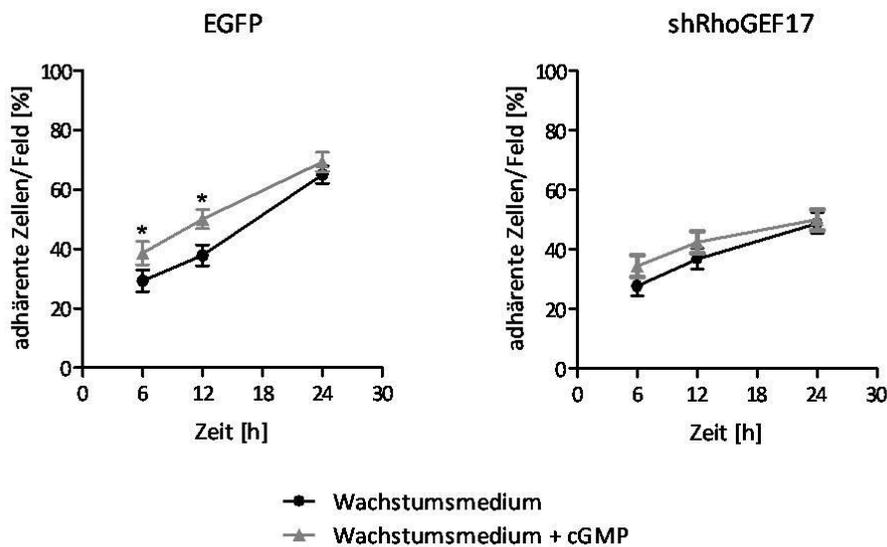
5.3. Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des cGMP/cGKI α /RhoGEF17-Signalweges in RASMC

Die bisher gezeigten Ergebnisse deuten auf die Existenz eines cGMP/cGKI α /RhoGEF17-Signalweges in RASMC hin, der in einer Aktivierung der GTPase RhoA mündet. Die physiologische Bedeutung dieser Signalkaskade und der damit verbundenen Aktivierung von RhoA ist jedoch noch unklar. Um dieser Frage nachzugehen, wurde im Folgenden eine mögliche Beteiligung dieses Signalweges am adhäsiven Verhalten der RASMC untersucht. Desweiteren wurde auch der mögliche Einfluss auf die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskelzellen überprüft.

5.3.1. Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von RASMC in An- und Abwesenheit von RhoGEF17

Weinmeister und Kollegen konnten zeigen, dass cGMP über die Aktivierung der cGKI die Adhäsion von isolierten glatten Gefäßmuskelzellen fördert [109]. Im Hinblick auf die in Abschnitt 5.1.4. (s. Seite 52) dargestellten Daten, welche auf eine Funktion von RhoGEF17 bei der Zelladhäsion hindeuten, stellte sich die Frage, ob RhoGEF17 möglicherweise an dem von Weinmeister und Kollegen beschriebenen cGMP-Effekt beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von Kontroll- bzw. shRhoGEF17-infizierten RASMC untersucht. Wie die Abbildung 17 A erkennen lässt, wies die Gruppe der cGMP-behandelten Kontroll-Zellen in den ersten 12 h nach der Aussaat eine um etwa 9 – 12 % höhere Anzahl an adhären Zellen auf als die Gruppe der unbehandelten Kontroll-Zellen. Im Gegensatz hierzu hatte die Behandlung mit cGMP keinen signifikanten Einfluss auf die Anhaftungsgeschwindigkeit der shRhoGEF17-infizierten Zellen. Als weiteres Maß für die Adhäsion wurde auch die durchschnittliche Oberfläche der cGMP-behandelten und unbehandelten Zellen im Verlauf der ersten 24 h nach der Aussaat ermittelt. Diese spiegelt das Ausmaß der Ausbreitung der Zelle nach der Anhaftung an eine Matrix wider. Dabei zeigte

sich, dass die cGMP-behandelten Kontroll-Zellen 24 h nach der Aussaat mit einer durchschnittlichen Größe von etwa $2050 \mu\text{m}^2$ eine signifikant größere Oberfläche aufwiesen als die unbehandelten Kontroll-Zellen, deren Durchschnittsgröße zu diesem Zeitpunkt $1711 \mu\text{m}^2$ betrug (Abb. 17 B). Die Häufigkeitsverteilung in Abbildung 17 C zeigt, dass sich dieser Größenunterschied zwischen cGMP-behandelten und unbehandelten RASMC bereits zu Beginn des Beobachtungszeitraums (6 h nach der Aussaat) abzeichnete. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass, im Fall der Kontroll-infizierten Zellen, cGMP zunächst die Anhaftung der RASMC an die Matrix beschleunigt und anschließend auch die flächenmäßige Vergrößerung der Zellen fördert. Im Gegensatz zu den Kontroll-infizierten Zellen hatte die Zugabe von cGMP jedoch keinen Einfluss auf die durchschnittliche Oberfläche der RASMC, die eine verminderte Expression von RhoGEF17 aufwiesen. In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 5.1.4 gezeigten Daten konnten auch hier Defizite bei der Anhaftung und Vergrößerung der shRhoGEF17-infizierten RASMC verglichen mit den Kontroll-infizierten Zellen beobachtet werden. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass cGMP unter den hier gewählten Bedingungen eine pro-adhäsive Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen hat. Dass dieser Effekt in Zellen mit reduzierter RhoGEF17-Expression nicht auftritt, deutet darauf hin, dass RhoGEF17 an der durch cGMP initiierten Signalkaskade beteiligt sein könnte.

A

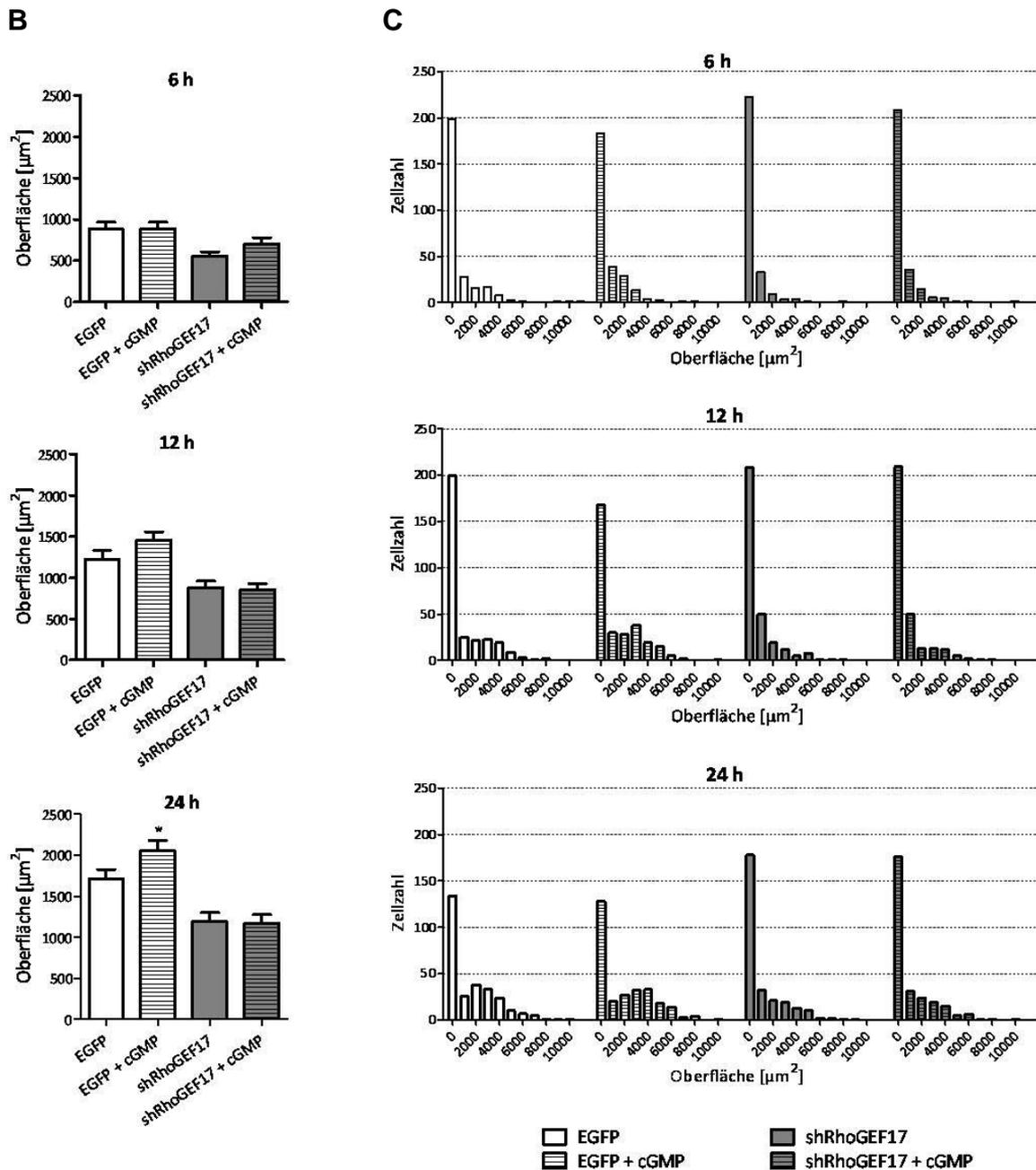
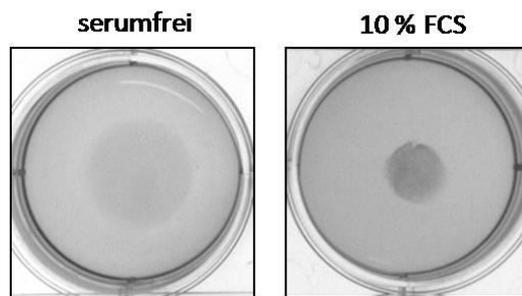


Abb. 17: Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von EGFP- bzw. shRhoGEF17-infizierten RASC. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert. Nach 72 h wurden je $7,5 \times 10^4$ Zellen in Wachstumsmedium, dem $100 \mu\text{M}$ 8-pCPT-cGMP bzw. das gleiche Volumen an H_2O als Negativkontrolle zugefügt wurde, in das well einer 6well-Platte überführt. Die Adhäsion der Zellen wurde durch 15 – 17 zufällige Bilder pro Bedingung und Zeitpunkt dokumentiert. Bei der Auswertung wurden ausschließlich infizierte (grün fluoreszierende) Zellen berücksichtigt. A) Die Anzahl an adhärenenten Zellen pro Feld wurde bestimmt und im prozentualen Verhältnis zur Gesamtzellzahl dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 63 - 70$ Felder aus 4 unabhängigen Versuchen). B) und C) Die Oberfläche der Zellen wurde mit Hilfe der Cell M Software von Olympus analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (B) sowie die entsprechende Häufigkeitsverteilung der Zelloberfläche (C) ($n = 275 - 306$ Zellen aus 4 unabhängigen Versuchen). * $p < 0.05$ vs. EGFP (gepaarter t-Test).

5.3.2. Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP-induzierte Relaxation glatter Gefäß-muskelzellen

cGMP induziert über die Aktivierung der cGK die Relaxation des glatten Muskels [110]. Die Aktivierung von RhoA führt dagegen zu einer Verstärkung der Ca^{2+} -induzierten Kontraktion [111]. Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit gezeigte cGMP- und RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung, stellte sich die Frage, ob RhoGEF17 über diesen Signalweg möglicherweise die cGMP-induzierte Relaxation des glatten Muskels beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde ein Collagen-Kontraktions-Assay mit Kontroll- und shRhoGEF17-infizierten RASMC durchgeführt.

A



B

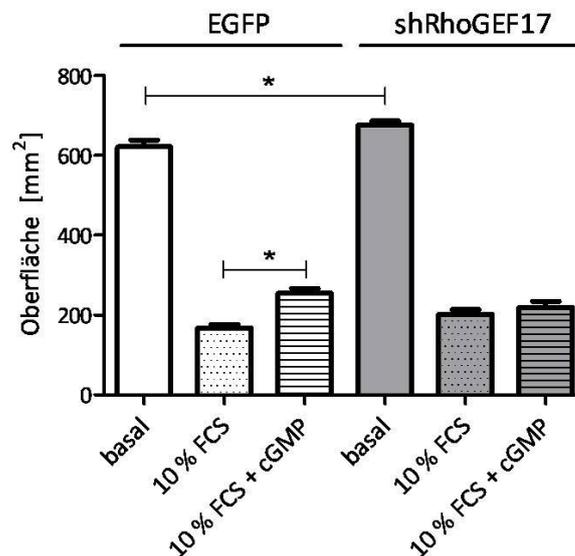


Abb. 18: Einfluss einer verminderten RhoGEF17-Expression auf die cGMP-induzierte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen. RASMC wurden in serumfreiem Medium mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Nach 48 - 72 h wurden $1,4 \times 10^4$ Zellen in eine Collagenmatrix eingebettet und in Medium ohne FCS (basal) bzw. in Medium mit 10 % FCS (v/v) mit und ohne $100 \mu\text{M}$ 8-pCPT-cGMP überführt. Nach ca. 20 h wurde die Oberfläche der Collagenplättchen mit Hilfe der Cell M Software von Olympus ermittelt. A) Collagenplättchen in Medium ohne FCS bzw. mit 10 % FCS (v/v). B) Oberfläche der Collagenplättchen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Es wurden 2 unabhängige Versuche mit jeweils 6 – 11 Replikaten pro Bedingung durchgeführt. * $p < 0.05$ (Tukey's Multiple Comparison Test).

Dabei wurde die Fähigkeit der Zellen eine Collagenmatrix unter Basalbedingung (ohne Serum) sowie in Anwesenheit von Serum und cGMP zu kontrahieren miteinander verglichen. Interessanterweise resultierte die Verminderung der RhoGEF17-Expression unter Basalbedingungen in einer leichten, jedoch signifikanten, etwa 9%igen Verringerung der Oberfläche des Collagenplättchens und damit der Kontraktionskraft der RhoGEF17-Knockdown-Zellen (Abb. 18). In Anwesenheit von Serum konnte jedoch kein Unterschied zwischen Kontroll- und shRhoGEF17-infizierten Zellen bezüglich ihrer Kontraktionsfähigkeit festgestellt werden. In beiden Fällen wurde im Vergleich zum jeweiligen Basalwert eine ca. 70%ige Reduktion der Oberfläche des Collagenplättchens erreicht. Die Reaktion auf cGMP fiel jedoch unterschiedlich aus. So führte die Zugabe von cGMP bei den Kontroll-infizierten Zellen zu einer Relaxation, die sich in einer signifikanten Abschwächung der Serum-induzierten Kontraktion äußerte. In den RhoGEF17-Knockdown-Zellen konnte cGMP dagegen keine Relaxation hervorrufen. Wie die Abbildung 18 zeigt, hatte die Zugabe von cGMP in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Serum-induzierte Kontraktion.

5.4. Einfluss von RhoGEF17 auf isolierte glatte Muskelzellen der Trachea

5.4.1. Inhibition der Expression von RhoGEF17 in glattmuskulären Zellen der Rattentrachea

In den glattmuskulären Zellen der Rattenaorta konnte die Expression von RhoGEF17 durch die adenoviral eingeführte shRNA um etwa 64 % reduziert werden (siehe 5.1.3, Seite 51). In glatten Muskelzellen der Rattentrachea (RTSMC) war die shRNA-induzierte Reduktion der RhoGEF17-Expression effektiver. In diesen Zellen resultierte die Infektion der RTSMC mit dem shRhoGEF17-Adenovirus in einer 92%igen Inhibition der Expression nach 96 h (Abb. 19). Im Gegensatz dazu konnte in den Kontroll-infizierten RTSMC im Laufe der 96-stündigen Kultivierung sogar ein Anstieg des RhoGEF17-Proteingehalts beobachtet werden.

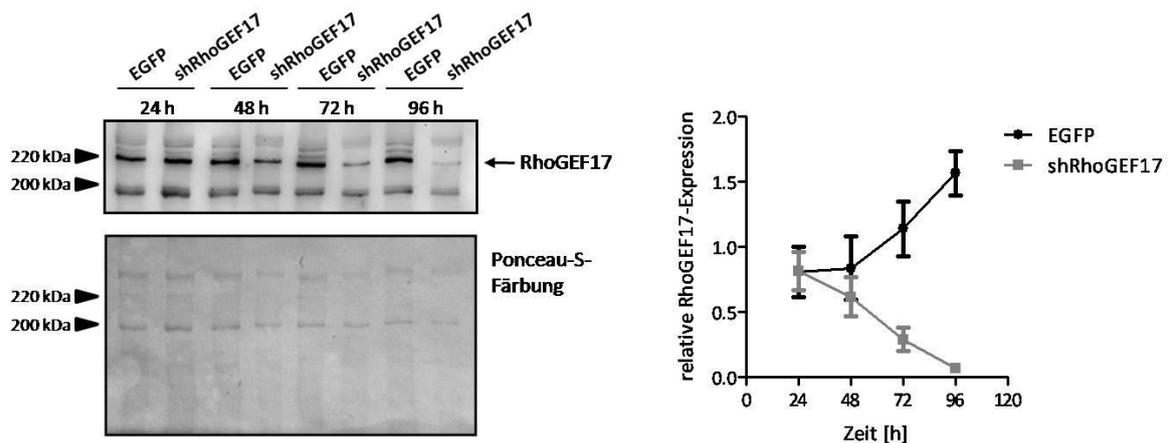


Abb. 19: Inhibition der Expression von RhoGEF17 in RTSMC durch das RhoGEF17-spezifische shRNA-Konstrukt. RTSMC wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert. Die Expression von RhoGEF17 wurde 24, 48, 72 und 96 h nach der Infektion im Immunoblot mit einem RhoGEF17-spezifischen Antikörper detektiert und mittels Pixelauswertung quantifiziert. Der Graph zeigt die relative RhoGEF17-Expression, die sich aus dem Verhältnis von RhoGEF17 zu dem bei ca. 200 kDa unspezifisch angefärbten Protein ergibt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 3 - 4$). Als Beladungskontrolle wurde die Ponceau-S-Färbung des entsprechenden Blots dokumentiert.

5.4.2. Einfluss von RhoGEF17 auf die Organisation des Actin-Zytoskeletts von RTSMC

In Analogie zu den vaskulären glatten Muskelzellen löste die Infektion der trachealen glattmuskulären Zellen mit dem shRhoGEF17-Adenovirus ebenfalls lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen der Zellmorphologie aus. Um zu untersuchen, ob dieser Vorgang wie bei den RASMC ebenfalls mit einem Verlust von Actin-Stressfasern einhergeht, wurde eine Färbung der Actinfilamente von RTSMC vorgenommen. Wie die repräsentativen Bilder in Abbildung

20 zeigen, bildeten auch die RTSMC nach 72-stündiger Infektion mit dem shRhoGEF17-Adenovirus keine Stressfasern mehr aus. Außerdem konnte, im Vergleich zu Kontroll- bzw. nicht-infizierten RTSMC, eine Abrundung der Zellen mit verminderter RhoGEF17-Expression beobachtet werden. Interessanterweise kam es in diesen Zellen auch zur Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien. Diese Beobachtungen legen nahe, das RhoGEF17 auch in trachealen glatten Muskelzellen eine Rolle bei der Organisation des Actin-Zytoskeletts spielt.

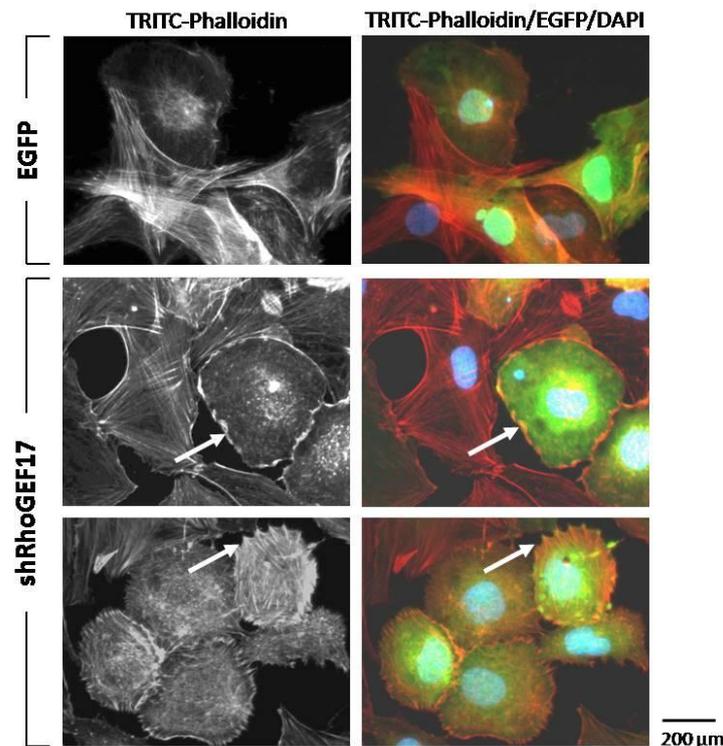


Abb. 20: Einfluss der Reduktion der RhoGEF17-Expression auf das Actin-Zytoskelett von RTSMC. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium für 72 h mit den Adenoviren, die für EGFP- bzw. die shRhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert. Die Färbung der Actinfilamente erfolgte mit TRITC-Phalloidin und ist als Graustufenbild dargestellt. Die farbigen Bilder zeigen die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von TRITC-Phalloidin (rot), EGFP (grün) und der Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Infizierte Zellen fluoreszieren grün, da sie das Reportergen EGFP exprimieren. Die Pfeile deuten auf die Ausbildung von Lamellipodien (im Bild: Mitte) bzw. Filopodien (im Bild: unten) von shRhoGEF17-infizierten RTSMC hin. Vergrößerung: 400x.

5.4.3. Einfluss von RhoGEF17 auf die Expression und Aktivität von RhoA und Rac1 in RTSMC

Im nächsten Schritt wurde die Expression der GTPase RhoA in shRhoGEF17-infizierten RTSMC untersucht. Wie im Fall der vaskulären glatten Muskelzellen (siehe 5.1.3, Seite 51) ging die Verminderung der RhoGEF17-Expression auch bei den trachealen glatten Muskel-

zellen mit einer Abnahme der RhoA-Expression einher. Die statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der Expression von RhoGEF17 und RhoA in shRhoGEF17-infizierten RTSMC ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt (Korrelationskoeffizient $r = 0,77$). Desweiteren wurde die Expression von Rac1 untersucht, da diese GTPase ebenfalls an der Organisation des Actin-Zytoskeletts, insbesondere an der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt ist [34]. Wie in Abbildung 21 erkennbar ist, nahm auch die Expression von Rac1 in shRhoGEF17-infizierten Zellen ab. Die Korrelationsanalyse zeigte jedoch, dass, im Vergleich zu RhoA, die Abhängigkeit zwischen der Expression von Rac1 und RhoGEF17 weniger stark ausgeprägt ist (Korrelationskoeffizient $r = 0,32$).

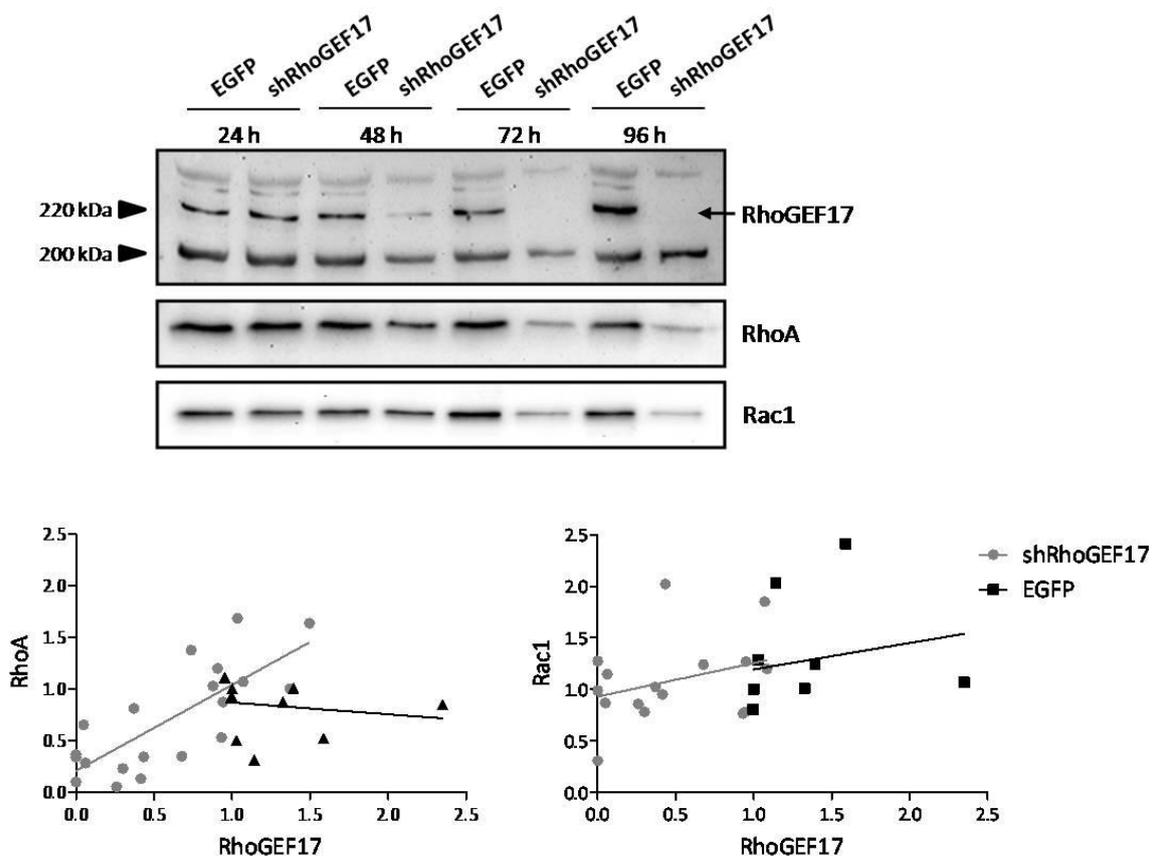


Abb. 21: Analyse der Expression von RhoA und Rac1 in RhoGEF17-Knockdown-Zellen. RTSMC wurden in serumfreiem Medium mit den Adenoviren, die für EGFP- bzw. die RhoGEF17-spezifische shRNA kodieren, infiziert. Die Zellen wurden 24, 48, 72 und 96 h nach der Infektion mit Lysepuffer abgeschabt und die Expression der Proteine RhoGEF17, RhoA und Rac1 im Immunoblot mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert und mittels Pixelauswertung quantifiziert. Dargestellt ist die Korrelation zwischen der relativen Expression von RhoGEF17 und der relativen Expression von RhoA bzw. Rac1. Hierfür wurde das Verhältnis der jeweiligen Proteine zu dem bei ca. 200 kDa unspezifisch angefärbten Protein ermittelt und auf den 24 h- bzw. 72 h-Wert der EGFP-infizierten Zellen normiert. Die Werte stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Der Knockdown von RhoGEF17 beeinflusste nicht nur die Expression der GTPasen RhoA und Rac1 in unterschiedlichem Maße, sondern auch deren basale Aktivität (Abb. 22). So konnte nach 72-stündiger Infektion mit dem shRhoGEF17-Adenovirus eine signifikante 36%ige Abnahme der basalen RhoA-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-infizierten RTSMC beobachtet werden. Die Verminderung der Rac1-Aktivität betrug dagegen nur 18 %.

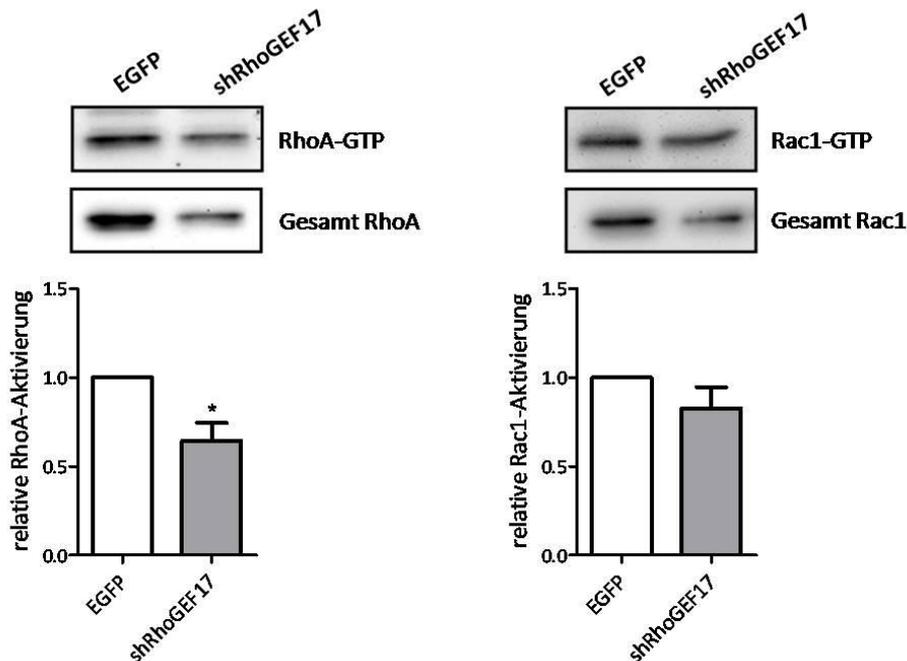


Abb. 22: Untersuchung der basalen RhoA- und Rac1-Aktivität in RTSMC mit verminderter RhoGEF17-Expression. RTSMC wurden für 72 h in serumfreiem Medium mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Dann wurde die RhoA- bzw. die Rac1-Aktivität mittels Effektorpull-down-Assay und nachfolgender Analyse der Präzipitate und Lysate im Immunoblot bestimmt. Die RhoA- bzw. Rac1-Aktivität ergibt sich aus dem Verhältnis von RhoA- bzw. Rac1-GTP zur Gesamtmenge an RhoA bzw. Rac1. Dargestellt ist die relative Aktivierung in Bezug auf den Basalwert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 7 - 9$). * $p < 0.05$ (gepaarter t-Test).

5.4.4. Einfluss von RhoGEF17 auf die Proliferation von trachealen glatten Muskelzellen

Neben der Morphologie und der Proteinexpression wurde durch die Reduktion der RhoGEF17-Expression auch die Proliferation von trachealen glatten Muskelzellen beeinflusst. Um dies genauer zu untersuchen, wurde das Proliferationsverhalten von Kontroll- und shRhoGEF17-infizierten RTSMC unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (0 – 10 % FCS) mit Hilfe des MTT-Assays verglichen. Bei dieser Methode dient die Absorption des Farbstoffs Formazan, welche in den Graphen in Abbildung 23 dargestellt ist, als Maß für die Anzahl an vitalen Zellen.

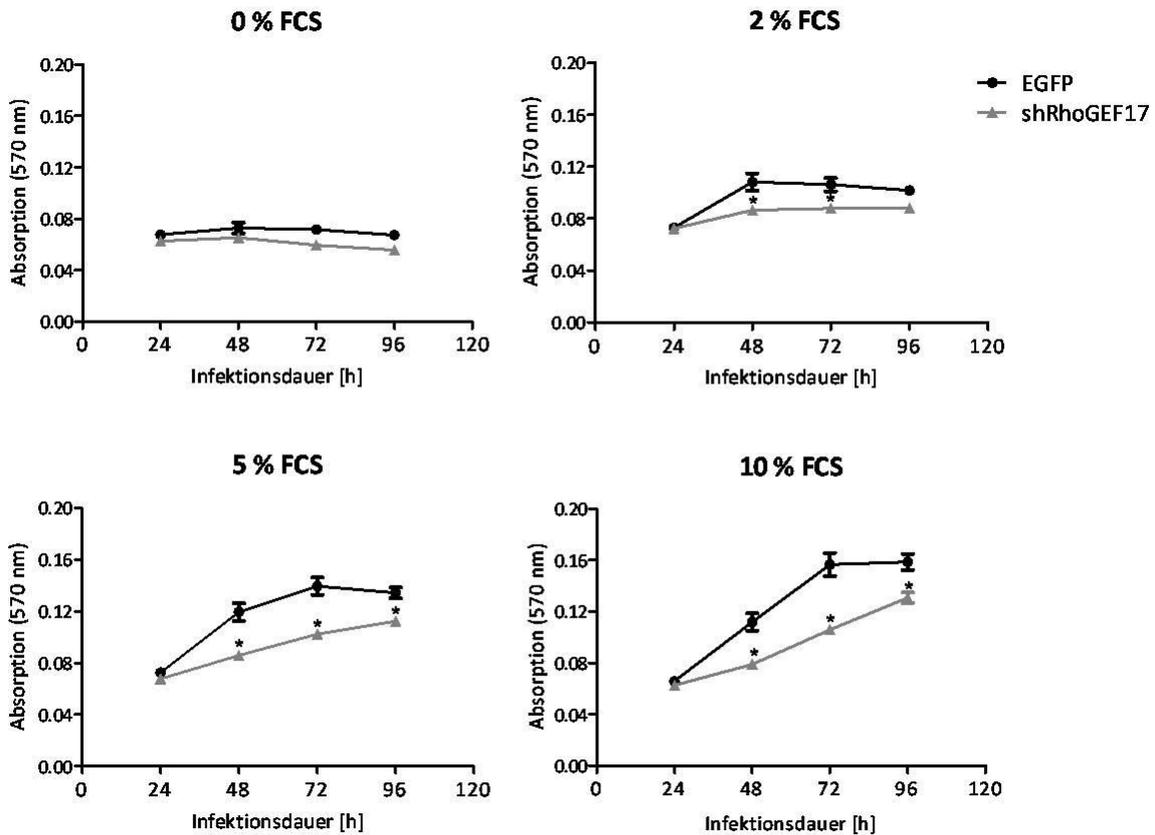


Abb. 23: Einfluss des RhoGEF17-Knockdown auf die Proliferation von RTSMC. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium für 6 h mit dem EGFP- bzw. dem shRhoGEF17-Adenovirus infiziert. Dann wurden die RTSMC vom Schalenboden abgelöst und in Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen aufgenommen und in eine 96well-Zellkulturplatte überführt (3 500 Zellen/well). 24, 48, 72 und 96 h nach der Infektion wurde die Proliferation der RTSMC mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Es wurden 2 unabhängige Versuche mit jeweils 24 Replikaten pro Zeitpunkt und Bedingung durchgeführt. * $p < 0.05$ vs. EGFP (Tukey's Multiple Comparison Test).

Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Proliferation in beiden Gruppen von der Serumkonzentration im Medium abhing: mit steigendem Serumgehalt nahm auch die Proliferationsrate zu. Allerdings proliferierten die Zellen, welche eine verminderte Expression von RhoGEF17 aufwiesen, im Allgemeinen deutlich langsamer als die Kontroll-Zellen. Dieser Unterschied zwischen Kontroll- und RhoGEF17-Knockdown-Zellen war bei hohem Serumgehalt besonders deutlich ausgeprägt.

5.4.5. Einfluss von cGMP auf die RhoA-Aktivität in RTSMC

Im Hinblick auf die in vaskulären glatten Muskelzellen beobachtete cGMP/RhoGEF17-abhängige Aktivierung von RhoA (siehe 5.2.1, Seite 55), wurde auch in trachealen glatten Muskelzellen der Einfluss von cGMP auf die RhoA-Aktivität überprüft. Analog zur

Behandlung der RASMC wurden auch die RTSMC für 2 h mit dem cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP stimuliert und anschließend die RhoA-Aktivität mittels eines Effektorpull-down-Assays bestimmt. Im Gegensatz zu den vaskulären glatten Muskelzellen führte die 2-stündige cGMP-Behandlung der trachealen glatten Muskelzellen jedoch nicht zu einem Anstieg der RhoA-Aktivität (Abb. 24).

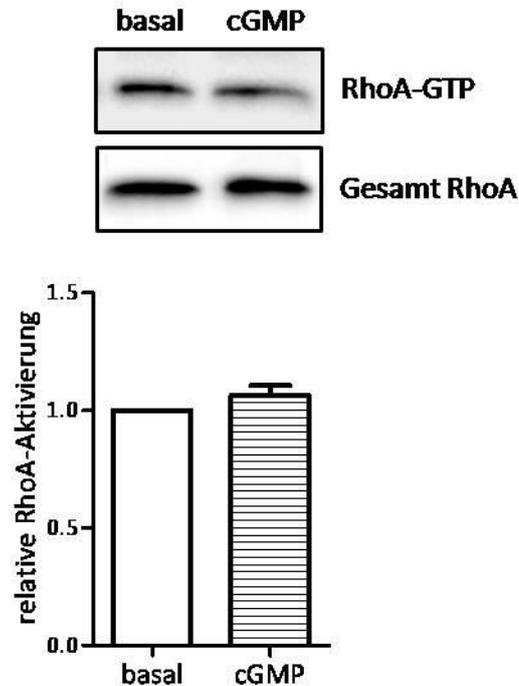


Abb. 24: Untersuchung der RhoA-Aktivität in RTSMC nach Stimulation mit cGMP. RTSMC wurden für 72 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Die RhoA-Aktivität wurde mittels Effektorpull-down-Assay und nachfolgender Analyse der Präzipitate und Lysate im Immunoblot bestimmt. Die RhoA-Aktivität ergibt sich aus dem Verhältnis von RhoA-GTP zur Gesamtmenge an RhoA. Dargestellt ist die relative RhoA-Aktivierung in Bezug auf den Basalwert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 2$).

6. Diskussion

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor RhoGEF17 wird in vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert und vermittelt dort eine cGMP-induzierte Aktivierung der GTPase RhoA (Marion Mohl, 2007, Universität Heidelberg). In der vorliegenden Arbeit sollte nun die endogene Funktion von RhoGEF17 sowie die Bedeutung der cGMP-induzierten Aktivierung von RhoGEF17 in vaskulären als auch trachealen glatten Muskelzellen näher untersucht werden.

6.1. Die Auswirkungen der Reduktion der RhoGEF17-Expression auf vaskuläre und tracheale glatte Muskelzellen

Eine verringerte Expression von RhoGEF17 hatte bereits unter basalen Bedingungen einen erheblichen Einfluss auf die untersuchten vaskulären und trachealen glatten Muskelzellen. So führte die shRNA-medierte Reduktion des RhoGEF17-Proteingehalts zum Verlust von Actin-Stressfasern, zu morphologischen Veränderungen und zur Verminderung der RhoA-Expression. Die morphologischen Veränderungen, welche im Zuge der Reduktion der RhoGEF17-Expression auftraten, mündeten im Fall der vaskulären glatten Muskelzellen in der Ausbildung einer „dendritischen“ Zellgestalt. Da dieser Phänotyp auch nach der Inhibition der GTPase RhoA auftritt ([112], [113], [114]), ist es wahrscheinlich, dass die Reduktion der RhoGEF17-Expression eine verminderte Aktivität von RhoA zur Folge hat. Hierfür spricht auch der Verlust der Actin-Stressfasern, deren Ausbildung und Aufrechterhaltung von aktivem RhoA abhängt. Ein Grund für eine verminderte Aktivität von RhoA könnte die Abnahme des RhoA-Proteingehalts in den RhoGEF17-Knockdown-Zellen sein, welche vermutlich dazu führt, dass weniger RhoA für eine Aktivierung zur Verfügung steht. Allerdings konnte in den durchgeführten Effektorpull-down-Assay nach 72-stündiger Infektion kein Unterschied zwischen der basalen RhoA-Aktivität von Kontroll- und shRhoGEF17-infizierten RASMC festgestellt werden. Da jedoch eine signifikante Reduktion des RhoA-Gehalts erst nach 96-stündiger Infektion auftrat, ist es wahrscheinlich, dass die Auswirkungen auf die RhoA-Aktivität nach 72 h noch zu geringfügig sind, um mittels des semi-quantitativen Effektorpull-down-Assays detektiert zu werden. In trachealen glatten Muskelzellen wurde dagegen auch schon nach 72-stündiger Infektion mit dem shRhoGEF17-Adenovirus eine stärkere Reduktion der RhoA-Expression beobachtet, die mit der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien einherging. Hier konnte im Effektorpull-down-Assay in der Tat ein Rückgang der RhoA-Aktivierung gezeigt werden. Zum gleichen Zeitpunkt trat zwar auch eine Verminderung der Rac1-Aktivität auf, die im Vergleich zu RhoA jedoch weniger stark ausgeprägt war. Die damit im Verhältnis zu aktivem RhoA relativ erhöhte Aktivität von Rac1

und vermutlich auch von Cdc42 dürfte für die beobachteten morphologischen Veränderungen verantwortlich sein.

In vaskulären glatten Muskelzellen hatte der partielle Knockdown von RhoGEF17 auch eine Abnahme der Cadherin-Expression zur Folge. Somit könnte auch ein Zusammenhang zwischen RhoGEF17 und dem Protein p120 Catenin bestehen, welches für die Stabilität von Cadherinen verantwortlich ist und an der Regulation von RhoGTPasen beteiligt ist [115]. p120 Catenin bindet an Cadherine und verhindert dadurch deren Internalisierung und den damit verbundenen Abbau [116]. Außerdem interagiert p120 Catenin mit RhoA und inhibiert dessen Aktivität, indem es als eine Art RhoGDI fungiert. Allerdings ist nur freies, d. h. nicht an Cadherine gebundenes p120 Catenin in der Lage RhoA zu inhibieren. Man vermutet, dass die Bindung an das Cadherin eine Konformationsänderung hervorruft, welche die Inhibition von RhoA aufhebt bzw. die Aktivierung durch einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor ermöglicht. Auf diese Weise reguliert p120 Catenin die Aktivierung von RhoA an Zell-Zell-Kontakten und vermittelt so die RhoA-abhängige Clusterbildung der Cadherine, die zur Stabilisierung der Zelladhäsion beiträgt [113], [115], [117]. In Myoblasten wird über die Rekrutierung und Aktivierung von RhoA durch den p120 Catenin/Cadherin-Komplex auch die Induktion der Skelettmuskeldifferenzierung reguliert [118]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass p120 Catenin auch die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 vermittelt, indem es mit dem RhoGEF Vav2 interagiert [119]. Entgegen erster Vermutungen scheint die Aktivierung von Rac1 nicht durch freies, im Zytoplasma vorliegendes, sondern durch Cadherin-gebundenes p120 Catenin vermittelt zu werden [115]. Die p120 Catenin-abhängige Regulation der RhoGTPasen wird folglich durch die Lokalisation von p120 Catenin bestimmt. Eine Akkumulation von p120 Catenin im Zytosol, wie sie nach dessen Überexpression auftritt, führt in den betroffenen Zellen zum Verlust von Actin-Stressfasern und in Abhängigkeit vom Zelltyp zu einer „dendritischen“ Zellgestalt oder der vermehrten Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien [113], [120]. Somit ruft die Überexpression von p120 Catenin den gleichen Phänotyp hervor wie die Reduktion der RhoGEF17-Expression in RASMC bzw. RTSMC. Aufgrund dieser Übereinstimmungen wurde bezüglich der Funktion von RhoGEF17 die folgende Hypothese aufgestellt: Im basalen Zustand könnte RhoGEF17 für die Stabilisation von p120 Catenin und RhoA am Cadherin verantwortlich sein. Folglich würde der Verlust von RhoGEF17 eine Translokation von RhoA und p120 Catenin ins Zytosol auslösen, da die Interaktion mit dem Cadherin ohne RhoGEF17 nicht aufrechterhalten werden könnte. Die Folge wäre eine Destabilisierung und schließlich der Abbau der Cadherine. Dies würde somit die Reduktion des Cadherin-Proteingehalts in den RhoGEF17-Knockdown-Zellen erklären. Desweiteren wäre das ungebundene, zytosolische p120 Catenin nun in der Lage RhoA zu inhibieren. Diese Inhibition würde dann den Verlust von Actin-Stressfasern sowie morphologische Veränderungen der Zelle nach sich ziehen.

Dieses Modell würde somit die im Zuge des RhoGEF17-Knockdowns auftretenden Veränderungen in den glatten Muskelzellen erklären. Ob diese Hypothese jedoch zutrifft und RhoGEF17 unter basalen Bedingungen tatsächlich als Stabilisator für p120 Catenin und RhoA an Cadherinen fungiert, kann nur durch weitere Untersuchungen beantwortet werden. Auch wenn für die basale Funktion von RhoGEF17 bisher nur Hypothesen ausgestellt werden können, so deuten die in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten darauf hin, dass RhoGEF17 für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts, welches zwischen den RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 in der Zelle besteht, von Bedeutung ist. Dieses Gleichgewicht zwischen den RhoGTPasen und den von ihnen ausgehenden Signalen bestimmt unter anderem die Organisation des Zytoskeletts und den daraus resultierenden Phänotyp der Zelle [121]. Die morphologischen Veränderungen, welche mit der Reduktion der RhoGEF17-Expression einhergehen, lassen somit den Schluss zu, dass der Verlust des Proteins eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von Rac1 und Cdc42 bewirkt. Folglich scheint RhoGEF17 sowohl in vaskulären als auch in trachealen glatten Muskelzellen unter basalen Bedingungen eine Rolle für die Aufrechterhaltung RhoA-abhängiger Signalwege zu spielen.

6.2. Einfluss von RhoGEF17 auf die Adhäsionsgeschwindigkeit der RASMC

Die Verminderung der RhoGEF17-Expression bewirkt nicht nur eine Veränderung von adhärenenten glatten Muskelzellen. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass nach der Ablösung der vaskulären glatten Muskelzellen von der Zellkulturschale und der anschließenden Aussaat in eine neue Schale eine Verzögerung der Adhäsion von Zellen mit vermindertem RhoGEF17-Gehalt auftritt. Der Adhäsionsprozess geht im Allgemeinen mit einer komplexen Änderung der Zellgestalt einher. Die nicht-adhärenente Zelle, die eine kugelige Form besitzt, flacht sich ab, bildet Zellmembranausläufer aus und vergrößert nach und nach ihre Oberfläche. Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Adhäsionsversuch zeigt, dass RASMC mit verminderter RhoGEF17-Expression nach der Aussaat deutlich länger eine abgekugelte Zellform beibehalten als die Kontroll-Zellen. Grundsätzlich sind die RhoGEF17-Knockdown-Zellen noch in der Lage sich an die Zellkulturschale anzuhafte und ihre Oberfläche zu vergrößern. Im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen scheint jedoch wesentlich mehr Zeit erforderlich zu sein bis dieser Prozess eingeleitet wird. Wie bereits diskutiert wurde, scheint sich die Verminderung der RhoGEF17-Expression in adhärenenten glatten Muskelzellen negativ auf die Aktivität von RhoA auszuwirken und dadurch Rac1- und Cdc42-abhängige Signale zu begünstigen. Eine solche Verschiebung des Aktivitätsgleichgewichtes sollte sich der Literatur zufolge eigentlich positiv auf den Adhäsionsprozess

auswirken. Normalerweise wird die Adhäsion durch die Interaktion von Integrinen mit extrazellulären Matrixproteinen initiiert [122]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Zellen direkt auf die Plastikoberfläche der Zellkulturschale ohne vorherige Beschichtung mit Matrixproteinen ausgesät wurden, ist eine Beteiligung von Integrinen an der Zelladhäsion auch in diesem Fall wahrscheinlich, da die Aussaat in serumhaltigem Medium stattfand. Verschiedene Studien zeigen, dass sich das im Serum enthaltene Protein Vitronectin, welches Integrine binden kann, an die Plastikoberfläche anlagert und dadurch entscheidend zur Anhaftung der Zellen beiträgt [123], [124]. Zudem synthetisieren und sezernieren die Zellen selbst Matrixproteine [125], [126]. Die Bindung der Integrine an ihre Liganden setzt dann in der Zelle eine Signalkaskade in Gang, die unter anderem zur Aktivierung von Rac1 und Cdc42 führt [127], [128]. Dadurch wird die Ausbildung von Zellmembranausläufern induziert, welche die Oberflächenvergrößerung und die Ausbreitung der Zelle auf der Matrix, das sogenannte „Spreading“, vorantreibt. Die Aktivierung der Integrine ruft zudem auch eine transiente Reduktion der RhoA-Aktivität hervor [129], [130]. Dadurch wird die Kontraktilität der Zelle herabgesetzt und die Bildung von Membranausläufern erleichtert [128]. Allerdings zeigen neuere Untersuchungen zur Aktivität der RhoGTPasen während der Migration von Zellen, dass neben Rac1 und Cdc42 auch RhoA für die Ausbildung von Membranausläufern benötigt wird [131], [132], [133]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mit Hilfe von Biosensoren nachweisen, dass RhoA direkt am Rand der Membranausstülpung synchron zu deren Vorwärtsbewegung aktiviert wird. Es wird vermutet, dass RhoA für die Initiation der Vorwärtsbewegung der Zelle verantwortlich ist, indem es seinen Effektor mDia aktiviert und dadurch die Polymerisation von Actin hervorruft, welche dann die Ausbildung des Membranausläufers steuert. Die kurz nach der RhoA-Aktivierung eintretende Aktivierung von Rac1 und Cdc42 scheint für die Verstärkung und Stabilisierung des neu ausgebildeten Membranausläufers verantwortlich zu sein. Diese Untersuchungen machen deutlich, dass Vorgänge wie das „Spreading“ der Zelle bei der Adhäsion bzw. der Migration eine strikte zeitliche und räumliche Kontrolle der Aktivität der beteiligten RhoGTPasen erfordern. Ein veränderter Gehalt und/oder eine veränderte Lokalisation von RhoA sowie eine dadurch verminderte Aktivität, wie sie bereits im Hinblick auf die morphologischen Veränderungen in RhoGEF17-Knockdown-Zellen diskutiert wurden, könnte folglich eine Störung dieses Prozesses hervorrufen und somit die beobachtete Verzögerung der Adhäsion der vaskulären glatten Muskelzellen mit verminderter RhoGEF17-Expression bedingen.

Eine weitere Ursache für die verringerte Adhäsionsgeschwindigkeit der RhoGEF17-Knockdown-Zellen könnte auch die reduzierte Expression von Cadherinen sein. Zwar sind Cadherine vorrangig für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich, verschiedene Studien zeigen jedoch, dass sie auch in die Regulation der Zellmigration involviert sind. Beispielsweise verhindert die Inhibition von N-Cadherin durch neutralisierende Antikörper die

Ausbildung von Membranausläufern und die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen in einem Wundheilungs-Assay [134]. Auch die Migration von Myofibroblasten und die dabei stattfindende Ausbildung von Filopodien konnte durch den siRNA-vermittelten Knockdown von N-Cadherin effektiv gehemmt werden [135]. In Astrozyten beeinflusst N-Cadherin auch die Bildung von Fokaladhäsionen und wird für die Integrin-vermittelte Aktivierung und Rekrutierung von Cdc42 an die Vorderseite von migrierenden Astrozyten benötigt [136]. Andererseits könnte RhoGEF17 auch in die Regulation von Integrinen involviert sein. So könnte sich eine Verminderung der Expression von Integrinen an der Zelloberfläche oder eine reduzierte Affinität für die Liganden in der extrazellulären Matrix negativ auf die Adhäsion der Zellen auswirken. Für diese Hypothese spricht eine Untersuchung zur Adhäsion von Hepatozyten, die zeigt, dass der Beginn der Oberflächenvergrößerung nach der Aussaat von der Dichte der extrazellulären Matrix abhängt [137]. Je dichter die Matrix desto höher ist die Anzahl an Liganden, die für eine Bindung an Integrine an der Zelloberfläche zur Verfügung stehen. Die Aussaat von Hepatozyten auf einer Matrix mit niedriger Dichte führte zu einer Verzögerung des Beginns der Oberflächenzunahme im Vergleich mit Zellen, die auf einer Matrix mit höherer Dichte ausgesät wurden. Umgekehrt könnte also auch eine verringerte Expression oder Affinität von Integrinen an der Zelloberfläche die initiale Bindung an die Matrix erschweren und eine Verzögerung des Adhäsionsprozesses hervorrufen, wie dies in RhoGEF17-Knockdown-Zellen der Fall ist.

Der Einfluss von RhoGEF17 auf die Adhäsion von trachealen glatten Muskelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht. Stattdessen wurde das Proliferationsverhalten von trachealen glatten Muskelzellen mit verminderter Expression von RhoGEF17 analysiert. Dabei zeigte sich, dass RTSMC mit reduzierter RhoGEF17-Expression deutlich langsamer proliferieren als die Kontroll-Zellen. Da die Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix unter physiologischen Bedingungen auch für die Regulation des Zellzyklus von Bedeutung ist ([138]), liegt die Vermutung nahe, dass die verringerte Proliferation der RhoGEF17-depletierten RTSMC auf eine Störung der Adhäsion, wie sie in vaskulären glatten Muskelzellen auftritt, zurückzuführen ist.

6.3. Die cGMP-induzierte RhoGEF17-abhängige Aktivierung von RhoA

In Übereinstimmung mit den Daten von Marion Mohl konnte in der hier vorliegenden Arbeit nach Stimulation von RASMC mit dem stabilen cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP eine von RhoGEF17 abhängige Aktivierung der GTPase RhoA beobachtet werden. Die densitometrische und statistische Auswertung der Versuche ergab, dass cGMP im Vergleich zu Serum eine eher geringe Aktivierung von RhoA hervorrief, die jedoch statistisch signifikant

war. Die eher schwache Aktivierung von RhoA durch cGMP könnte darauf hindeuten, dass es sich hierbei um eine lokal begrenzte Aktivierung handelt, die nur in einem bestimmten Kompartiment der Zelle stattfindet und von der Lokalisation der anderen Komponenten des Signalweges, wie RhoGEF17 und cGKI α , abhängig ist. Wie weitere Experimente zeigten, führte die Überexpression der cGKI α im Vergleich zu RASMC mit ausschließlich endogener cGKI α -Expression zu einem zusätzlichen Anstieg der cGMP-induzierten RhoA-Aktivität. Möglicherweise ist die cGKI α der limitierende Faktor dieses Signalweges, dessen Verfügbarkeit über das Ausmaß der RhoA-Aktivität nach Stimulation mit cGMP entscheidet. Die cGKI α reguliert neben RhoGEF17 noch verschiedene andere Proteine, so dass unter normalen Bedingungen sicherlich nur ein begrenzter Pool für die Aktivierung von RhoGEF17 zur Verfügung steht.

Die Überexpression der cGKI α und die damit verbundene Verstärkung der cGMP-induzierten RhoA-Aktivität, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte, weist zudem darauf hin, dass die cGKI α unter bestimmten Bedingungen wohl auch einen positiven Einfluss auf die Aktivierung von RhoA haben kann. Dieser Beobachtung steht natürlich die vielfach belegte cGKI-vermittelte Hemmung RhoA-abhängiger Funktionen gegenüber, die durch die Phosphorylierung von RhoA am Serinrest 188 ausgelöst wird [79], [85], [86], [87]. Die daraus resultierende Inhibition der RhoA-Aktivität wird auf eine verstärkte Interaktion des phosphorylierten RhoA mit RhoGDI und einer damit verbundenen Translokation des RhoA/RhoGDI-Komplexes von der Membran ins Zytosol zurückgeführt [87], [139]. Dieser Vorgang schützt dann die GTPase RhoA, insbesondere ihre GTP-gebundene Form, vor dem Abbau durch das Proteasom, wodurch es zu einer Akkumulation von GTP-gebundenem RhoA im Zytosol der Zelle kommt [139]. Interessant ist hierbei die Tatsache, dass gerade GTP-gebundenes RhoA in der Zelle akkumuliert. Für die zitierte Studie von Rolli-Derkinderen und Kollegen wurden ebenfalls RASMC mit 8-pCPT-cGMP stimuliert. Der Inkubationszeitraum war mit 24 h jedoch beträchtlich länger als in der hier vorliegenden Arbeit und am Ende dieser 24-stündigen Inkubation mit cGMP hatte nahezu der komplette RhoA-Pool der Zelle GTP gebunden und lag im Zytosol vor [139]. Da der in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte Effektorpulldown-Assay keine Auskunft über die Lokalisation des GTP-gebundenen RhoA oder die Assoziation mit RhoGDI gibt, ist es natürlich durchaus denkbar, dass der beobachtete cGMP/cGKI α /RhoGEF17-induzierte Anstieg der Menge an GTP-gebundenem RhoA ebenfalls auf eine Akkumulation von RhoGDI/RhoA-GTP-Komplexen im Zytosol zurückzuführen ist.

In der Studie von Rolli-Derkinderen und Kollegen wird nicht darauf eingegangen, wie das GTP-gebundene RhoA zuvor aktiviert wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den Daten von Marion Mohl jedoch gezeigt werden, dass die cGMP-induzierte Aktivierung von RhoA nur in Anwesenheit von RhoGEF17 auftritt.

Wenn der hier beobachtete Anstieg der Menge an GTP-gebundenem RhoA nun auch auf eine Akkumulation von RhoA-GTP im Zytosol zurückzuführen sein sollte, dann würde dies bedeuten, dass die cGKI α als Aktivator von RhoGEF17 zunächst dafür sorgt, dass RhoA aktiviert wird, um dann durch Phosphorylierung dessen Komplexbildung mit RhoGDI zu fördern. Durch die Bindung an RhoGDI wäre die aktivierte GTPase dann sowohl vor dem proteasomalen Abbau als auch vor der Inaktivierung durch RhoGAPs geschützt. In der Literatur wird darüber diskutiert, dass dieser Mechanismus möglicherweise dazu dient, die GTP-gebundene GTPase zu stabilisieren, so dass nach der Dissoziation des RhoGDI/RhoA-Komplexes sofort eine aktivierte GTPase für die Bindung an Effektoren zur Verfügung steht, ohne dass eine Aktivierung durch ein weiteres RhoGEF notwendig wird [140], [141].

Es ist natürlich auch vorstellbar, dass der RhoGEF17-induzierte Guaninnukleotid-Austausch unter bestimmten Bedingungen auch zu einer Aktivierung von RhoA-abhängigen Signalwegen führt und somit der cGKI-induzierten Inhibition von RhoA entgegenwirkt. Dies könnte dann der Fall sein, wenn nicht genügend freies RhoGDI vorhanden wäre, um mit dem GTP-gebundenen RhoA zu interagieren und RhoA stattdessen mit seinen Effektoren in Wechselwirkung treten könnte. Eine mögliche Ursache für solch ein Missverhältnis zwischen RhoGDI- und RhoA-Menge könnte ein Anstieg der RhoA-Expression sein, wie er unter pathologischen Bedingungen auftritt. So wurden beispielsweise in Kardiomyozyten von diabetischen Ratten, welche an einer kontraktile Dysfunktion des Herzens leiden, ein Anstieg des RhoA-Proteingehalts und gleichzeitig auch eine verstärkte Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges beobachtet. Der gesteigerte RhoA-Gehalt konnte auf eine vermehrte Produktion von NO, welches die Expression der GTPase induziert, zurückgeführt werden [142]. Im Hinblick auf RhoGEF17 lässt sich hier natürlich die Hypothese aufstellen, dass sich die gesteigerte NO-Produktion durch die Aktivierung der cGMP/cGKI-Signalkaskade auch positiv auf die Aktivität von RhoGEF17 auswirkt und dies der Grund für die verstärkte Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges ist. Dass die NO/cGMP/cGK-Signalkaskade durchaus auch einen stimulierenden Einfluss auf RhoA-abhängige Signalwege haben kann, dafür sprechen auch Untersuchungen an Nervenzellen, in denen unter pathologischen Bedingungen ebenfalls eine NO/cGMP/cGK-abhängige Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges auftritt [143].

Ob die cGMP/cGKI/RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung in trachealen glatten Muskelzellen eine Rolle spielt ist fraglich. In der hier vorliegenden Arbeit führte die Stimulation von trachealen glatten Muskelzellen mit cGMP unter den gleichen Bedingungen wie in vaskulären glatten Muskelzellen nicht zu einer Aktivierung von RhoA. Die Untersuchung von Taniguchi und Kollegen zur Sensitivität von vaskulärem und trachealem glatten Muskel gegenüber cGMP liefert eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied [144]. Die Arbeits-

gruppe konnte zeigen, dass die maximale Aktivität der cGKI, welche durch cGMP induziert werden kann, in trachealem Muskelgewebe deutlich niedriger ist als in pulmonalem Gefäßmuskulgewebe. Bei gleicher cGMP-Konzentration ist die cGKI-Aktivität im vaskulären Muskel also deutlich höher als im trachealen Muskel. Möglicherweise kann deshalb keine ausreichende Stimulation von RhoGEF17 induziert werden. Da eine andere Studie dieser Arbeitsgruppe zudem ergab, dass auch die Ansprechbarkeit des trachealen glatten Muskels auf NO, welches die Bildung von cGMP in der Zelle auslöst, im Vergleich zum pulmonalen Gefäßmuskel deutlich geringer ausfällt ([145]), ist die Überlegung naheliegend, dass die cGMP-induzierte Aktivierung von RhoGEF17 in trachealen glatten Muskelzellen unter physiologischen Bedingungen keine Rolle spielt und in diesem Muskeltyp die basale Funktion von RhoGEF17 im Vordergrund steht.

6.4. Der Einfluss von cGMP auf die Adhäsion von RASMC in An- und Abwesenheit von RhoGEF17

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass cGMP unter bestimmten Bedingungen die Adhäsion von vaskulären glatten Muskelzellen fördert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien, die sowohl für primäre glatte Muskelzellen der Mauseorta als auch für passagierte glatte Muskelzellen der Rattenaorta eine cGMP-vermittelte Stimulation der Adhäsion beschreiben [109], [146]. Weinmeister und Kollegen konnten zeigen, dass dieser cGMP-Effekt durch die cGKI vermittelt wird. Desweiteren deuten ihre Daten darauf hin, dass der proadhäsive Effekt des cGMP/cGKI-Signalweges auf eine verstärkte Expression von Integrinen an der Zelloberfläche sowie eine Hemmung des RhoA/ROCK-Signalweges zurückzuführen ist [109]. Auch in der Studie von Rolli-Derkinderen und Kollegen spielt die cGMP/cGKI/RhoA-Achse eine entscheidende Rolle für die Stimulation der Adhäsion und auch der Migration von vaskulären glatten Muskelzellen [146]. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der pro-adhäsive, sowie der ebenfalls beobachtete pro-migratorische Effekt von cGMP durch die cGKI-vermittelte Phosphorylierung von RhoA ausgelöst wurden. Diese Phosphorylierung begünstigt, wie bereits beschrieben wurde, die Interaktion von RhoA mit RhoGDI [87], [139]. Dies führte in diesem Fall zur Freisetzung von RhoGDI-gebundenem Rac1, welches dann an die Plasmamembran transloziert und dort durch den Austauschfaktor Vav3 aktiviert wird. Rolli-Derkinderen und Kollegen schlussfolgerten daraus, dass phosphoryliertes RhoA die GTPase Rac1 aus dem Komplex mit RhoGDI verdrängt und dadurch seine Aktivierung ermöglicht.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass auch RhoGEF17 in die cGMP-abhängige Stimulation der Adhäsion involviert ist. Hierfür spricht, dass die Behandlung mit cGMP keinen Einfluss auf die Adhäsionsgeschwindigkeit von RASMC mit ver-

minderter RhoGEF17-Expression hatte. Da RhoGEF17 bereits unter basalen Bedingungen eine pro-adhäsive Wirkung zu haben scheint, könnte die Aktivierung von RhoGEF17 durch den cGMP/cGKI-Signalweg diese Funktion noch verstärken.

6.5. Der Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP-induzierte Relaxation von RASMC

Um zu klären, ob die cGMP/cGKI/RhoGEF17-induzierte RhoA-Aktivierung für die physiologische Funktion von vaskulären glatten Muskelzellen von Bedeutung ist, wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss dieses Signalweges auf die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der Zellen untersucht. In Bezug auf die Auslösung von Kontraktions- und Relaxationsvorgängen stellt RhoGEF17 theoretisch ein Bindeglied zwischen zwei entgegengesetzten Signalwegen dar: RhoA verstärkt die Kontraktion [55], während cGMP, unter anderem durch die Hemmung von RhoA, die Relaxation der Zelle bedingt [79]. Im Hinblick auf die Funktion von RhoGEF17 sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Collagen-Kontraktions-Assay die folgende Hypothese überprüft werden: Wenn die cGMP-vermittelte Aktivierung von RhoGEF17 die RhoA-Aktivität auch während der Relaxation stimuliert, und dieser somit in gewissem Maße entgegenwirkt, dann sollte der Verlust von RhoGEF17, eine erhöhte Relaxationsfähigkeit der Zellen zur Folge haben. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Interessanterweise führte die Reduktion der RhoGEF17-Expression nicht wie erwartet zu einer Verstärkung der cGMP-induzierten Relaxation, sondern resultierte stattdessen in einer Inhibition der cGMP-induzierten Relaxation. Wie die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung scheint somit auch dieser cGMP-Effekt von der Anwesenheit von RhoGEF17 abhängig zu sein. Der Verlust der cGMP-induzierten Relaxation in RASMC mit reduzierter RhoGEF17-Expression widerlegt jedoch die zunächst naheliegende Vermutung, dass RhoGEF17 durch die Erhöhung der RhoA-Aktivität der cGMP-induzierten Relaxation entgegenwirkt, indem es die RhoA-abhängige Kontraktion fördert. Somit wirft diese Beobachtung natürlich die Frage auf, welche Funktion RhoGEF17 im Rahmen der cGMP-induzierten Relaxation ausübt. Im Hinblick auf die bereits diskutierte cGKI-vermittelte Inhibition von RhoA könnte man vermuten, dass die cGKI unter bestimmten Bedingungen ohne RhoGEF17 nicht in der Lage ist, RhoA effektiv zu hemmen.

Desweiteren deuten die Ergebnisse des Collagen-Kontraktions-Assay darauf hin, dass die partielle Depletion von RhoGEF17 eine Reduktion der basalen Kontraktionsfähigkeit der RASMC zur Folge hat. Dies könnte auf die Veränderungen des Actin-Zytoskeletts, die mit der Reduktion der RhoGEF17-Expression einhergehen, zurückzuführen sein. Vor allem der dabei auftretende Verlust von Actin-Stressfasern könnte die Grundspannung der Zelle vermindern und ihre Fähigkeit die Collagenmatrix zu kontrahieren beeinträchtigen. Wie die

Behandlung mit FCS zeigte, hatte die Verminderung des RhoGEF17-Gehalts jedoch keinen Einfluss auf die Agonist-induzierte Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen. Vermutlich können die im Serum enthaltenen Stimuli den Effekt, den die Reduktion der RhoGEF17 Expression unter basalen Bedingungen auf die RASMC hat, ausgleichen.

6.6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten erste Anhaltspunkte für die endogene Funktion von RhoGEF17 in vaskulären und trachealen glatten Muskelzellen aufgezeigt werden. Die Daten deuten darauf hin, dass RhoGEF17 für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität von Bedeutung ist und eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Da allein die Reduktion der Expression von RhoGEF17 drastische Veränderungen der Zellmorphologie, des Actin-Zytoskeletts und der Adhäsion bewirkt, ist die Überlegung naheliegend, dass RhoGEF17 unter basalen Bedingungen als Gerüst- oder Adapterprotein fungiert. Diesbezüglich könnten zukünftige Untersuchungen zur Lokalisation von RhoGEF17 in der glatten Muskelzelle sowie zu möglichen Interaktionspartnern, wie z. B. p120 Catenin, Aufschluss geben.

Desweiteren deuten die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten darauf hin, dass RhoGEF17 zumindest in vaskulären glatten Muskelzellen für die Vermittlung cGMP-abhängiger Signale von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, inwieweit die beobachtete cGMP/RhoGEF17-abhängige Steigerung der GTP-gebundenen Menge an RhoA eine „echte“ RhoA-Aktivierung darstellt und die Aktivierung von RhoA-Effektoren, wie z. B. ROCK und mDia, auslöst oder aber auf eine Akkumulation von RhoGDI-gebundenem RhoA-GTP zurückzuführen ist. Hierzu könnte die Visualisierung der cGMP/RhoGEF17-abhängigen RhoA-Aktivierung mit Hilfe von Biosensoren sowie eine Analyse der Aktivität von RhoA-Effektoren hilfreich sein.

Abgesehen von weiteren zellbasierten Studien könnte sicherlich auch eine Analyse der RhoGEF17-Expression in glattmuskulärem Gewebe aus verschiedenen Tiermodellen für Erkrankungen der Gefäße bzw. der Atemwege zur Aufklärung der physiologischen bzw. pathophysiologischen Relevanz der basalen als auch der cGMP-abhängigen Funktion von RhoGEF17 beitragen.

7. Literaturverzeichnis

1. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
2. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 153-208.
3. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 117-27.
4. Colicelli, J., *Human RAS superfamily proteins and related GTPases*. Sci STKE, 2004. **2004**(250): p. RE13.
5. Zerial, M. and H. McBride, *Rab proteins as membrane organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 107-17.
6. Nie, Z., D.S. Hirsch, and P.A. Randazzo, *Arf and its many interactors*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 396-404.
7. Weis, K., *Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle*. Cell, 2003. **112**(4): p. 441-51.
8. Wennerberg, K. and C.J. Der, *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.
9. Zong, H., K. Kaibuchi, and L.A. Quilliam, *The insert region of RhoA is essential for Rho kinase activation and cellular transformation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5287-98.
10. Thapar, R., A.E. Karnoub, and S.L. Campbell, *Structural and biophysical insights into the role of the insert region in Rac1 function*. Biochemistry, 2002. **41**(12): p. 3875-83.
11. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
12. Hall, A. and C.D. Nobes, *Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000. **355**(1399): p. 965-70.
13. Glotzer, M., *Animal cell cytokinesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 351-86.
14. Settleman, J., *Rho GTPases in development*. Prog Mol Subcell Biol, 1999. **22**: p. 201-29.
15. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 23-32.
16. Braga, V.M., *Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion*. Mol Pathol, 1999. **52**(4): p. 197-202.
17. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. **81**(1): p. 53-62.
18. Nobes, C. and M. Marsh, *Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake?* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R739-41.
19. Caron, E. and A. Hall, *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1717-21.
20. Yamamoto, M., et al., *ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle*. Oncogene, 1993. **8**(6): p. 1449-55.

21. Olson, M.F., A. Ashworth, and A. Hall, *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1*. *Science*, 1995. **269**(5228): p. 1270-2.
22. Aznar, S. and J.C. Lacal, *Rho signals to cell growth and apoptosis*. *Cancer Lett*, 2001. **165**(1): p. 1-10.
23. Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman, *The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF*. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1159-70.
24. Minden, A., et al., *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1147-57.
25. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. *Biochem J*, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
26. Paterson, H.F., et al., *Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology*. *J Cell Biol*, 1990. **111**(3): p. 1001-7.
27. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 389-99.
28. Pellegrin, S. and H. Mellor, *Actin stress fibres*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 20): p. 3491-9.
29. Amano, M., et al., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
30. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. *Science*, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
31. Maekawa, M., et al., *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase*. *Science*, 1999. **285**(5429): p. 895-8.
32. Watanabe, N., et al., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*. *EMBO J*, 1997. **16**(11): p. 3044-56.
33. Watanabe, N., et al., *Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(3): p. 136-43.
34. Ridley, A.J., et al., *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 401-10.
35. Miki, H., et al., *IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling*. *Nature*, 2000. **408**(6813): p. 732-5.
36. Rohatgi, R., et al., *The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly*. *Cell*, 1999. **97**(2): p. 221-31.
37. Bernards, A. and J. Settleman, *GAP control: regulating the regulators of small GTPases*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(7): p. 377-85.
38. Dovas, A. and J.R. Couchman, *RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities*. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 1-9.
39. Eva, A. and S.A. Aaronson, *Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma*. *Nature*, 1985. **316**(6025): p. 273-5.
40. Hart, M.J., et al., *Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product*. *Nature*, 1991. **354**(6351): p. 311-4.
41. Hart, M.J., et al., *Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(1): p. 62-5.
42. Schmidt, A. and A. Hall, *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch*. *Genes Dev*, 2002. **16**(13): p. 1587-609.

43. Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek, *GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 167-80.
44. Cherfils, J. and P. Chardin, *GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(8): p. 306-11.
45. Zheng, Y., *Dbl family guanine nucleotide exchange factors*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(12): p. 724-32.
46. Rossman, K.L., et al., *A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange*. EMBO J, 2002. **21**(6): p. 1315-26.
47. Rossman, K.L., et al., *Multifunctional roles for the PH domain of Dbs in regulating Rho GTPase activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18393-400.
48. Kristelly, R., G. Gao, and J.J. Tesmer, *Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47352-62.
49. Lutz, S., et al., *Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1923-7.
50. Chen, R.H., S. Corbalan-Garcia, and D. Bar-Sagi, *The role of the PH domain in the signal-dependent membrane targeting of Sos*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1351-9.
51. Bellanger, J.M., et al., *The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(12): p. 888-92.
52. Rolfe, B.E., et al., *Rho and vascular disease*. Atherosclerosis, 2005. **183**(1): p. 1-16.
53. Beckers, C.M., V.W. van Hinsbergh, and G.P. van Nieuw Amerongen, *Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity*. Thromb Haemost, 2010. **103**(1): p. 40-55.
54. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
55. Hilgers, R.H. and R.C. Webb, *Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho*. Exp Biol Med (Maywood), 2005. **230**(11): p. 829-35.
56. Wuertz, C.M., et al., *p63RhoGEF--a key mediator of angiotensin II-dependent signaling and processes in vascular smooth muscle cells*. FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4865-76.
57. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
58. Mack, C.P., et al., *Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 341-7.
59. Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. Neth Heart J, 2007. **15**(3): p. 100-8.
60. Poulos, T.L., *Soluble guanylate cyclase*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(6): p. 736-43.
61. Kobialka, M. and W.A. Gorczyca, *Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation*. Acta Biochim Pol, 2000. **47**(3): p. 517-28.

62. Lincoln, T.M. and T.L. Cornwell, *Intracellular cyclic GMP receptor proteins*. FASEB J, 1993. **7**(2): p. 328-38.
63. Francis, S.H., M.A. Blount, and J.D. Corbin, *Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions*. Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 651-90.
64. Hofmann, F., *The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 1-4.
65. Raeymaekers, L., F. Hofmann, and R. Casteels, *Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle*. Biochem J, 1988. **252**(1): p. 269-73.
66. Cornwell, T.L., et al., *Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 1991. **40**(6): p. 923-31.
67. Schlossmann, J., et al., *Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 197-201.
68. Tang, K.M., et al., *Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1506-12.
69. Osei-Owusu, P., et al., *Regulation of RGS2 and second messenger signaling in vascular smooth muscle cells by cGMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31656-65.
70. Rashatwar, S.S., T.L. Cornwell, and T.M. Lincoln, *Effects of 8-bromo-cGMP on Ca²⁺ levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of Ca²⁺-ATPase by cGMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5685-9.
71. Furukawa, K., Y. Tawada, and M. Shigekawa, *Regulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(17): p. 8058-65.
72. Vrolix, M., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca²⁺ pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol*. Biochem J, 1988. **255**(3): p. 855-63.
73. Alioua, A., J.P. Huggins, and E. Rousseau, *PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(6 Pt 1): p. L1057-63.
74. Fukao, M., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10927-35.
75. Jackson, W.F., *Ion channels and vascular tone*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 173-8.
76. Surks, H.K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1583-7.
77. Wooldridge, A.A., et al., *Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34496-504.
78. Nakamura, K., et al., *cGMP-dependent relaxation of smooth muscle is coupled with the change in the phosphorylation of myosin phosphatase*. Circ Res, 2007. **101**(7): p. 712-22.

79. Sauzeau, V., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21722-9.
80. Lincoln, T.M., N. Dey, and H. Sellak, *Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression*. J Appl Physiol, 2001. **91**(3): p. 1421-30.
81. Lincoln, T.M., et al., *Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 356-67.
82. Pilz, R.B. and D.E. Casteel, *Regulation of gene expression by cyclic GMP*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1034-46.
83. Rumenapp, U., et al., *A mammalian Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor (p164-RhoGEF) without a pleckstrin homology domain*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 721-8.
84. Winkler, S., et al., *GrinchGEF--a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(4): p. 1280-6.
85. Sawada, N., et al., *cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 798-805.
86. Gudi, T., et al., *cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37382-93.
87. Ellerbroek, S.M., K. Wennerberg, and K. Burridge, *Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19023-31.
88. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
89. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
90. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
91. Benard, V. and G.M. Bokoch, *Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods*. Methods Enzymol, 2002. **345**: p. 349-59.
92. Ren, X.D. and M.A. Schwartz, *Determination of GTP loading on Rho*. Methods Enzymol, 2000. **325**: p. 264-72.
93. He, T.C., et al., *A simplified system for generating recombinant adenoviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2509-14.
94. Luo, J., et al., *A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1236-47.
95. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
96. Arber, W., *Restriction endonucleases*. Angew Chem Int Ed Engl, 1978. **17**(2): p. 73-9.
97. McDonell, M.W., M.N. Simon, and F.W. Studier, *Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels*. J Mol Biol, 1977. **110**(1): p. 119-46.
98. Ridley, A.J., *The GTP-binding protein Rho*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(11): p. 1225-9.
99. Takeichi, M., *The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis*. Development, 1988. **102**(4): p. 639-55.

100. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 237-52.
101. Cornwell, T.L., et al., *Regulation of the expression of cyclic GMP-dependent protein kinase by cell density in vascular smooth muscle cells*. J Vasc Res, 1994. **31**(6): p. 330-7.
102. Cornwell, T.L. and T.M. Lincoln, *Regulation of intracellular Ca²⁺ levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca²⁺ by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1989. **264**(2): p. 1146-55.
103. Wyatt, T.A., et al., *ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 2): p. H448-55.
104. Wolfe, L., J.D. Corbin, and S.H. Francis, *Characterization of a novel isozyme of cGMP-dependent protein kinase from bovine aorta*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7734-41.
105. Keilbach, A., P. Ruth, and F. Hofmann, *Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies*. Eur J Biochem, 1992. **208**(2): p. 467-73.
106. Geiselhoring, A., et al., *Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues*. FEBS Lett, 2004. **575**(1-3): p. 19-22.
107. Smolenski, A., et al., *Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20029-35.
108. Butt, E., et al., *cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14509-17.
109. Weinmeister, P., et al., *Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase I promotes adhesion of primary vascular smooth muscle cells*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4434-41.
110. Pfeifer, A., et al., *Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3045-51.
111. Fukata, Y., M. Amano, and K. Kaibuchi, *Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(1): p. 32-9.
112. Sekimata, M., et al., *Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17757-62.
113. Anastasiadis, P.Z., et al., *Inhibition of RhoA by p120 catenin*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 637-44.
114. Worth, N.F., et al., *Rho expression and activation in vascular smooth muscle cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 2004. **59**(3): p. 189-200.
115. Anastasiadis, P.Z., *p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(1): p. 34-46.
116. Kowalczyk, A.P. and A.B. Reynolds, *Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(5): p. 522-7.
117. Castano, J., et al., *Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(5): p. 1745-57.

118. Taulet, N., et al., *N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis*. J Biol Chem, 2009. **284**(34): p. 23137-45.
119. Noren, N.K., et al., *p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases*. J Cell Biol, 2000. **150**(3): p. 567-80.
120. Grosheva, I., et al., *p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 4): p. 695-707.
121. Moorman, J.P., et al., *A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 47-57.
122. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
123. Steele, J.G., G. Johnson, and P.A. Underwood, *Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene*. J Biomed Mater Res, 1992. **26**(7): p. 861-84.
124. Steele, J.G., et al., *Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment*. J Biomater Sci Polym Ed, 1993. **5**(3): p. 245-57.
125. van Wachem, P.B., et al., *Adsorption of fibronectin derived from serum and from human endothelial cells onto tissue culture polystyrene*. J Biomed Mater Res, 1987. **21**(11): p. 1317-27.
126. Evans, M.D. and J.G. Steele, *Polymer surface chemistry and a novel attachment mechanism in corneal epithelial cells*. J Biomed Mater Res, 1998. **40**(4): p. 621-30.
127. Partridge, M.A. and E.E. Marcantonio, *Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(10): p. 4237-48.
128. Huvener, S. and E.H. Danen, *Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 8): p. 1059-69.
129. Ren, X.D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz, *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. EMBO J, 1999. **18**(3): p. 578-85.
130. Arthur, W.T. and K. Burridge, *RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(9): p. 2711-20.
131. Kurokawa, K. and M. Matsuda, *Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4294-303.
132. Pertz, O., et al., *Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells*. Nature, 2006. **440**(7087): p. 1069-72.
133. Machacek, M., et al., *Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 99-103.
134. Jones, M., et al., *N-cadherin upregulation and function in response of smooth muscle cells to arterial injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(12): p. 1972-7.
135. De Wever, O., et al., *Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4691-703.
136. Camand, E., et al., *N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration*. J Cell Sci, 2012.

137. Mooney, D.J., R. Langer, and D.E. Ingber, *Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2311-20.
138. Danen, E.H. and K.M. Yamada, *Fibronectin, integrins, and growth control*. J Cell Physiol, 2001. **189(1)**: p. 1-13.
139. Rolli-Derkinderen, M., et al., *Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96(11)**: p. 1152-60.
140. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, *GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends Cell Biol, 2005. **15(7)**: p. 356-63.
141. Dransart, E., B. Olofsson, and J. Cherfils, *RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation*. Traffic, 2005. **6(11)**: p. 957-66.
142. Soliman, H., et al., *Role of inducible nitric oxide synthase in induction of RhoA expression in hearts from diabetic rats*. Cardiovasc Res, 2008. **79(2)**: p. 322-30.
143. Sunico, C.R., et al., *Nitric oxide induces pathological synapse loss by a protein kinase G-, Rho kinase-dependent mechanism preceded by myosin light chain phosphorylation*. J Neurosci, 2010. **30(3)**: p. 973-84.
144. Taniguchi, M., et al., *Nitric oxide sensitivity in pulmonary artery and airway smooth muscle: a possible role for cGMP responsiveness*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290(5)**: p. L1018-27.
145. Kwak, Y.L., et al., *NO responsiveness in pulmonary artery and airway smooth muscle: the role of cGMP regulation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290(1)**: p. L200-8.
146. Rolli-Derkinderen, M., et al., *RhoA phosphorylation induces Rac1 release from guanine dissociation inhibitor alpha and stimulation of vascular smooth muscle cell migration*. Mol Cell Biol, 2010. **30(20)**: p. 4786-96.

Dissertationen

Mohl, Marion: *Untersuchung zur Expression, Spezifität und Regulation der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren RhoGEF10 und RhoGEF17*, Dissertation, Universität Heidelberg, 2007