

**Untersuchung zur Expression, Spezifität und
Regulation der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren
RhoGEF10 und RhoGEF17**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Marion Mohl

aus Reutlingen

September 2007

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. Ulrich Hilgenfeldt

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Familie und Freunde

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| I. Inhaltsverzeichnis | I |
| II. Abbildungsverzeichnis | VI |
| III. Tabellenverzeichnis | VIII |
| IV. Abkürzungsverzeichnis | IX |
| | |
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Summary | 2 |
| 3. Einleitung | 3 |
| 3.1 Monomere GTP-bindende Proteine | 3 |
| 3.1.1 Die Ras-Superfamilie | 3 |
| 3.1.2 GTPase-Domäne der monomeren GTPasen | 3 |
| 3.1.3 Lipidmodifikation der monomeren GTPasen | 4 |
| 3.2 Rho-GTPasen | 4 |
| 3.2.1 Funktion von RhoA, Rac1 und Cdc42 | 6 |
| 3.3 Akzessorische Proteine der Regulation der Rho-GTPasen | 7 |
| 3.3.1 RhoGAPs | 8 |
| 3.3.2 RhoGDIs | 8 |
| 3.3.3 RhoGEFs | 9 |
| 3.4 Regulation von RhoGEFs | 10 |
| 3.4.1 Aktivierung durch Entfernen intramolekularer, inhibitorischer Sequenzen sowie durch Phosphorylierung und Phospholipidbindung | 10 |
| 3.4.2 Aktivierung durch direkte Protein-Protein-Interaktion | 11 |
| 3.4.3 Regulation der RhoGEFs durch subzelluläre Lokalisation | 12 |
| 3.4.4 Inhibition der RhoGEFs | 13 |
| 3.5 Stickstoffmonoxid/zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat/cGMP-abhängige Protein-kinase-Signalkaskade | 13 |
| 3.5.1 Regulation der cGMP-Synthese | 13 |
| 3.5.2 Regulation der NO-sensitiven Guanylylzyklen | 13 |
| 3.5.3 Effektoren von cGMP | 14 |
| 3.5.4 cGMP-abhängige Proteinkinasen | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 Regulation des Gefäßtonus des glatten Muskels | 17 |
| 3.6.1 Regulation der Ca ²⁺ -abhängigen und Ca ²⁺ -unabhängigen Kontraktion des glatten Muskels | 17 |
| 3.6.2 Regulation der cGMP/cGKI-abhängigen Relaxation des glatten Muskels | 19 |
| 3.6.3 Einfluss der cGKI auf RhoA | 21 |
| 3.7 Zielsetzungen der Arbeit | 23 |
| 4. Material und Methoden | 24 |
| 4.1 Material | 24 |
| 4.1.1 Tiere | 24 |
| 4.1.2 Chemikalien | 24 |
| 4.1.3 Feinchemikalien | 24 |
| 4.1.4 Radiochemikalien | 24 |
| 4.1.5 Antikörper | 25 |
| 4.1.6 Enzyme | 26 |
| 4.1.7 Genspezifische Primer | 26 |
| 4.1.8 siRNA-Sequenzen und DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA | 28 |
| 4.1.9 Plasmide | 29 |
| 4.1.10 Klonierungen | 30 |
| 4.1.10.1 Tabellarische Übersicht der Klonierungen | 30 |
| 4.1.10.2 Schematische Darstellung der Klonierungen | 31 |
| 4.1.11 Bakterien | 37 |
| 4.1.12 Zellkultur | 37 |
| 4.1.13 Transfektionsreagenzien | 37 |
| 4.1.14 Verbrauchsmaterialien | 38 |
| 4.1.15 Sonstige Materialien | 38 |
| 4.1.16 Geräte | 38 |
| 4.2 Puffer und Nährmedien | 39 |
| 4.2.1 Puffer für molekularbiologische Methoden | 39 |
| 4.2.2 Puffer für proteinbiochemische Methoden | 39 |
| 4.2.3 Medien für die Zellkultur und Bakterienzucht | 44 |
| 4.3 Molekularbiologische Methoden | 45 |
| 4.3.1 Plasmid-DNA Präparation aus <i>E. coli</i> | 45 |
| 4.3.2 DNA-Fällung | 45 |
| 4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen | 46 |
| 4.3.4 DNA-Gelelektrophorese | 46 |
| 4.3.5 DNA-Sequenzierung | 46 |
| 4.3.6 Restriktion von DNA mit Endonukleasen | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden | 47 |
| 4.3.8 Enzymatische Verlängerung von DNA-Enden | 47 |
| 4.3.9 Verknüpfung von DNA-Molekülen mit der T4-DNA-Ligase | 47 |
| 4.3.10 Transformation von Bakterien | 48 |
| 4.3.11 Kryokonservierung von Bakterien | 48 |
| 4.3.12 RNA-Isolierung | 49 |
| 4.3.13 Reverse Transkription von RNA | 49 |
| 4.3.14 PCR | 49 |
| 4.3.15 Mutagenese | 50 |
| 4.3.16 Herstellung rekombinanter Adenoviren | 50 |
| 4.3.17 Klonierung von Haarnadelschleifen-shRNA-Inserts in einen Expressionsvektor (pAdTrack-CMV-shRNA) | 53 |
| 4.4 Proteinbiochemische Methoden | 54 |
| 4.4.1 Proteingewinnung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 54 |
| 4.4.2 SDS-PAGE | 54 |
| 4.4.3 Western Blot | 55 |
| 4.4.4 ROCK-Assay | 55 |
| 4.4.5 Coomassie-Färbung | 56 |
| 4.4.6 Protein-Konzentrationsbestimmung | 56 |
| 4.4.7 Kopplung des RhoGEF17-spezifischen Peptids an CNBr-aktivierte Sepharose 4B | 56 |
| 4.4.8 Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers RhoGEF17 | 57 |
| 4.4.9 Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 57 |
| 4.4.10 Zellfraktionierung | 58 |
| 4.4.11 Ko- bzw. Immunopräzipitation (IP) | 58 |
| 4.4.12 Pulldown-Assay | 59 |
| 4.4.13 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen für den GDP/GTP-Austausch-Assay | 60 |
| 4.4.14 GDP/GTP-Austausch-Assay | 60 |
| 4.4.15 Immunhistologie | 61 |
| 4.5 Zellbiologische Methoden | 62 |
| 4.5.1 Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen | 62 |
| 4.5.2 Trypsinieren und Passagieren von Zellkulturen | 63 |
| 4.5.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen | 63 |
| 4.5.4 Transiente Transfektion | 63 |
| 4.5.5 Adenovirale Infektion von Zellen | 65 |
| 4.5.6 SRE/SRF-Luciferase-Assay | 65 |
| 4.5.7 Färbung des Aktin-Zytoskeletts | 66 |

| | |
|--|------------|
| 4.5.8 Isolation von thorakalen Aorten und Kultivierung der isolierten, glattmuskulären Zellen | 67 |
| 5. Ergebnisse | 68 |
| 1. Teil | 69 |
| 5.1 Grundcharakterisierung von RhoGEF10 | 69 |
| 5.1.1 Klonierung und Expression von zwei humanen RhoGEF10-Varianten | 69 |
| 5.1.2 Theoretische Analyse der Proteinsequenz von RhoGEF10, Expression und subzelluläre Lokalisation | 71 |
| 5.1.3 RhoGEF10 aktiviert RhoA in vitro | 72 |
| 5.1.4 RhoGEF10 aktiviert RhoA-C in intakten Zellen | 73 |
| 5.1.5 Expression von RhoGEF10 in Endothelzellen | 76 |
| 2. Teil | 78 |
| 5.2 Regulation von RhoGEF17 | 78 |
| 5.2.1 Klonierung von RhoGEF17 | 78 |
| 5.2.2 RhoGEF17 aktiviert spezifisch RhoA-C | 79 |
| 5.2.3 Einfluss verschiedener Signalmediatoren auf die Regulation von RhoGEF17 | 80 |
| 5.2.4 Aktivierung von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α | 81 |
| 5.2.5 RhoGEF17 wird durch cGKI- α phosphoryliert und interagiert mit cGKI- α | 85 |
| 5.2.6 Putative cGK- bzw. PKA-Konsensusmotive des Proteins RhoGEF17 | 87 |
| 5.2.7 Bedeutung des N-Terminus von RhoGEF17 für dessen Aktivierbarkeit durch cGMP/cGKI- α | 87 |
| 5.2.8 Untersuchung der inhibitorisch wirkenden cGKI- α -Phosphorylierungsstelle im RhoGEF17- Δ N | 90 |
| 5.2.9 Einfluss der cGKI- α -Phosphorylierungsstelle SS1330/1331 auf die Aktivierung des Volllängenproteins RhoGEF17 | 93 |
| 5.2.10 Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP/cGKI- α vermittelte Hemmung der Serum-induzierten RhoA-Aktivierung | 95 |
| 5.2.11 Einfluss der Phosphorylierung von RhoA auf dessen Aktivierung durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α | 96 |
| 5.2.12 Regulation von RhoGEF17 durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus über ROCK | 99 |
| 5.3 Vaskuläre RhoA-Aktivierung durch RhoGEF17 | 103 |
| 5.3.1 Expression von RhoGEF17 in glattmuskulären Zellen der Aorta von Ratte und Maus | 103 |
| 5.3.2 Einfluss der Überexpression von RhoGEF17- Δ N und der cGMP-Stimulation auf die RhoA-Aktivierung in RASMC | 106 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.3 RhoGEF17-ΔN induzierte Stressfaserbildung in RASMC und HUVEC _____ | 107 |
| 5.3.4 Einfluss der RhoGEF17-Depletion auf die cGMP-abhängige RhoA-Aktivierung in RASMC _____ | 109 |
| 5.3.5 Einfluss von SNP auf die cGMP-abhängige RhoA-Aktivierung in RASMC _____ | 112 |
| 6. Diskussion _____ | 114 |
| 6.1 RhoGEF10 _____ | 114 |
| 6.1.1. Proteinsequenzanalyse _____ | 114 |
| 6.1.2. Expression von RhoGEF10 und alternatives Spleißen des Gens _____ | 115 |
| 6.1.3. RhoB Spezifität von RhoGEF10 _____ | 115 |
| 6.1.4 Physiologische Relevanz von RhoGEF10 _____ | 116 |
| 6.2. RhoGEF17 _____ | 116 |
| 6.2.1 Spezifität von RhoGEF17 für RhoGTPasen _____ | 116 |
| 6.2.2 RhoGEF17 wird spezifisch durch cGKI-α phosphoryliert und aktiviert _____ | 116 |
| 6.2.3 Der Einfluss von cGMP/cGKI-α auf die Aktivität von RhoA in An- und Abwesenheit von RhoGEF17 _____ | 118 |
| 6.2.4 Die ROCK-abhängige Verstärkung der cGMP/cGKI-α-induzierten RhoGEF17-Aktivierung _____ | 119 |
| 6.2.5 Physiologische Relevanz von RhoGEF17 _____ | 121 |
| 6.3 Ausblick _____ | 124 |
| 7. Literaturverzeichnis _____ | 125 |
| 8. Danksagung _____ | 146 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Der molekulare Schaltermechanismus monomerer Rho-GTPasen _____ | 10 |
| Abb. 2: Die cGMP-Signalkaskade in der glatten Muskulatur _____ | 15 |
| Abb. 3: Ca ²⁺ -abhängige und Ca ²⁺ -unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur _____ | 19 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der NO/cGMP/cGKI-vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur _____ | 21 |
| Abb. 5: DNA-Oligonukleotid-Matrixe für Haarnadelschleifen-shRNA _____ | 29 |
| Abb. 6: Schematische Darstellung der Klonierungen _____ | 36 |
| Abb. 7: Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels des pAdEasy1-Systems _____ | 51 |
| Abb. 8: Schematische Darstellung des Virusrings _____ | 53 |
| Abb. 9: Phylogenetischer Baum der Dbl-Subfamilie p164-RhoGEF, RhoGEF10 und GrinchGEF erstellt mit dem ClustalW-Computerprogramm _____ | 68 |
| Abb. 10: Primärsequenz und alternative Spleißvariante von RhoGEF10 _____ | 70 |
| Abb. 11: Abgeleitete Proteindomänenstruktur und subzelluläre Lokalisation von RhoGEF10 _____ | 72 |
| Abb. 12: Guaninnukleotid-Austauschaktivität von RhoGEF10 in vitro _____ | 73 |
| Abb. 13: RhoA-C spezifische Guaninnukleotid-Austauschaktivität von RhoGEF10-Varianten in intakten Zellen _____ | 74 |
| Abb. 14: Stimulation der RhoA-C vermittelten Gentranskription durch verschiedene RhoGEF10-Varianten _____ | 76 |
| Abb. 15: Endogene Expression von RhoGEF10 in Endothelzellen _____ | 77 |
| Abb. 16: Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur und Expression von RhoGEF17 und RhoGEF17 -554 _____ | 79 |
| Abb. 17: RhoGEF17 aktiviert spezifisch RhoA-C _____ | 80 |
| Abb. 18: Regulation von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α _____ | 81 |
| Abb. 19: Regulation der RhoA-Aktivierung durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α _____ | 83 |
| Abb. 20: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α _____ | 84 |
| Abb. 21: cGKI- α spezifische Phosphorylierung von RhoGEF17 und Interaktion von cGKI- α mit RhoGEF17 _____ | 86 |
| Abb. 22: Schematische Darstellung der putativen cGMP- bzw. cAMP-abhängigen Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen im RhoGEF17 (ScanProsite) _____ | 87 |
| Abb. 23: Einfluss der sukzessiven, N-terminalen Verkürzung von RhoGEF17 auf seine Aktivierbarkeit durch cGMP/cGKI- α _____ | 90 |
| Abb. 24: Untersuchung zur Aktivierbarkeit verschiedener phosphoresistenter RhoGEF17- Δ N-Mutanten _____ | 92 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 25: Untersuchungen zur Aktivierbarkeit der phosphomimetischen bzw. phosphoresistenten RhoGEF17-SS1330/1331-Varianten _____ | 94 |
| Abb. 26: Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP/cGKI- α vermittelte Hemmung der Serum-induzierten RhoA-Aktivierung _____ | 95 |
| Abb. 27: Einfluss der RhoA-Phosphorylierung auf dessen Aktivierbarkeit durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α _____ | 98 |
| Abb. 28: Nachweis der cGKI- α /RhoGEF17-abhängigen ROCK-Aktivierung _____ | 99 |
| Abb. 29: Einfluss der ROCK-Inhibitoren Y-27632 und H-1152P auf die cGKI- α /RhoGEF17-vermittelte RhoA-Aktivierung _____ | 100 |
| Abb. 30: Untersuchungen zur Beteiligung von Serin/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen an der ROCK-vermittelten Rückkopplung des RhoGEF17-Signalwegs _____ | 102 |
| Abb. 31: Detektion von endogenem RhoGEF17 in isolierten, glattmuskulären thorakalen Zellen der Aorta von Ratte und Maus _____ | 105 |
| Abb. 32: Immunhistologische Färbungen von thorakalen Aorten-Paraffinschnitten der Ratte _ | 106 |
| Abb. 33: cGMP- bzw. RhoGEF17- Δ N-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC _____ | 107 |
| Abb. 34: Aktin-Zytoskelettfärbung in RASMC und HUVEC _____ | 108 |
| Abb. 35: Suppression der Expression von rekombinantem RhoGEF17- Δ N Ratte-Protein mittels RhoGEF17-spezifischer siRNA bzw. shRNA _____ | 110 |
| Abb. 36: Suppression der Expression von endogenem RhoGEF17-Protein in RASMC mittels eines shRNA-RhoGEF17-spezifischen Adenovirus _____ | 111 |
| Abb. 37: Inhibition der cGMP-vermittelten RhoA-Aktivierung in RASMC durch Ad-shRNA-RhoGEF17 _____ | 112 |
| Abb. 38: Inhibition der SNP-vermittelten RhoA-Aktivierung in RASMC durch Ad-shRNA-RhoGEF17 _____ | 113 |
| Abb. 39: Schematische Darstellung des RhoGEF17-Signalwegs _____ | 121 |
| Abb. 40: Putativer Einfluss von cGKI und ROCK auf die MYPT1 Untereinheit der MLCP bzw. auf den Gefäßtonus der glatten Muskulatur in Gegenwart von RhoGEF17 _____ | 123 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Primärantikörper _____ | 25 |
| Tab. 2: Sekundärantikörper _____ | 26 |
| Tab. 3: Mutagenese _____ | 28 |
| Tab. 4: Klonierungen _____ | 31 |
| Tab. 5: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese _____ | 49 |
| Tab. 6: Reaktionsansatz für die gerichtete Mutagenese _____ | 50 |
| Tab. 7: Laufbedingungen der IEF _____ | 57 |
| Tab. 8: Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen _____ | 62 |
| Tab. 9: Parameter für die transiente Plasmid-DNA Transfektion von HEK-Zellen mit dem PolyFect-Transfektionsreagenz _____ | 64 |
| Tab. 10: Parameter für die transiente Plasmid-DNA und siRNA Kotransfektion von HEK-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 _____ | 65 |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celcius |
| Abb. | Abbildung |
| ACK | engl.: activated cdc42-associated kinase dt.: aktivierte Cdc42-assozierte Kinase |
| Ad | Adenovirus |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMP-PNP | Adenylylimidodiphosphat |
| AMV | engl.: avian myeloblastosis virus dt.: Vogel Myeloblastose Virus |
| ANP | engl.: atrial natriuretic peptide dt.: atriales natriuretisches Peptid |
| Arf | engl.: ADP-ribosylation factor dt.: ADP-ribosylierender Faktor |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bFGF | engl.: fibroblast growth factor dt.: Fibroblasten Wachstumsfaktor |
| BKCa-Kanal | Calcium (Ca^{2+})-abhängiger Kaliumkanal |
| bp | Basenpaar |
| Bq | Bequerel |
| BNP | engl.: brain natriuretic peptide dt.: Hirn natriuretisches Peptid |
| Br | Bromo |
| BSA | engl.: bovine serum albumin dt.: Rinder-Serum-Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | konserviert |
| C3T | C3-ADP-Ribosyltransferase |
| ca. | circa |
| Ca^{2+} | Calciumion |
| Calyculin A | Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitor |
| CaM | Calmodulin |
| cAMP | zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat |

| | |
|-----------------|---|
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cGK | cGMP-abhängige Proteinkinase |
| cGMP | zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat |
| CHO-Zellen | engl.: chinese hamster ovary-cells dt.: chinesische Hamsterovarien Zellen |
| Ci | Curie |
| CIAP | engl.: calf intestinal alkaline Phosphatase dt.: Kalbsdarm alkalische Phosphatase |
| Cl ⁻ | Chloridion |
| cm | engl.: centimeter dt.: Zentimeter |
| CMV | engl.: Cytomegalovirus dt.: Zytomegalovirus |
| CNBr | Cyanbromid |
| CNG | engl.: cyclic nucleotide-gated cation channels dt.: zyklische Nukleotid-gesteuerte Kationen-Kanäle |
| CNP | engl.: C-type natriuretic peptide dt.: C-Typ natriuretisches Peptid |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPI-17 | Proteinkinase C (PKC)-stimuliertes Myosin-Phosphatase Inhibitorprotein |
| CsCl | Cäsiumchlorid |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| D | Dimension |
| Da | Dalton |
| DAG | Diazylglyzerol |
| Dbl | diffuses menschliches B-Zell Lymphom |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dest. | destilliert |
| DH | Dbl-homologe |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMEM | Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| DRF | engl.: diaphanous related formin dt.: Diaphanous-verwandtes Formin |
| dt. | deutsch |
| DTT | Dithiothreitol |

| | |
|----------------|--|
| E | Extinktion |
| ECGS/H | Wachstumssupplement für humane Endothelzellen |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| EDRF | engl.: endothelium-derived relaxing factor dt.: Endothel-abstammender relaxierender Faktor |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EF-Tu | engl.: elongation factor-Tu dt.: Verlängerungs-Faktor-Tu |
| EGF | engl.: endothelial growth factor dt.: endothelialer Wachstumsfaktor |
| EGFP | engl.: enhanced green fluorescent protein dt.: verstärktes grün fluoreszierendes Protein |
| engl. | englisch |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| F | Farnesylisoprenoid |
| FCS | engl.: foetal calf serum dt.: fötales Kälberserum |
| for | engl.: forward dt.: vorwärts |
| G | Giga (10 ⁹) |
| GG | Geranylgeranylisoprenoid |
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung |
| G-Domäne | GTPase-Domäne |
| G-Protein | Guaninnukleotid-bindendes Protein |
| GAP | engl.: gtpase activating protein dt.: GTPase-aktivierendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GBD | GTPase-bindende Domäne |
| GC | Guanylylzyklase |
| GDI | engl.: guanine nucleotide dissociation inhibitor dt.: Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor |
| GEF | engl.: guanine nucleotide exchange factor dt.: Guaninnukleotid-Austauschfaktor |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GPCR | engl.: G protein coupled receptor dt.: G-Protein gekoppelter Rezeptor |
| GST | Glutathion-S-Transferase |

| | |
|---------------------------------|--|
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H | Wasserstoff |
| ³ H | Tritium |
| h | engl.: hour dt.: Stunde |
| H-1152P | ROCK-Inhibitor |
| H89 | spezifischer Inhibitor der PKA |
| HCl | Salzsäure |
| HEK | engl.: human embryonal kidney dt.: humane embryonale Niere |
| H ₂ O | Wasser |
| HUVEC | engl.: human umbilical vein endothelial cell dt.: humane Endothelzellen der Umbilikalvene |
| Hz | Herz |
| ICAM | engl.: intercellular adhesion molecule dt.: interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| IRAG | IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGKI-Substrat |
| K ⁺ | Kaliumion |
| kb | Kilobase |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumhydrogenphosphat |
| H ₂ SO ₄ | Schwefelsäure |
| L | Liter |
| LAR | engl.: luciferase assay reagent dt.: Luciferase-Assay Reagenz |
| LARG | Leukämie-assoziiertes RhoGEF |
| LimK | Lim Kinase |
| LPA | engl.: lysophosphatic acid dt.: Lysophosphatsäure |
| M | Molar (mol/L) |
| m | milli (10 ⁻³) |
| m | Meter |
| μ | mikro (10 ⁻⁶) |

| | |
|---------------------------------|--|
| mDia | engl.: diaphanous related formin dt.: Diaphanous-verwandtes Formin 1 |
| MASMC | engl.: mouse aortic smooth muscle cell dt.: glattmuskuläre Zellen der Mauseorta |
| MBS | engl.: myosin binding substrate dt.: Myosin Bindungs-Substrat |
| MCS | engl.: multiple cloning site dt.: multiple Klonierungsstelle |
| Mg ²⁺ | Magnesiumion |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min | Minute |
| MLCK | Calmodulin-abhängige leichte Myosinketten-Kinase |
| MLCP | engl.: myosin light chain phosphatase dt.: leichte Myosinketten-Phosphatase |
| MOI | engl.: multiplicity of infection dt.: Multiplizität der Infektion |
| mol | Stoffmenge |
| MRCK | engl.: myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase |
| MWCO | engl.: molecular weight cut off dt.: Molekulargewicht-Ausschlussgrenze |
| MYPT1 | engl.: myosin-targeting subunit of myosin light-chain phosphatase dt.: Myosin-bindende Untereinheit der leichten Myosinketten-Phosphatase |
| N ₂ | Stickstoff |
| n | nano (10 ⁻⁹) |
| Na ⁺ | Natrium |
| NaAc | Natriumacetat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaF | Natriumfluorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaHPO ₄ | Natriumhydrogenphosphat |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| Na ₃ VO ₄ | Natriumorthovanadat |
| NFκB | engl.: nuclear factor kappa B dt.: Kern-Faktor kappa B |

| | |
|-------------------------|---|
| nNOS | neuronale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase |
| NO-sensitive GC | Stickstoffmonoxid (NO)-sensitive Guanylylzyklase |
| N-terminal | Amino-terminal |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OD | optische Dichte |
| Okadainsäure | Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitor |
| ORF | engl.: open reading frame dt.: offener Leserahmen |
| PP | Proteinphosphatase |
| p | engl.: plasmid dt.: Plasmid |
| p | pico |
| Pak | p21-aktivierte Kinase |
| PBGD | Porphobilinogendesaminase |
| PBS | engl.: phosphate buffered saline dt.: Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| pCPT | p-chlorophenylthio |
| PCR | engl.: polymerase chain reaction dt.: Polymerase-Kettenreaktion |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pGC | partikuläre Guanylylzyklase |
| PH | Pleckstrin-homologe |
| PI-4,5-P ₂ | Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat |
| PI-3,4,5-P ₃ | Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triphosphat |
| Pi | anorganisches Phosphat |
| PI3K | Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKN | Proteinkinase N |
| PLC | Phospholipase C |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pol | Polymerase |
| PRK | engl.: proliferation-related kinase dt.: Proliferations-verwandte Kinase |

| | |
|----------------|---|
| pRL-TK | engl.: plasmid renilla luciferase-thymidine kinase |
| pSRE.L | engl.: plasmid serum response element luciferase |
| Rab | engl.: Ras-like proteins in brain dt.: Ras-ähnliche Proteine im Gehirn |
| Ran | engl.: Ras-like nuclear dt.: Ras-ähnliches nukleäres Protein |
| Ras | engl.: Rat sarcoma oncogene dt.: Ratten-Sarkoma Onkogen |
| RASMC | engl.: rat aortic smooth muscle cell dt.: glattmuskuläre Zellen der Rattenaorta |
| RBD | Rho-Bindedomäne |
| rev | engl.: revers dt.: rückwärts |
| RGS | engl.: regulator of G protein signalling dt.: Regulator des G-Protein-Signalwegs |
| Rho | engl.: Ras-homologous dt.: Ras-homolog |
| RLC | engl.: regulatory light chain dt.: regulatorische leichte Myosinkette |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROCK | Rho-Kinase |
| Rp-8-pCPT-cGMP | 8-(4-Chlorophenylthio)-Guanosin-3'-5'-zyklisches Monophosphorothioat, Rp-Isomer |
| rpm | engl.: rounds per minute dt.: Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Schwefel |
| SD | engl.: standard deviation dt.: Standardabweichung |
| SDS | engl.: sodium dodecyl sulfate dt.: Natrium-Dodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| sec | engl.: second dt.: Sekunde |
| SEM | engl.: standard error of the mean dt.: Standardabweichung des Mittelwertes |
| sh | engl.: short hairpin dt.: kleine Haarnadel |

| | |
|-------------------|---|
| si | engl.: small interfering dt.: geringfügig interferierend |
| SM | engl.: smooth muscle dt.: glatter Muskel |
| SMC | engl.: smooth muscle cell dt.: glattmuskuläre Zellen |
| SM-MHC | engl.: SM-Myosin-heavy-chain dt.: glatmuskuläre schwere Myosinkette |
| SNP | engl.: Sodium nitroprusside dt.: Natrium-Nitroprussid |
| SOC | Salz-optimiertes Medium mit Glukose („salt-optimized + carbon“) |
| SR | sarkoplasmatisches Retikulum |
| SRE | engl.: serum response element |
| SRF | engl.: serum response factor |
| SV 40 | engl.: simian virus 40 |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Tap | Thermo aquaticus |
| TBS | engl.: Tris-buffered-saline dt.: Tris-gepufferte Salzlösung |
| TCF | ternärer Komplexfaktor |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | Tetramethyldiamin |
| TMB | Tetra-Methylbenzidin |
| TMBH ₂ | Leukoform von Tetra-Methylbenzidin |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TRITC | Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat |
| U | engl.: unit dt.: Einheit |
| ü. N. | über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v | engl.: volume dt.: Volumen |
| VASP | engl.: vasodilatator-stimulated Phosphoprotein dt.: Vasodilation-stimuliertes Phosphoprotein |

| | |
|---------|---|
| VCAM | engl.: vascular adhesion molecule dt.: vaskuläres Adhäsionsmolekül |
| VEGF | engl.: vascular endothelial growth factor dt.: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| Vhrs | Voltstunden |
| VSMC | engl.: vascular smooth muscle cell dt.: vaskuläre glatte Muskelzellen |
| W | Watt |
| WASP | engl.: Wiskott-Aldrich-syndrome-protein dt.: Wiskott-Aldrich Syndrom Protein |
| WAVE | engl.: Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin- homologous protein dt.: Wiskott-Aldrich Syndrom Protein-Familie Verprolin- homologes Protein |
| w | engl.: weight dt.: Gewicht |
| wt | Wildtyp |
| X-gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid |
| Y-27632 | ROCK-Inhibitor |
| z. B. | zum Beispiel |

Aminosäuren

L-Alanin, Ala (A)

L-Arginin, Arg (R)

L-Asparagin, Asn (N)

L-Asparaginsäure, Asp (D)

L-Cystein, Cys (C)

L-Glutamin, Gln (Q)

L-Glutaminsäure, Glu (E)

Glycin, Gly (G)

L-Histidin, His (H)

L-Isoleucin, Ile (I)

L-Leucin, Leu (L)

L-Lysin, Lys (K)

L-Methionin, Met (M)

L-Phenylalanin, Phe (F)

L-Prolin, Pro (P)

L-Serin, Ser (S)

L-Threonin, Thr (T)

L-Tyrosin, Tyr (Y)

L-Tryptophan, Trp (W)

L-Valin, Val (V)

1. Zusammenfassung

Die koordinierte Regulation von Rho-GTPasen ist entscheidend für die Funktion von vaskulärem Gewebe. Rho-GTPasen kontrollieren hierbei als zentrale Mediatoren Prozesse wie Proliferation, Migration und Kontraktion sowohl glattmuskulärer als auch endothelialer Zellen. Bis heute ist jedoch nur wenig über die unmittelbar beteiligten akzessorischen Proteine und Signalübertragungswege bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, in diesem Kontext die Rolle der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren RhoGEF10 und RhoGEF17 zu charakterisieren sowie deren übergeordnete Regulation näher zu untersuchen. Dazu wurden unterschiedliche zelluläre Systeme (permanente Zelllinien (HEK-293 und TSA), isolierte glattmuskuläre Zellen der Rattenaorta (RASMC) und humane Endothelzellen der Umbilikalvene) als Modell verwendet und die Signalübertragung mittels diverser molekularer Werkzeuge (Toxine, bioaktive Substanzen, eukaryote Expressionsvektoren, rekombinante Adenoviren, shRNA-kodierende Adenoviren) beeinflusst. Im ersten Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass RhoGEF10 spezifisch RhoA-C mit einer Präferenz für RhoB aktiviert. Des Weiteren haben immunhistologische Untersuchungen eine vorwiegende Expression von RhoGEF10 im Gefäßendothel ergeben. Der zweite Teil dieser Arbeit zeigt, dass das im Gefäßendothel, vor allem aber in der glatten Muskulatur der Gefäße, exprimierte, RhoA-C spezifische RhoGEF17 durch die cGMP-abhängige Proteinkinase I- α (cGKI- α) spezifisch aktiviert wird. Diese Aktivierung setzt eine direkte Interaktion beider Proteine voraus und beinhaltet eine koordinierte Phosphorylierung von RhoGEF17 sowie möglicherweise von RhoA. Mittels der gezielten Mutagenese und der Generierung von trunkierten Mutanten von RhoGEF17 konnte nachgewiesen werden, dass zwei cGK-spezifische Phosphorylierungsstellen (Serine 43 und 1331) für die Regulation der RhoGEF17-Aktivität entscheidend sind. Darüber hinaus wurde ein positiver Rückkopplungsmechanismus innerhalb des cGKI- α /RhoGEF17/RhoA-Signalwegs identifiziert, welcher in Abhängigkeit der RhoA-regulierten Kinase ROCK und von Phospho-Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen erfolgt. Zusätzlich zu diesen mechanistischen Untersuchungen ist es gelungen in RASMC durch shRNA-medierte Depletion von endogenem RhoGEF17 zu zeigen, dass die cGMP-abhängige RhoA-Aktivierung in diesen Zellen tatsächlich von der RhoGEF17-Expression abhängig ist. Da die Fehlregulation der Proliferation, Migration und Kontraktion von vaskulären Zellen z. B. bei der Arteriosklerose und der Hypertonie eine wichtige Rolle spielt, könnten RhoGEF17 und RhoGEF10 somit bei diesen Erkrankungen von pathophysiologischer Bedeutung sein.

2. Summary

The coordinated regulation of Rho GTPases is crucial for the function of vascular tissue. Rho GTPases control as central mediators processes like proliferation, migration and contraction both in smooth muscle and endothelial cells. However until now only little is known about the involved accessory proteins and signal transduction pathways. Therefore, the aim of this work was to characterise the role of the guanine nucleotide exchange factors RhoGEF10 and RhoGEF17 and to identify upstream regulatory mechanisms. For this purpose different cellular systems (permanent cell lines (HEK-293 und TSA), isolated rat aortic smooth muscle cells (RASMC) and human umbilical cord endothelial cells) were used as models and the cellular signal transduction was studied using different molecular tools (toxins, bioactive substances, eukaryotic expression vectors, recombinant adenovirus, shRNA-coding adenovirus). In the first part of this work it is shown that RhoGEF10 activates specifically RhoA-C with a preference for RhoB. Immunohistological analyses showed that RhoGEF10 exhibits a predominant expression in the aortic vascular endothelium. In the second part of this work it is demonstrated that the RhoA-C specific RhoGEF17, which is endogenously expressed in the aortic vascular endothelium and more prominent in aortic smooth muscle cells, is activated specifically through the cGMP-dependent protein kinase I- α (cGKI- α). This activation requires a direct interaction of both proteins and comprises a coordinated phosphorylation of RhoGEF17 and possibly of RhoA. By site-directed mutagenesis and truncation of RhoGEF17 two cGK-specific phosphorylation sites (serine 43 and 1331) were found to be crucial for the regulation of RhoGEF17 activity. Furthermore a positive feedback mechanism could be identified within the cGKI- α /RhoGEF17/RhoA pathway which is dependent on the RhoA-regulated kinase ROCK and on phospho-serine/threonine-specific phosphatases. Moreover, shRNA mediated depletion of endogenous RhoGEF17 in RASMC, revealed that the cGMP-dependent RhoA activation in these cells is dependent on RhoGEF17 expression. As the dysregulation of proliferation, migration and contraction of vascular cells plays a role for the pathogenesis of arteriosclerosis and hypertension RhoGEF17 and RhoGEF10 could be of pathophysiological relevance in these diseases.

3. Einleitung

3.1 Monomere GTP-bindende Proteine

Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) agieren als molekulare Schalter und kontrollieren viele Aspekte des Zellverhaltens durch die Regulation von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen (Jaffe & Hall, 2005). Zu den G-Proteinen zählen unter anderem heterotrimere G-Proteine, Faktoren welche in der Proteinsynthese eine Rolle spielen, wie z. B. der Elongationsfaktor Tu („elongation factor-Tu“, EF-Tu) und die monomeren GTPasen der Ras („Rat sarcoma oncogene“)-Superfamilie (Newmark, 1977; Yokosawa *et al.*, 1975; Chardin, 1988; Bourne *et al.*, 1991).

3.1.1 Die Ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie repräsentiert eine Gruppe von mehr als 150 bekannten Proteinen, welche evolutionär konservierte Orthologe in Pflanzen, Mikroorganismen sowie in Vertebraten und Invertebraten haben (Chardin, 1988; Colicelli, 2004; Wennerberg *et al.*, 2005). Basierend auf Sequenzhomologien und ihrer jeweiligen physiologischen Funktion kann die Ras-Superfamilie in die folgenden fünf Familien eingeteilt werden: Ras, Rho, Rab, Ran und Arf (Colicelli, 2004). Die Ras-Familie besteht aus 39 beschriebenen Isoformen und ist an der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse beteiligt, wie Genexpression, Differenzierung, Zellproliferation und Apoptose (Gardner *et al.*, 1993; Reymond *et al.*, 1984; Feramisco *et al.*, 1984; Fernandez-Sarabia & Bischoff, 1993). Einige Mitglieder der Ras-Subfamilie wirken in der Zelle als Tumorsuppressoren, andere besitzen ein onkogenes Potential (Eckert *et al.*, 2004; Colicelli, 2004). Das Ran-Protein („Ras-like nuclear“) ist für den nukleozytoplasmatischen Export und Import von Proteinen bzw. RNA verantwortlich (Kadowaki *et al.*, 1993; Moore & Blobel, 1993). Die größte Familie stellen mit 61 Mitgliedern die Rab-GTPasen dar („Ras-like proteins in brain“), die als Regulatoren des intrazellulären Vesikeltransports agieren (Ayala *et al.*, 1989; Grosshans *et al.*, 2006). Bislang sind 30 Isoformen der Arf-GTPasen („ADP-ribosylation factor“) bekannt, die die Formierung von Vesikelhüllen bei verschiedenen Schritten der Exo- und Endozytose regulieren (Serafini *et al.*, 1991; Nie & Randazzo, 2006). Die Proteine der Rho-Familie („Ras-homologous“) agieren ähnlich wie die GTPasen der Ras-Familie als zentrale Regulatoren in verschiedenen Signaltransduktionswegen (Jaffe & Hall, 2005).

3.1.2 GTPase-Domäne der monomeren GTPasen

Die monomeren GTPasen haben ein Molekulargewicht von 20 - 40 kDa und besitzen wie alle G-Proteine eine konservierte 20 kDa große N-terminale GTPase-Domäne, auch G-Domäne genannt (Bourne *et al.*, 1991). Die G-Domäne besteht aus fünf konservierten Bereichen G-1 bis

G-5 und ist für die Nukleotid- und Mg^{2+} -Bindung, für die intrinsische GTPase-Aktivität und für den Nukleotidaustausch-induzierten Konformationswechsel notwendig (Bourne *et al.*, 1991; Vetter & Wittinghofer, 2001). Die Bindung von GDP und GTP erfolgt mit einer hohen Affinität und abhängig vom gebundenen Nukleotid, verändert die G2-Region („switch I“) und die G3-Region („switch II“) ihre Konformation. Durch die GTP-Bindung-induzierte Konformationsänderung der GTPase wird über die „switch I“-Region eine Interaktion mit Effektormolekülen ermöglicht (Bishop & Hall, 2000; Vetter & Wittinghofer, 2001) (siehe Abb. 1, Seite 10).

3.1.3 Lipidmodifikation der monomeren GTPasen

Die Mehrheit der Ras- und Rho-Proteine besitzt ein C-terminales CAAX-Motiv (C=Cystein, A=aliphatische Aminosäure, X=beliebige Aminosäure), welches ein Erkennungsmotiv für die *Farnesyltransferase* und *Geranylgeranyltransferase I* darstellt (Ghomashchi *et al.*, 1995; Silvius & L'heureux, 1994; Hancock *et al.*, 1989). Diese Enzyme katalysieren eine kovalente Bindung von Farnesyl- (C-15 F) oder Geranylgeranylisoprenoiden (C-20 GG) an dem Cysteinrest des CAAX-Motivs. Die enzymatische Modifikation des C-terminalen Isoprenoidrests scheint in einigen Fällen variabel zu sein, da z. B. RhoB (siehe 3.2, Seite 4) entweder durch das C-15 F- oder durch das hydrophobere C-20 GG-Isoprenoid acetyliert werden kann (Armstrong *et al.*, 1995). Nach der Isoprenylierung der GTPasen erfolgt eine enzymatische Proteolyse des C-terminalen AAX-Tripeptids sowie eine Isoprenyl-Cystein-Carboxyl-Methylierung (Lane & Beese, 2006). Zusätzlich werden einige GTPasen, wie z. B. RhoB noch an einem weiteren Cysteinrest durch Verknüpfung einer Palmitinsäure (C-16) posttranslational modifiziert (Adamson *et al.*, 1992). Die Prenylierung sowie die Carboxyl-Methylierung dienen beide der Regulation der subzellulären Lokalisation der GTPasen in der Zelle (Lane & Beese, 2006; Wright & Philips, 2006). Die Rab-Subfamilie wird durch die *Geranylgeranyltransferase II* an distinkten C-terminalen Cystein-Motiven (CC, CXC, CCX, CCXX oder CCXXX) modifiziert (Khosravi-Far *et al.*, 1991). Dahingegen besitzen Mitglieder der Arf-Familie und das Ran-Protein kein C-terminales CAAX-Motiv (Kahn *et al.*, 1988; Rush *et al.*, 1996). Alternativ findet bei einigen Mitgliedern der Arf-Familie eine posttranslationale Modifikation in Form einer kovalenten Bindung einer Myristinsäure (C-14) an ein N-terminales Glycin statt (Kahn *et al.*, 1988).

3.2 Rho-GTPasen

Die Rho-GTPasen bilden eine wichtige Unterfamilie der Ras-Superfamilie. Zurzeit sind 22 humane Gene bekannt, welche für 25 verschiedene Proteine kodieren (Wennerberg *et al.*, 2005). Strukturell unterscheiden sie sich von anderen monomeren GTPasen durch eine Rho-Insert-Domäne, die zwischen dem fünften β -Faltblatt und der vierten α -Helix der G-Domäne lokalisiert ist (Zong *et al.*, 2001). Rho-GTPasen weisen innerhalb der G-Domäne eine ungefähr 30 %ige Aminosäure-Homologie zu den Ras-Proteinen und eine 40-95 %ige Homologie innerhalb der

Rho-Familie auf (Wennerberg *et al.*, 2005). Aufgrund von strukturellen Motiven und biologischen Funktionen sowie Homologie in der Aminosäuresequenz, kann die Familie der Rho-GTPasen wiederum in 6 Subfamilien unterteilt werden: Die RhoA- (RhoA, B, C), die Rac1- (Rac1, 1b, 2, 3, RhoG), die Cdc42- (Cdc42, Cdc42-G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1), die Rnd- (Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3), die RhoBTB- (RhoBTB1, 2, 3) und die Miro- (Miro-1, 2) Subfamilie. Einige Rho-GTPasen wie RhoD, Rif und TTF/RhoH, lassen sich keiner der Subfamilien zuordnen (Wennerberg *et al.*, 2005). Typische Vertreter der Rho-GTPasen, wie z. B. RhoA, Rac1 und Cdc42 haben ein Molekulargewicht von 20 - 25 kDa und bestehen nur aus der G-Domäne sowie kurzen N- und C-terminalen Enden (Wennerberg *et al.*, 2005). Die Mitglieder der RhoBTB- und Miro-Subfamilie weichen von der gewöhnlichen Struktur der Rho-GTPasen ab und können aufgrund zusätzlicher Domänen aus bis zu 700 Aminosäuren bestehen (Fransson *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2001). Die Miro-Proteine stellen aufgrund der Sequenz-Divergenz zu den anderen Rho-GTPasen und dem Fehlen der Rho-spezifischen Insert-Domäne die ungewöhnlichsten Mitglieder dieser Familie dar.

Während ursprünglich angenommen wurde, dass die Mitglieder der Rho-Familie ausschließlich Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts sind und damit wichtige physiologische Prozesse, wie die Zellmigration, Chemotaxis, Phago- und Pinozytose, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion steuern (Chrzanowska-Wodnicka & Burridge, 1992; Takaishi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1998; Hackam *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 1997; Ellis & Mellor, 2000; Nobes & Hall, 1995), konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sie darüber hinaus wichtige Mediatoren vieler anderer zellulärer Prozesse sind. Dazu gehören z. B. die Regulation der Genexpression, der Apoptose und des Zellzyklus (Mackay & Hall, 1998; Jimenez *et al.*, 1995; Coleman & Olson, 2002; Olson *et al.*, 1995). Eine weitere wichtige Rolle spielen Rho-GTPasen für die Pathogenese von Erkrankungen, die durch bestimmte Bakterienstämme ausgelöst werden. Diese Bakterienstämme exprimieren Enzyme und Toxine, welche die Aktivität verschiedener Rho-GTPasen beeinflussen (Aktories *et al.*, 2000). Die Cytotoxine A und B des Diarrhoe- und in schweren Fällen Kolitis-verursachenden Bakteriums *Clostridium difficile* bzw. das lethale Toxin des entzündungsauslösenden Bakteriums *Clostridium sordellii* inaktivieren durch Glukosylierung verschiedene Isoformen der Rho-, Rac- und Cdc42-Proteine (Just *et al.*, 1994; Just *et al.*, 1995; Dillon *et al.*, 1995; Popoff *et al.*, 1996). Neben ihrer Bedeutung für die Pathogenese von Bakterien haben die unterschiedlichen Toxine auch als molekulare Werkzeuge zum Verständnis der Beteiligung von Rho-GTPasen an zellulären Vorgängen beigetragen. So ADP-ribosyliert z. B. das Exoenzym C3-ADP-Ribosyltransferase des Botulismus auslösenden Bakteriums *Clostridium botulinum* spezifisch RhoA-C und inaktiviert diese Rho-GTPasen (Aktories *et al.*, 1989; Sekine *et al.*, 1989; Aktories *et al.*, 1992). Diese Inaktivierung kann deshalb zum Nachweis der Beteiligung von RhoA-C an zellulären Funktionen herangezogen werden.

3.2.1 Funktion von RhoA, Rac1 und Cdc42

Die ersten direkten Hinweise auf die biologische Funktion von Rho-Proteinen ergaben sich durch Mikroinjektion von rekombinanten Rho-Proteinen bzw. Rho-cDNAs in Swiss 3T3 Fibroblasten (Paterson *et al.*, 1990). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die monomeren GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett haben. Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Rho-GTPasen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli abgrenzende Effekte auf die Zellmorphologie, Zellpolarität sowie Zellmigration haben (Nobes & Hall, 1995; Hall, 1998; Schmitz *et al.*, 2000; Aspenstrom *et al.*, 2004). Des Weiteren belegen Studien, dass für die gerichtete Zellmigration eine koordinierte Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 notwendig ist (Disanza *et al.*, 2005). Überexpressionsstudien zeigen, dass RhoA-C gleichermaßen Stressfasern und fokale Adhäsionen induzieren (Ridley & Hall, 1992). Stressfasern sind kontraktile Bündel, die hauptsächlich aus Aktinfilamenten, Myosin II und α -Actinin bestehen und im gesamten Zellkörper lokalisiert sind (Byers & Fujiwara, 1982). Diese Filamente werden an den „Fokal-Adhäsionen“ durch verschiedene Adapterproteine und Transmembran-Verbindungsproteine, die zur Integrin-Familie gehören, mit der extrazellulären Matrix verknüpft (Ridley & Hall, 1992; Akiyama, 1996). Die Entstehung der Stressfasern basiert auf einem koordinierten Zusammenspiel des Diaphanous-verwandten Formins 1 („mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous“, mDia1 oder „diaphanous related formin“, DRF), der Lim Kinase (LimK) und der Rho-Kinase (ROCK) (Watanabe *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 2000). Die ROCK-abhängige Aktivierung der LimK und die Stimulation von DRF führen zur Stimulation der Aktin-Polymerisation sowie zur Stabilisierung der Aktinfilamente (Geneste *et al.*, 2002). Außerdem reguliert ROCK durch Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette („regulatory light chain“, RLC) und gleichzeitiger Inhibition der leichten Myosinketten-Phosphatase („myosin light chain phosphatase“, MLCP) die Kontraktilität der Aktin-Myosin-Fasern (Kimura *et al.*, 1996; Charest & Firtel, 2007). Die Aktivierung der „Rac-ähnlichen“-GTPasen induziert am Leitsaum der Zelle die Bildung von Lamellipodien bzw. „Membrankräuselungen“ sowie fokale Adhäsionen (Ridley *et al.*, 1992; Nobes & Hall, 1995). Die planaren Zellausläufer wie Lamellipodien werden kurz nach der Zelladhäsion ausgebildet und bestimmen die Polarität bzw. die Richtung bei der Zellmigration (Nobes & Hall, 1999; Pollard *et al.*, 2001; Ridley *et al.*, 2003). Außerdem spielen sie eine Rolle bei pino- und phagozytotischen Prozessen (Bar-Sagi & Feramisco, 1986; Ridley *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1997). Die Bildung der Membransprünge bzw. der Lamellipodien ist begleitet von einer Aktin-Polymerisation, welche hauptsächlich durch die Aktivierung von WAVE („Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein“) (Miki *et al.*, 1998) und der p21-aktivierten-Kinase („p21 activated kinase“, Pak) gesteuert wird (Sells *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Pak führt gleichzeitig auch zu einer Aufhebung von RhoA-induzierten Stressfasern und fokalen Adhäsionen an der Hinterseite der Zelle (Manser *et al.*, 1997). Die Aktivierung der „Cdc42-ähnlichen“-GTPasen induziert eine Bildung von fingerförmigen Zellausläufern (Filopodien), die als Chemosensoren gelten und deren Form durch parallele Bündel von

Aktinfilamenten bestimmt ist (Jacinto & Wolpert, 2001; Mallavarapu & Mitchison, 1999). Die Formierung der Filopodien wird unter anderem durch die Aktivierung von WASP („Wiskott-Aldrich syndrome protein“) oder N-WASP initiiert (Machesky & Insall, 1998). Cdc42 aktiviert zudem die Tyrosinkinase ACK1 und ACK2 („activated Cdc42-associated kinase“) (Manser *et al.*, 1994; Yang & Cerione, 1997; Yokoyama & Miller, 2003; Ahmed *et al.*, 2004; Elliot-Smith *et al.*, 2005; Galisteo *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007), wobei letztere die Bildung der fokalen Adhäsionen am Leitsaum und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts reguliert (Yang *et al.*, 2001). Außerdem reguliert Cdc42 die Zellpolarität durch Bindung an Par6, welche eine Komponente eines Komplexes bestehend aus Par3 und der atypischen Proteinkinase C ζ (PKC ζ) oder PKC η darstellt (Joberty *et al.*, 2000). Dieser Komplex reguliert die Position des Mikrotubuliorganisierenden Zentrums während der Zellmigration (Tzima *et al.*, 2003). Letztlich katalysiert Cdc42 durch die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase MRCK („mytotic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase“) die Myosin-Phosphorylierung und dadurch die Position des Zellkerns während der Zellmigration (Gomes *et al.*, 2005).

Neben der Regulation des Aktin-Zytoskeletts sind die Rho-GTPasen auch bei der Kontrolle der Genregulation beteiligt. Die Rho-, Rac-, und Cdc42-Subfamilien-Proteine aktivieren den Serum-Response-Faktor (SRF), der anschließend mit dem ternären Komplexfaktor („ternary complex factor“, TCF) und der Promotor-Regulatorsequenz Serum-Response-Element (SRE) einen Komplex bildet und dadurch die Transkription spezifischer Gene stimuliert (Hill *et al.*, 1995). Das SRE findet sich z. B. in den Promotoren von Genen, die für Bestandteile des Zytoskeletts, für natriuretische Proteine, wie z. B. ANP („atrial natriuretic peptide“) oder für kontraktile Proteine der quergestreiften oder glattmuskulären Zellen („smooth muscle cells“, SMC), wie z. B. „SM-Myosin-heavy-chain“ (SM-MHC) oder „ α -SM Actin“ kodieren (Chai & Tarnawski, 2002). Eine veränderte Aktivierung des SRFs durch Rho, Rac oder Cdc42 kann Auswirkungen auf den Phänotyp einer Zelle haben und z. B. die Differenzierung von kontraktile glatten Muskelzellen zum synthetischen, proliferativen Phänotyp zur Folge haben (Walsh & Takahashi, 2001; Worth *et al.*, 2001). Die „Rho-ähnlichen“-Proteine regulieren unter anderem auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B („nuclear factor-kB“), welcher proatherogene, proliferierende sowie proapoptische Zellantworten induzieren kann (Perona *et al.*, 1997). Unter anderem führt die Aktivierung von NF- κ B zu einer Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie z. B. dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und zu einer Erhöhung der Expression von interzellulären („intercellular adhesion molecule“, ICAM-1) sowie vaskulären Adhäsionsmolekülen („vascular adhesion molecule“, VCAM-1) (Shimizu *et al.*, 1990; Marui *et al.*, 1993; Brasier, 2006).

3.3 Akzessorische Proteine der Regulation der Rho-GTPasen

Der Zyklus zwischen dem aktiven GTP-gebundenen und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand der Rho-GTPasen wird hauptsächlich von drei Proteinklassen reguliert: (1) Den GTPase-aktivierenden Proteinen („Rho GTPase activating protein“, RhoGAPs) (Lancaster *et al.*,

1994), (2) den Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren („Rho guanine nucleotide dissoziation inhibitor“, RhoGDIs) (Fukumoto *et al.*, 1990) und (3) den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren („Rho guanine nucleotide exchange factor“, RhoGEFs) (Isomura *et al.*, 1990) (siehe Abb. 1, Seite 10).

3.3.1 RhoGAPs

RhoGAPs beschleunigen die intrinsische Hydrolyserate der monomeren aktivierten Rho-GTPasen um ein Vielfaches (bis zu 10^5 -fach) und ermöglichen dadurch eine schnelle Abschaltung von Rho-GTPasen in Signaltransduktionswegen (Bourne *et al.*, 1991). Derzeit sind über 80 humane RhoGAPs bekannt, denen allen neben unterschiedlichen strukturellen Protein- und Lipidbindungsmotiven eine konservierte RhoGAP-Domäne zugeordnet ist. Diese aus 150 Aminosäuren bestehende Domäne interagiert mit spezifischen Aminosäuren in den „switch“-Regionen von aktiven GTP-gebundenen Rho-GTPasen und fördert dadurch die Hydrolyse des γ -Phosphats des gebundenen GTPs. Die Rho-GTPasen werden durch dieses Ereignis in den inaktiven GDP-gebundenen Zustand zurückgeführt (Moon & Zheng, 2003; Bernards & Settleman, 2004; Scheffzek & Ahmadian, 2005).

3.3.2 RhoGDIs

Die RhoGDI-Proteine stellen eine Familie aus drei Mitgliedern dar (RhoGDI- α , RhoGDI- β und RhoGDI- γ), welche eine distinkte Bindungselektivität für zumindest einige der Rho-GTPasen Proteine aufweisen (Ohga *et al.*, 1989; Olofsson, 1999). RhoGDIs extrahieren Rho-GTPasen sowohl in ihrer GDP- als auch in ihrer GTP-gebundenen Form aus der Membran und bilden im Zytosol einen stabilen RhoGDI/Rho-GTPasen-Komplex (Olofsson, 1999). Ebenso extrahiert RhoGDI bevorzugt durch die cAMP-abhängige Proteinkinkase A („cAMP dependent proteinkinase A“, PKA) oder cGMP-abhängige Proteinkinkase („cGMP dependent protein kinase“, cGK) phosphoryliertes RhoA aus der Plasmamembran und beendet somit frühzeitig den Signalweg der GTPase (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Sauzeau *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 2001). Des Weiteren können RhoGDIs die Rho-GTPasen nach der Extraktion aus der Plasmamembran an ein anderes Membrankompartiment innerhalb der Zelle transportieren (Dovas & Couchman, 2005; Dransart *et al.*, 2005). RhoGDIs interagieren nur mit prenylierten Rho-Proteinen und inhibieren den Nukleotidaustausch sowie GTP-hydrolysierende Aktivitäten (Hori *et al.*, 1991). Strukturanalysen von RhoGDI/Rho-GTPasen-Komplexen zeigen, dass diese RhoGDI-Proteine aus einer N-terminalen Domäne, welche den GDP/GTP-Zyklus des monomeren Proteins durch Bindung an spezifische Reste der „switch“-Regionen beeinflusst, sowie aus einer C-terminalen Domäne bestehen, die den Isoprenylrest der Rho-GTPase in einer hydrophoben „Tasche“ bindet (Li *et al.*, 1997; Scheffzek *et al.*, 2000).

3.3.3 RhoGEFs

RhoGEFs beschleunigen die geringe, intrinsische Austauschaktivität der Rho-GTPasen von GDP zu GTP und sind somit direkt verantwortlich für deren Aktivierung und die damit einhergehende Wechselwirkung mit Effektorproteinen (Schmidt & Hall, 2002; Hakoshima *et al.*, 2003). 1985 wurde das Onkogen Dbl als erster Säugetier-GEF aus einem diffusen menschlichen B-Zell Lymphom isoliert (Eva & Aaronson, 1985). Dbl besitzt eine etwa 200 Aminosäuren große Proteindomäne, welche für die katalytische Aktivität des Proteins verantwortlich ist (Ron *et al.*, 1988; Ron *et al.*, 1991). Bis heute wurden anhand dieser Sequenz, die als Dbl-homologe Domäne (DH-Domäne) bezeichnet wird, 69 distinkte, putative RhoGEFs im menschlichen Genom identifiziert (Rossman *et al.*, 2005). Die DH-Domänen der Dbl-homologen RhoGEFs weisen, bis auf drei konservierte Regionen (C1-C3), eine niedrige Homologie in ihrer Primärsequenz auf. Selbst RhoGEFs, welche die gleiche Substratspezifität besitzen, haben oftmals eine Sequenzidentität innerhalb der DH-Domäne von weniger als 20 %. Mutationen in den konservierten Regionen können zu einer konstitutiv aktiven oder dominant negativen Veränderung des RhoGEFs führen (Aghazadeh *et al.*, 1998). Für die spezifische Bindung an die jeweilige GTPase sind die nicht-konservierten Aminosäuren der DH-Domäne von Bedeutung. Die Mutation einer Aminosäure im nicht-konservierten Bereich der DH-Domäne kann zu einer Veränderung der Substratspezifität des jeweiligen RhoGEFs führen (Worthylake *et al.*, 2000; Karnoub *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2002; Rossman & Sondek, 2005). Bei nahezu allen RhoGEFs grenzt invariant 10-20 Aminosäuren C-terminal der DH-Domäne eine etwa 100 Aminosäuren lange Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) an (Haslam *et al.*, 1993). Verschiedene Studien zeigen, dass die Gegenwart der PH-Domäne bei vielen RhoGEFs die Nukleotid-Austauschfähigkeit deutlich verstärkt (Liu *et al.*, 1998; Rossman & Sondek, 2005). Des Weiteren wird einem kleinen Teil der bisher identifizierten PH-Domänen (33 %), aufgrund ihrer Fähigkeit Phospholipide der Plasmamembran zu binden, eine potenzielle Rolle bei der Membranbindung bzw. der allosterischen Regulation der RhoGEF-Aktivität über Lipide zugeschrieben (Harlan *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 1995; Lemmon, 2004).

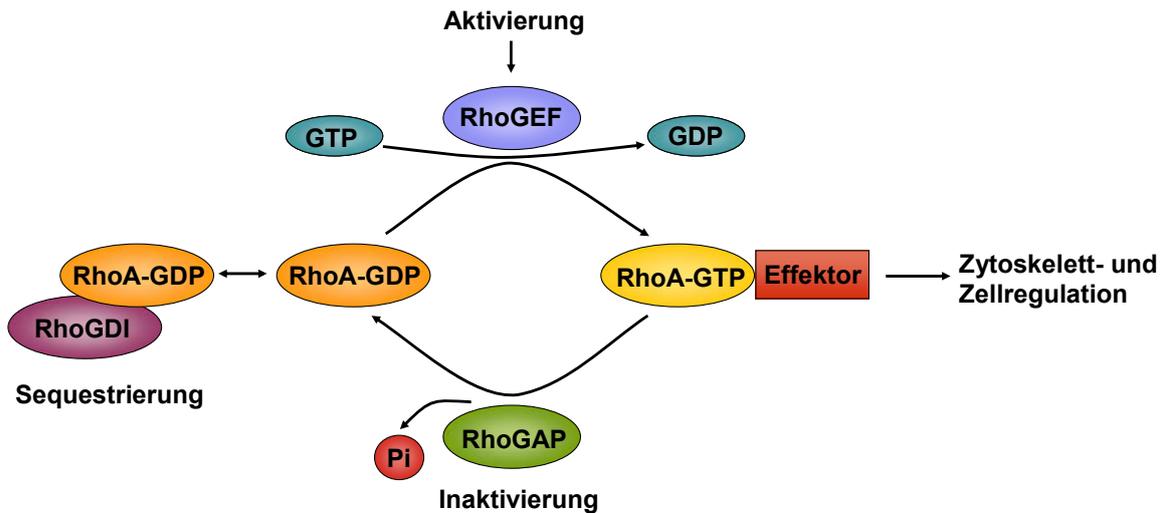


Abb. 1: Der molekulare Schaltermechanismus monomerer Rho-GTPasen. Abkürzungen: GEF („guanine nucleotide exchange factor“), GAP („GTPase activating protein“), GDI („guanine nucleotide dissociation inhibitor“), GTP (Guanosintriphosphat), GDP (Guanosindiphosphat), Pi (anorganisches Phosphat), Rho („Ras-homologous“).

3.4 Regulation von RhoGEFs

Als Regulator zahlreicher zellulärer Signalwege unterliegt auch die Aktivität der RhoGEFs selbst einer strikten Kontrolle. Trotz zahlreicher, für einzelne RhoGEFs spezifische Aktivierungsmechanismen, die sich wahrscheinlich aus der hochvariablen Sequenz- und Domänenstruktur der RhoGEFs erklären, zeichnen sich einige allgemeine Prinzipien der RhoGEF-Regulation ab. Zu diesen zählen die Aktivierung der RhoGEFs durch Entfernen von intramolekularen, inhibitorischen Sequenzen, durch Phosphorylierung, durch Phospholipidbindung, durch direkte Protein-Protein-Interaktionen sowie durch die Regulation der RhoGEF-Aktivität durch ihre subzelluläre Lokalisation. Die Abschaltung der RhoGEF-Aktivität kann wiederum durch Dephosphorylierung, Degradation oder durch spezifische Inhibitoren reguliert werden (Schmidt & Hall, 2002; Rossman *et al.*, 2005; Garcia-Mata & Burrige, 2007).

3.4.1 Aktivierung durch Entfernen intramolekularer, inhibitorischer Sequenzen sowie durch Phosphorylierung und Phospholipidbindung

Viele RhoGEFs besitzen eine regulatorische Domäne, die die Aktivität der Proteine durch eine intramolekulare Inhibition unterdrückt. Für einige Proteine, wie z. B. Dbl und p164-RhoGEF, konnte gezeigt werden, dass ein Entfernen von N- oder C-terminalen Sequenzen zu einer konstitutiven Aktivität der Proteine führt (Ron *et al.*, 1989; Rumenapp *et al.*, 2002). Andere Studien zeigen, dass bei einigen RhoGEFs die PH-Domäne die katalytische Aktivität reguliert (Das *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2002). In allen diesen Fällen wird angenommen, dass die Aktivierung der RhoGEFs wahrscheinlich durch Phosphorylierung oder durch Interaktion mit anderen Proteinen reguliert wird. Das am besten untersuchte Beispiel stellt

in diesem Zusammenhang Vav dar, das durch eine Tyrosinphosphorylierung einer N-terminalen mit der DH-Domäne interagierenden Sequenz sowie durch eine Phosphorylierung des PH-Domänen-gebundenen inhibitorisch wirkenden Phospholipids PI-4,5-P₂ (Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat) durch die PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) zu PI-3,4,5-P₃ (Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat) aktiviert wird (Crespo *et al.*, 1997; Salojin *et al.*, 1999; Bustelo, 2000; Han *et al.*, 1998).

3.4.2 Aktivierung durch direkte Protein-Protein-Interaktion

Einen weiteren Regulationsmechanismus stellt die Aktivierung von RhoGEFs durch heterotrimere G-Proteine dar. Eine Stimulation von G_{12/13}-Protein-gekoppelten Rezeptoren („G_{12/13}-protein coupled receptor“, G_{12/13}PCR) induziert eine Aktivierung der G_{α12/13}-Untereinheiten, die an die RGS-ähnliche („regulator of G-protein signaling“) Domäne von p115RhoGEF binden. Die RGS-Domäne agiert als GAP und stimuliert die GTPase-Aktivität von G_{α12/13}. Gleichzeitig erhöht die Bindung von G_{α12/13}-GTP die Austauschaktivität von p115RhoGEF für RhoA-C (Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998; Kozasa, 2001). Die Rho-spezifischen GEFs LARG (Leukämie-assoziiertes RhoGEF) und PDZ-RhoGEF binden ebenfalls wie p115RhoGEF aktiviertes G_{α12/13}, werden dadurch aktiviert und führen zu einer Aktivierung von Rho-Proteinen (Tanabe *et al.*, 2004; Fukuhara *et al.*, 1999; Fukuhara *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002). LARG kann außerdem durch aktivierte G_{αq}- bzw. G_{α11}-Untereinheiten stimuliert werden (Booden *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 2003). Ebenso wurde für den kürzlich identifizierten p63RhoGEF eine spezifische Aktivierung durch G_{αq/11}-Untereinheiten nachgewiesen (Lutz *et al.*, 2005). Zudem können bestimmte andere RhoGEFs, wie z. B. P-Rex oder Tiam1, durch Gβγ- und PI3K-abhängige Signalwege aktiviert werden (Welch *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 2007). Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus ist die Oligomerisierung von RhoGEFs (Zhu *et al.*, 2001; Anborgh *et al.*, 1999). Ein gut untersuchtes Beispiel stellt Dbl dar, das in einem N-terminal deletierten konstitutiv aktiven Zustand, der z. B. in Karzinomzellen vorkommt (Dbl-Onkogen), Homo- sowie Hetero-Oligomere mit dem nah verwandten RhoGEF Dbs/Ost bildet. Die Oligomerisierung wird durch die CR2-Region der DH-Domäne vermittelt und ist wahrscheinlich wichtig für die Generierung größerer Signalkomplexe, die die Anzahl aktivierter GTPasen lokal stark erhöht, was die Möglichkeit, mehrere Signalwege koordiniert zu aktivieren, erlauben könnte. Ob das Volllängenprotein von Dbl (Dbl-Protoonkogen), in dem der N-Terminus die DH-Domäne maskiert, in der Lage ist Oligomere zu bilden, ist nicht bekannt. Allerdings ist es denkbar, dass die Oligomerisierung erst nach Aufhebung der N-terminalen Autoinhibition möglich ist und einen zweiten Schritt in der Aktivierung von Dbl darstellt (Schmidt & Hall, 2002).

3.4.3 Regulation der RhoGEFs durch subzelluläre Lokalisation

Viele zelluläre Funktionen der Rho-GTPasen, wie z. B. Zellpolarität und Migration sind abhängig von ihrer lokalen, intrazellulären Aktivierung. Deshalb ist die subzelluläre Lokalisation der RhoGEFs für die koordinierte Aktivierung der Rho-GTPasen von Bedeutung. In vielen Fällen (z. B. Sos1 oder Tiam1) konnte nach einer Aktivierung der Rho-spezifischen GEFs eine veränderte Lokalisation in der Zelle beobachtet werden (Schmidt & Hall, 2002). Wie bereits erwähnt wurde, vermittelt die PH-Domäne in einigen Fällen durch die Bindung von Phospholipiden die Translokation an die Plasmamembran. Darüberhinaus haben Fraktionierungs-Experimente gezeigt, dass einige RhoGEFs konstitutiv an die Plasmamembran gebunden zu sein scheinen (Whitehead *et al.*, 1999) und andere wie z. B. Sos1 oder Tiam1 durch bestimmte Signale, wie z. B. Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivierung oder als Antwort auf eine zelluläre Aktivierung, an die Plasmamembran translozieren (Buday & Downward, 1993; Gale *et al.*, 1993; Skolnik *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997). Des Weiteren haben Immunfluoreszenz- und subzelluläre Fraktionierungs-Experimente gezeigt, dass die RhoGEFs Dbl und Lbc in einer PH-Domänen-abhängigen Art nicht an die Plasmamembran, sondern an Aktin-Stressfasern translozieren (Zheng *et al.*, 1996; Bi *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 1997). Möglicherweise induzieren RhoGEFs abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation verschiedene Prozesse in der Zelle (Schmidt & Hall, 2002). Die subzelluläre Kompartimentierung der RhoGEFs kann auch durch Translokation an aktivierte Zelloberflächen-Rezeptoren reguliert werden. Das am besten untersuchte Beispiel ist in diesem Zusammenhang Vav, das z. B. durch eine SH2/SH3-abhängige Interaktion mit Adapterproteinen an aktivierte B- und T-Zell-Rezeptoren transloziert (Bustelo, 2000). Außerdem wurde berichtet, dass die Bindung von $G\alpha_{13}$ an p115RhoGEF nicht nur zu einer Aktivierung des Proteins führt, sondern auch eine Relokalisation vom Zytoplasma zur Plasmamembran zur Folge hat (Bhattacharyya & Wedegaertner, 2000). Ein distinkter Mechanismus der Regulation der RhoGEF-Aktivität durch deren Lokalisation wurde für die zwei Proteine Ect1 und Net1 beschrieben. Diese werden durch zwei N-terminal gelegene nukleäre Lokalisationssignale in den Zellkern transportiert und dadurch von ihren Substraten getrennt (Prokopenko *et al.*, 1999; Tatsumoto *et al.*, 1999; Schmidt & Hall, 2002). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass Ect1 über die Interaktion mit einem Adapterprotein an der Aktivierung von RhoA durch Tyrosinkinase-Rezeptoren in der Membran beteiligt sein könnte (Nacak *et al.*, 2007).

3.4.4 Inhibition der RhoGEFs

Normalerweise erfolgt die Abschaltung der RhoGEF-Aktivität durch Umkehrung des Aktivierungsmechanismus, z. B. durch Dephosphorylierung, Aufhebung der Protein-Protein- oder Lipid-Protein-Interaktion. Jedoch ist die Deaktivierung der RhoGEFs komplexer, da einige Proteine identifiziert wurden, die als Inhibitoren der RhoGEFs agieren können. Die Aktivität von Vav, Tiam1 und p115RhoGEF wird z. B. durch Bindung von spezifischen Inhibitoren unterdrückt (Bustelo *et al.*, 1997; Germani *et al.*, 1999; Otsuki *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Auf welche Art und Weise diese Moleküle die RhoGEF-Funktion inhibieren ist nicht bekannt. Möglicherweise spielt z. B. die Interaktion des Inhibitors mit Vav eine Rolle bei der Ubiquitinierung und Degradierung des Proteins (De Sepulveda *et al.*, 2000). Außerdem besitzen einige RhoGEFs, wie z. B. Ras-GRF2 zusätzlich eine PEST-Domäne, die für die Degradation des Proteins zuständig ist (De Hoog *et al.*, 2001; Rechsteiner & Rogers, 1996).

3.5 Stickstoffmonoxid/zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat/cGMP-abhängige Protein-kinase-Signalkaskade

3.5.1 Regulation der cGMP-Synthese

cGMP (zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat) besitzt ähnlich wie cAMP (zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat) wichtige Funktionen als intrazelluläres Signalmolekül bei der Regulation von verschiedenen zellulären Ereignissen (Ashcroft, 1997). Obwohl viele der biologischen Funktionen von cGMP noch geklärt werden müssen, ist es ein etabliertes, ubiquitäres second messenger Molekül, das unter anderem an der glattmuskulären Relaxation, an der Inhibition der Blutplättchenaggregation und an der Regulation der Proliferation bzw. Migration der SMC sowie der Endothelzellen involviert ist (Hofmann *et al.*, 2006). Zwei Hauptgruppen der cGMP-bildenden Enzyme wurden identifiziert (Chrisman *et al.*, 1975). Dies sind zum einen die Peptid („atrial natriuretic peptide“, ANP; „brain natriuretic peptide“, BNP; „C-type natriuretic peptide“, CNP und Guanylin)-regulierten partikulären Guanylylzyklasen (pGC) (Kobialka & Gorczyca, 2000) und zum anderen die Stickstoffmonoxid (NO)-sensitiven GC, die hauptsächlich im Zytosol lokalisiert sind (Poulos, 2006).

3.5.2 Regulation der NO-sensitiven Guanylylzyklasen

Die NO-sensitiven GC sind die am besten charakterisierten Rezeptoren für NO, das von den NO-Synthasen (NOS) produziert wird. Die Enzymfamilie der NOS umfasst die neuronale NOS (nNOS, NOS-1), die induzierbare NOS (iNOS, NOS-2) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS-3) (Bredt *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 1990). Die eNOS und die nNOS sind konstitutiv exprimierte Enzyme und werden Calcium (Ca^{2+})-abhängig reguliert. Im Gegensatz dazu wird die iNOS Ca^{2+} -unabhängig aktiviert (Hecker *et al.*, 1991). Die Expression der iNOS ist induzierbar und wird auf

transkriptioneller Ebene reguliert (Geller *et al.*, 1993; Hanafy *et al.*, 2001). Alle drei NOS-Isoenzyme bilden Homodimere und katalysieren aus der Aminosäure L-Arginin durch Oxidation des terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe die Entstehung von L-Citrullin und NO (Palmer *et al.*, 1988). NO steuert zahlreiche physiologische Funktionen, wie z. B. den Gefäßtonus, die Regulation der Darmmotilität, die Aktivierung von Thrombozyten und besitzt Eigenschaften als Neurotransmitter (Bruckdorfer, 2005). Die physiologische Bedeutung von NO als Signalmolekül ist im Jahr 1987 entdeckt worden (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). In diesen Studien wurde biologisch freigesetztes NO als die wirksame Entität des Faktors aus der Endothelschicht von Blutgefäßen, dem „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980) identifiziert.

3.5.3 Effektoren von cGMP

Analysen des cGMP-Systems identifizierten eine Vielzahl von intrazellulären Effektoren von cGMP. Zu diesen zählen die cGMP-abhängigen Proteinkinasen („cGMP-dependent protein kinase“, cGK) (Christensen *et al.*, 1975), die cAMP-abhängigen Proteinkinasen („cAMP-dependent protein kinase A“, PKA) (Cornwell *et al.*, 1994), cGMP- bzw. cAMP-regulierte Phosphodiesterasen („phosphodiesterase“, PDE) (Sonnenburg & Beavo, 1994), durch zyklische Nukleotid-aktivierbare Kationenkanäle („cyclic nucleotide-gated cation channels“, CNG Kanäle) (Biel *et al.*, 1999) und möglicherweise die monomere GTPase Ras (Munzel *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2000). In vielen Zelltypen, wie z. B. auch in der glatten Muskulatur stellt die cGK einen der wichtigsten Effektoren für cGMP dar (Vaandrager & De Jonge, 1996) (Abb. 2).

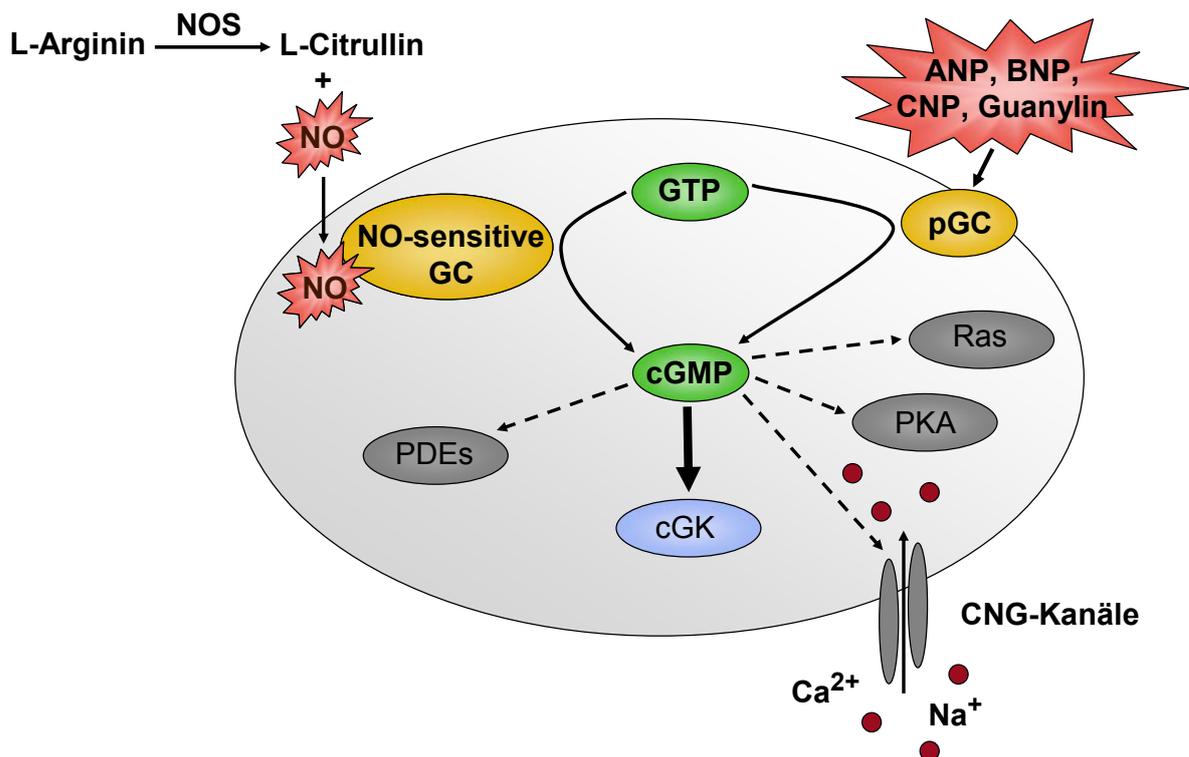


Abb. 2: Die cGMP-Signalkaskade in der glatten Muskulatur. Das second messenger Molekül cGMP wird aus GTP nach Stimulation der löslichen NO-sensitiven oder membrangebundenen Guanylylzyklase gebildet. cGMP aktiviert die cGK, CNG-Kanäle und reguliert cGMP- und cAMP-abhängige PDEs. Abkürzungen: cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase), PDE (Phosphodiesterase), CNG-Kanäle („cyclic nucleotide-gated cation channels“), Ras („rat sarcoma virus“), GC (Guanylylzyklase), pGC (partikuläre GC), NO (Stickstoffmonoxid), GTP (Guanosintriphosphat), cGMP (Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat), ANP („atrial natriuretic peptide“), BNP („brain natriuretic peptide“), CNP („C-type natriuretic peptide“).

3.5.4 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die cGKs gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und phosphorylieren spezifisch Substratproteine an den Aminosäuren Serin bzw. Threonin. Der phosphorylierte Aminosäurerest ist gewöhnlich in eine der typischen Konsensussequenzen **RKXS/T** bzw. **RRXS/T** eingebettet, die aus einem N-terminalen Arginin- und Lysinrest bzw. zwei Argininresten, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure und dem Serin- bzw. Threoninrest, bestehen. Die meisten der bislang identifizierten Substrate der cGKs enthalten diese so genannte PKA- bzw. cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz (Glass & Krebs, 1979; Tegge *et al.*, 1995; Pfeifer *et al.*, 1999). Im Genom von Vertebraten konnten bisher zwei verschiedene cGK-Gene nachgewiesen werden: die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) und Typ II (cGKII) (Gill *et al.*, 1976; Jarchau *et al.*, 1994). cGKI und cGKII sind sich zwar strukturell ähnlich, unterscheiden sich aber in ihrer Gewebsverteilung, subzellulären Lokalisation und Funktion (Schlossmann *et al.*, 2005). Generell sind die Kinasen aus drei funktionellen Domänen aufgebaut: Der regulatorischen Domäne, der katalytischen Domäne und dem Amino-Terminus (Pfeifer *et al.*, 1999; Francis & Corbin, 1999; Hofmann, 2005). Der Amino-Terminus steuert die Dimerisierung der homologen

Untereinheiten, die Inhibition und die Aktivierung des katalytischen Zentrums, die Autophosphorylierungs-abhängige Stimulation der Isoenzyme bei niedrigen cGMP-Konzentrationen sowie die subzelluläre Lokalisation des Enzyms bzw. die Interaktion mit anderen Proteinen (Feil *et al.*, 2003; Hofmann, 2005; Schlossmann *et al.*, 2005). Die regulatorische Domäne besitzt zwei aufeinander folgende cGMP-Bindungsstellen, die cGMP sowohl mit geringer als auch mit hoher Affinität binden (Hofmann *et al.*, 1985). Nach Bindung von 2 mol cGMP/mol Enzym an der regulatorischen Domäne kommt es zur Autophosphorylierung des Amino-Terminus an Threonin 59 der cGKI- α bzw. an Serin 64 und Serin 80 der cGKI- β unter Ausbildung einer Konformationsänderung der Isoenzyme (Landgraf *et al.*, 1990). Dadurch steigt der α -helikale Anteil an, wobei das Molekül expandiert (Zhao *et al.*, 1997) und die Hemmung der katalytischen Domäne durch die N-terminale Pseudo-Substratbindungsstelle aufgehoben wird. Die katalytische Domäne enthält eine große Bindungstasche für das Peptidsubstrat und eine kleine Mg^{+} -ATP-Bindungstasche. Bei einer Interaktion des Substrats mit der Bindungsstelle in der katalytischen Domäne wird das γ -Phosphat des ATPs auf den Serin- bzw. Threoninrest des Zielproteins übertragen (Pfeifer *et al.*, 1999).

Die ungefähr 75 kDa große cGKI ist ein Homodimer und liegt löslich im Zytosol vor (Gill *et al.*, 1976). Durch alternatives Spleißen zweier für den Amino-Terminus kodierender Exone entstehen zwei unterschiedliche Isoformen der cGKI, die cGKI- α bzw. cGKI- β (Francis *et al.*, 1988; Wolfe *et al.*, 1989), welche sich in den ersten etwa 100 Aminosäuren unterscheiden. Die aktive cGKI wurde 1972 zum ersten Mal im Rattenkleinhirn nachgewiesen (Hofmann & Sold, 1972) und wurde seitdem in vielen Geweben von Säugetieren identifiziert. Die höchste Expression der cGKI wurde unter anderem in vaskulären glatten Muskelzellen („vascular smooth muscle cell“, VSMC) (Keilbach *et al.*, 1992) sowie in Thrombozyten (Waldmann *et al.*, 1986) nachgewiesen und zu einem geringeren Anteil z. B. auch in Endothelzellen von Blutgefäßen (Draijer *et al.*, 1995) sowie in Kardiomyozyten (Kumar *et al.*, 1999). Etablierte Substrate der cGKI-Isoformen sind z. B. das Myosin-Bindungs-Substrat („mysin binding substrate“, MBS auch „mysin-targeting subunit of myosin light-chain phosphatase“, MYPT1) der Myosin-Leichtketten-Phosphatase („mysin light chain phosphatase“, MLCP) (Surks *et al.*, 1999), das IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat)-Rezeptor-assoziierte cGKI-Substrat (IRAG) (Schlossmann *et al.*, 2000) sowie RGS2 (Tang *et al.*, 2003). Ein weiteres Substrat der cGKI stellt unter anderem RhoA dar (Ellerbroek *et al.*, 2003). Die cGKII, deren molekulare Masse etwa 85 kDa beträgt, tritt ebenfalls als Homodimer auf (Jarchau *et al.*, 1994). Sie ist aufgrund einer Myristoylierung des Amino-Terminus membrangebunden und kommt im Gehirn, in Knochen, den Nieren und der intestinalen Mukosa vor (Pfeifer *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2000). Die cGKII stimuliert im Darm cGMP-regulierte Cl^{-} -Kanäle bzw. die Sekretion von Cl^{-} -Ionen und Wasser (Pfeifer *et al.*, 1996; Vaandrager *et al.*, 1997). In der Niere wirkt die cGKII vermutlich hemmend auf die Renin- und Aldosteronfreisetzung (Wagner *et al.*, 1998). Außerdem spielt die cGKII beim Knochenwachstum und bei der Steuerung des Tag-Nacht-Rhythmus eine Rolle (Pfeifer *et al.*, 1996; Golombek *et al.*, 2004).

3.6 Regulation des Gefäßtonus des glatten Muskels

3.6.1 Regulation der Ca^{2+} -abhängigen und Ca^{2+} -unabhängigen Kontraktion des glatten Muskels

Der kontraktile Zustand des glatten Muskels wird hauptsächlich durch Rezeptor- bzw. mechanisch-vermittelte Aktivierung von Myosin gesteuert. Dies ermöglicht die Interaktion von Aktin und Myosin und führt über einen ATP-abhängigen Zyklus des Myosinmoleküls an den Aktinfilamenten zur Verkürzung des Sarkomers und damit zur Kontraktion des glatten Muskels (Webb, 2003). Die Ca^{2+} -abhängige Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst, welches sowohl aus dem Extrazellulärraum als auch aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol der glatten Muskulatur gelangen kann (Berridge *et al.*, 1998; Berridge *et al.*, 2003; Mcdaniel *et al.*, 2001). Agonisten, wie z. B. Noradrenalin oder Angiotensin II, die an $\text{G}_{q/11}$ PCRs binden, lösen eine Ca^{2+} -abhängige Kontraktion der glatten Muskulatur aus. Die Ligandenbindung an den GPCR hat eine Aktivierung der heterotrimeren $\text{G}_{q/11}$ -Proteine zur Folge, die ihrerseits die Phospholipase C- β (PLC- β) aktivieren (Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2001). PLC- β katalysiert die Entstehung der Botenstoffe Diäzylglyzerol (DAG) und IP_3 (Filtz & Niibori, 2004). IP_3 induziert durch Bindung an den IP_3 -Rezeptor, einem Ionenkanal des SR, die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol (Bootman *et al.*, 2002; Hisatsune *et al.*, 2005). Die Agonisten-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR löst in der Plasmamembran die Öffnung von speichergesteuerten Kanälen aus, was als ein kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom bezeichnet wird. Dieser Ca^{2+} -Einstrom dient zur Wiederbeladung des leeren SR mit Ca^{2+} und zur Aufrechterhaltung einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Mcdaniel *et al.*, 2001). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin- (CaM) abhängigen leichten Myosinketten-Kinase („myosin light chain kinase“, MLCK) und zur Phosphorylierung der RLC am Serin-19, welches den Schlüsselmechanismus zur Kontraktion der glatten Muskulatur darstellt (Schlossmann *et al.*, 2003) (siehe Abb. 3, Seite 19). Zudem wird der Phosphorylierungsgrad der RLC Ca^{2+} -unabhängig von der MLCP gesteuert. Die MLCP reguliert die Relaxation des glatten Muskels durch Abspaltung der Phosphatgruppe von der RLC (Lee *et al.*, 1997). Die MLCP ist ein Holoenzym, das aus drei Untereinheiten zusammengesetzt ist: Einer etwa 37 kDa großen katalytischen Untereinheit (PP1c), einer 110-130 kDa großen regulatorischen Untereinheit (MYPT1) sowie einer 20 kDa großen Untereinheit, deren Funktion noch unbekannt ist (Hartshorne, 1998; Kitazawa *et al.*, 2003). Die Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch eine Stimulation von $\text{G}_{12/13}$ PCRs über die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalwegs vermittelt (Gohla *et al.*, 2000). Die Aktivierung der ROCK katalysiert eine Phosphorylierung der MYPT1-Untereinheit der MLCP und vermindert dadurch deren Enzymaktivität. Die Hemmung der MLCP erhöht den Phosphorylierungsgrad der RLC und führt dadurch bei konstantem Ca^{2+} -Spiegel zur Verstärkung der Kontraktion der glatten Muskulatur

(Bonnevier *et al.*, 2004; Somlyo & Somlyo, 1998). Dieser Vorgang wird auch Ca^{2+} -Sensibilisierung genannt. Die RLC-Phosphorylierung wird also durch eine Agonisten-induzierte duale Regulation über die Aktivierung von $G_{q/11}$ - und $G_{12/13}$ -Proteinen vermittelt. Weitere Möglichkeiten zur Hemmung der MLCP-Aktivität stellt die Phosphorylierung des PKC-stimulierten Myosin-Phosphatase Inhibitorproteins (CPI-17) (Eto *et al.*, 1995; Kitazawa *et al.*, 2000; Kitazawa *et al.*, 2004; Bonnevier & Arner, 2004) und die Arachidonsäure-induzierte Dissoziation der MLCP dar (Xiao *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von CPI-17 wird unter anderem auch von der ROCK (Koyama *et al.*, 2000), der Proteinkinase N (PKN), der „MYPT1-assoziierten“-Kinase (Macdonald *et al.*, 2001) und der „integrin-linked“-Kinase (Deng *et al.*, 2001) vermittelt. Das Gleichgewicht des RLC Phosphorylierungsgrads wird folglich zum einen durch den RhoA/ROCK-Signalweg und zum anderen durch eine Phosphorylierung des CPI-17 Proteins in Richtung phosphorylierter RLC verschoben, wodurch eine Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion des glatten Muskels induziert wird (Hofmann, 2005; Somlyo & Somlyo, 2000) (Abb. 3).

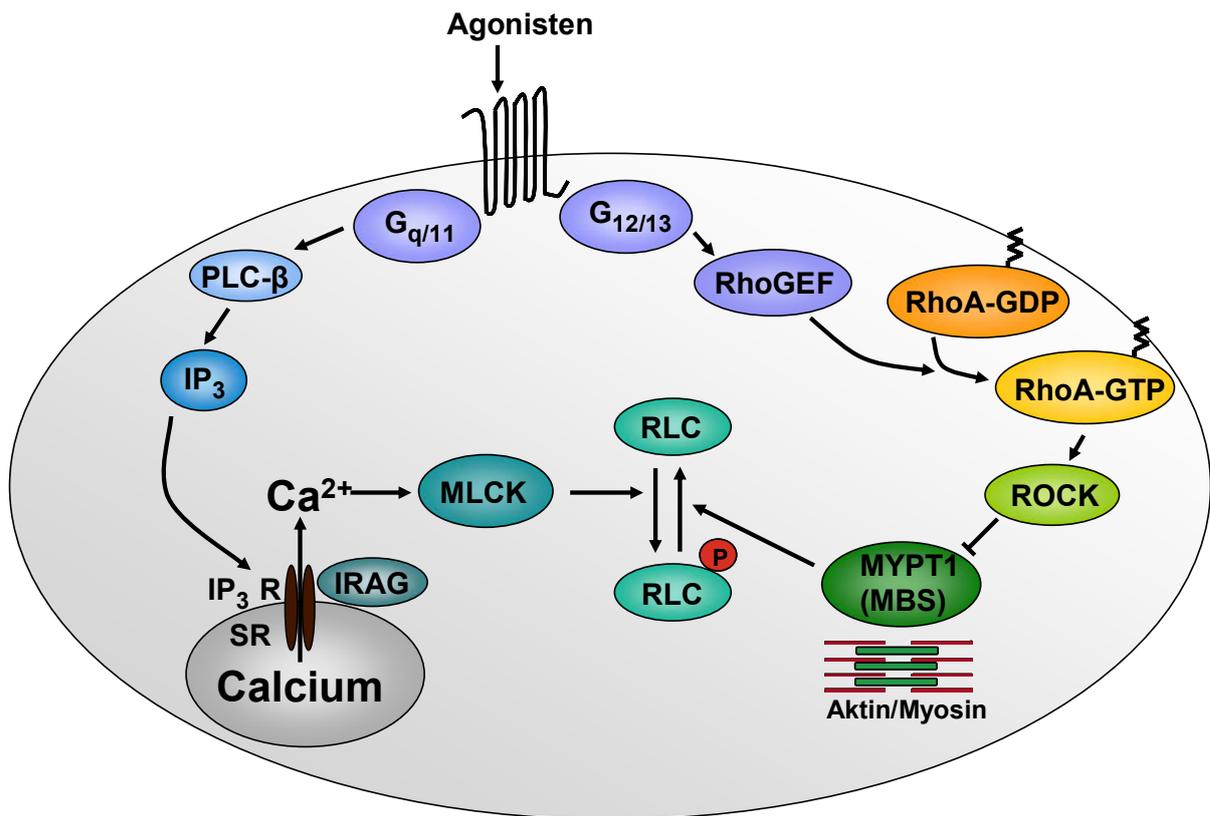


Abb. 3: Ca²⁺-abhängige und Ca²⁺-unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur. Die Aktivierung der G_{q/11}-Proteine führt zur Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR und Aktivierung der Ca²⁺/CaM-abhängigen MLCK. G_{12/13}-Proteine aktivieren den RhoA/ROCK-Signalweg und hemmen die MLCP-Aktivität. Beide Signalwege erhöhen den Phosphorylierungsgrad der RLC und führen zur Kontraktion des glatten Muskels. Weitere Erklärungen im Text. Abkürzungen: G_{q/11} (heterotrimeres G_{q/11}-Protein), G_{12/13} (heterotrimeres G_{12/13}-Protein), Rho („Ras-homologous“), GEF („guanine nucleotide exchange factor“), GTP (Guanosintriphosphat), GDP (Guanosindiphosphat), ROCK (Rho-Kinase), MYPT1 („myosin-targeting subunit of myosin light-chain phosphatase“), MBS („myosin binding substrate“), RLC („regulatory light chain“), MLCK (Calmodulin-abhängige leichte Myosinketten-Kinase), Ca²⁺ (Calciumion), IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat), IRAG (IP₃-Rezeptor-assoziiertes cGKI-Substrat), SR (sarkoplasmatisches Retikulum), PLC (Phospholipase C), CaM (Calmodulin), R (Rezeptor), P (Phosphat).

3.6.2 Regulation der cGMP/cGKI-abhängigen Relaxation des glatten Muskels

Die Relaxation des glatten Muskels durch den cGMP/cGKI-Signalweg wird sowohl über Ca²⁺-abhängige als auch Ca²⁺-unabhängige Mechanismen vermittelt (Schlossmann *et al.*, 2005). In Abbildung 4 (Seite 21) sind die wichtigsten Angriffsziele der cGKI im glatten Muskel dargestellt. Das im glatten Muskel überwiegend exprimierte Isoenzym der cGKI ist die cGKI-β (Keilbach *et al.*, 1992). Das IP₃-Rezeptor-assoziierte cGKI-Substrat (IRAG) wurde als ein Substratprotein der cGKI-β identifiziert (Schlossmann *et al.*, 2000), das mit dem IP₃-Rezeptor und der cGKI-β assoziiert ist. Eine cGKI-β-abhängige Phosphorylierung von IRAG vermittelt vermutlich die Relaxation des glatten Muskels, welche möglicherweise die Hormon-induzierte Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR inhibiert (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit die intrazelluläre

Ca²⁺-Konzentration zu reduzieren, ist die cGKI-abhängige Phosphorylierung des Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanals (BK_{Ca}-Kanal) (Alioua *et al.*, 1998). Dadurch wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca}-Kanals bei konstanter Ca²⁺-Konzentration erhöht. Bei geöffnetem BK_{Ca}-Kanal kommt es durch den K⁺-Ausstrom zur Hyperpolarisation der Zelle, was schließlich zu einer Inaktivierung von spannungsaktivierten Ionenkanälen führt. Die Inaktivierung des L-Typ-Ca²⁺-Kanals reduziert den Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und verringert die zytosolische Ca²⁺-Konzentration (Fukao *et al.*, 1999; Taniguchi *et al.*, 1993). Die Phosphorylierung der PLC-β3 durch die cGKI-α führt vielleicht direkt zur Hemmung der IP₃-Synthese (Ruth *et al.*, 1993; Xia *et al.*, 2001). Jedoch ist noch nicht geklärt, ob diese Phosphorylierung eine Bedeutung für die Relaxation der glatten Muskeln hat. Dagegen trägt die Phosphorylierung des RGS2 durch die cGKI-α zur Translokation an die Plasmamembran bzw. zur Relaxation des glatten Muskels bei (Tang *et al.*, 2003). Die direkte Interaktion von RGS-Domänen an GTP-gebundene Gα-Untereinheiten bewirkt eine Inaktivierung der aktiven Gα-Untereinheit durch Beschleunigung der GTPase-Aktivität (Hepler, 1999), deshalb nimmt die Agonisten-induzierte IP₃-Bildung in RGS2 deletierten Zellen zu (Wang *et al.*, 2004). Ein weiteres Target der cGKI-vermittelten Relaxation stellt die MLCP dar, deren Aktivierung zur Desensitisierung gegenüber Ca²⁺ („Ca²⁺-Desensitisierung“) und somit zur Relaxation des glatten Muskels führt (Bonnevier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass die cGKI-α über den Amino-Terminus mit der MYPT1-Untereinheit der MLCP interagiert und diese Interaktion zur Regulation des Gefäßtonus der glatten Muskulatur essentiell ist (Surks & Mendelsohn, 2003; Surks *et al.*, 1999). Eine weitere Arbeit zeigt, dass die cGKI-α die beiden regulatorischen Untereinheiten MYPT1 und M20 der MLCP phosphoryliert, jedoch ohne die Phosphataseaktivität gegenüber der RLC zu ändern (Nakamura *et al.*, 1999). Eine cGKI- und PKA-abhängige Phosphorylierung des 17 kDa großen, glattmuskulär-spezifischen Proteins Telokin, welches mit der C-terminalen Domäne der glattmuskulären MLCK identisch ist (Ito *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1998), induziert vermutlich eine Ca²⁺-Desensitisierung durch die Aktivierung der MLCP (Choudhury *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 1998). Des Weiteren belegt eine Studie, dass der cGMP/cGKI-abhängige Signalweg der PKC-vermittelten Phosphorylierung von CPI-17 und damit der Ca²⁺-Sensitisierung entgegenwirken kann. Auf diese Weise erhöht die cGKI vermutlich die MLCP-Aktivität und induziert die Ca²⁺-Desensitisierung über einen RhoA/ROCK-unabhängigen Signalweg (Bonnevier & Arner, 2004). Einen weiteren Mechanismus zur Ca²⁺-Desensitisierung stellt die Inhibition der RhoA-vermittelten Ca²⁺-Sensitisierung durch eine cGKI-abhängige Phosphorylierung von RhoA am Serin 188 dar (Sauzeau *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 2001). Dies bewirkt eine Reduktion der ROCK-vermittelten Hemmung der MLCP (Ito *et al.*, 2004). Der Einfluss der cGKI-abhängigen Phosphorylierung von RhoA wird in dem folgenden Abschnitt genauer erläutert.

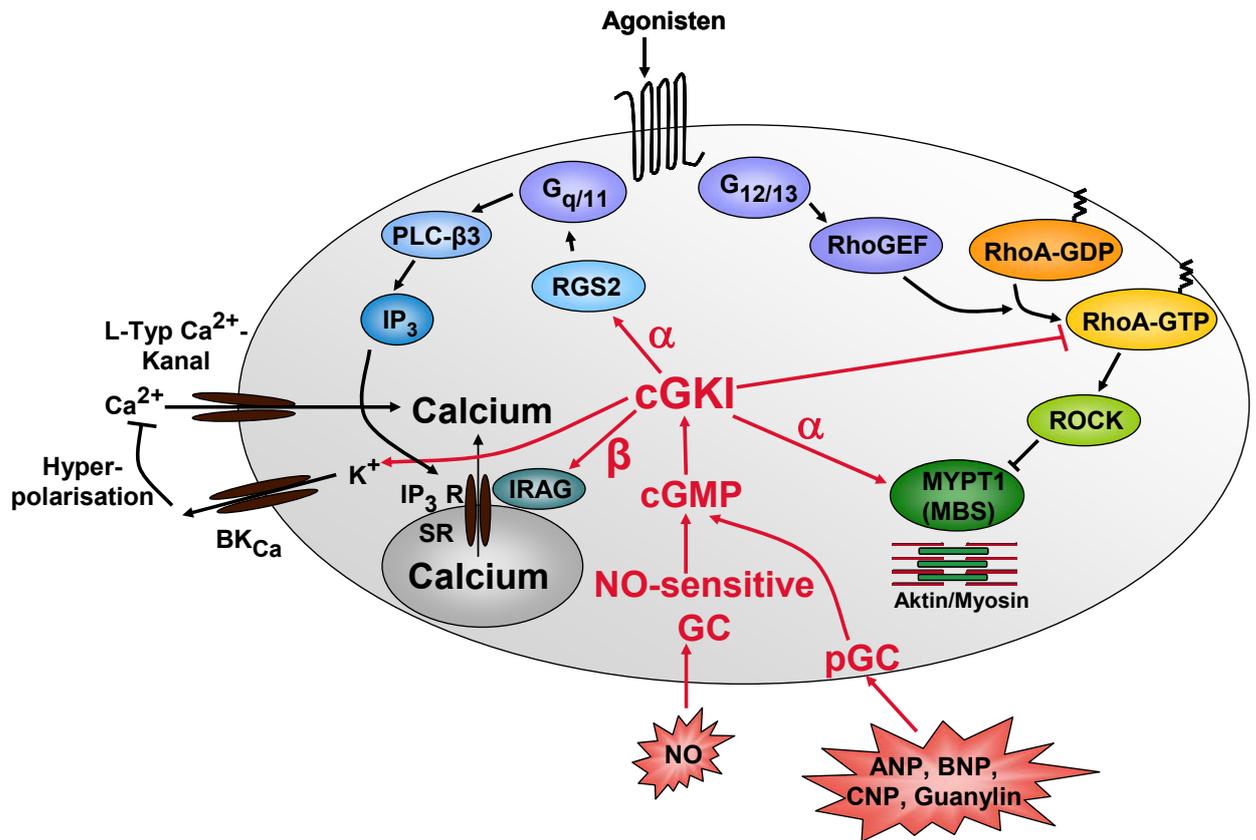


Abb. 4: Schematische Darstellung der NO/cGMP/cGKI-vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur. Mögliche Angriffsziele der cGKI sind RhoA, der BK_{Ca}-Kanal, RGS2, IRAG und die MYPT1 (MBS)-Untereinheit der MLCP. Weitere Erklärungen im Text. Abkürzungen: G_{q/11} (heterotrimeres G_{q/11}-Protein), G_{12/13} (heterotrimeres G_{12/13}-Protein), Rho („Ras-homologous“), GEF („guanine nucleotide exchange factor“), GTP (Guanosintriphosphat), GDP (Guanosindiphosphat), ROCK (Rho-Kinase), MYPT1 („myosin-targeting subunit of myosin light-chain phosphatase“), MBS („myosin binding substrate“, Ca²⁺ (Calciumion), IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat), IRAG (IP₃ Rezeptor-assoziiertes cGKI Substrat), SR (sarkoplasmatisches Retikulum), PLC (Phospholipase C), R (Rezeptor), IRAG (IP₃-Rezeptor-assoziiertes cGKI-Substrat), cGMP (zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat), cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), K⁺ (Kaliumion), BK_{Ca} (Ca²⁺-abhängiger Kaliumkanal), NO (Stickstoffmonoxid), GC (Guanylylzyklase), pGC (partikuläre GC), ANP („atrial natriuretic peptide“), BNP („brain natriuretic peptide“), CNP („C-type natriuretic peptide“).

3.6.3 Einfluss der cGKI auf RhoA

Erste Hinweise auf eine phosphorylierungsabhängige Regulation der Rho-Aktivität ergaben sich durch eine Behandlung von humanen Lymphozyten mit einem Aktivator der Adenylylzyklase. Die Akkumulation des cAMPs induzierte ähnliche morphologische Veränderungen wie der Rho-spezifische Inhibitor C3T (Lang *et al.*, 1996). Ausgehend von dieser anfänglichen Beobachtung konnte gezeigt werden, dass RhoA sowohl von der PKA als auch von der cGKI C-terminal am Serin 188 phosphoryliert werden kann (Lang *et al.*, 1996; Sawada *et al.*, 2001; Ellerbroek *et al.*, 2003). Diese PKA- bzw. cGKI-abhängige Phosphorylierung von RhoA inhibiert die RhoA-Funktion (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Sawada *et al.*, 2001), da PKA- bzw. cGKI-abhängig phosphoryliertes RhoA durch RhoGDI, ungeachtet des Aktivierungszustands (GDP oder GTP

gebunden) leichter aus der Plasmamembran extrahiert werden kann (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005; Kwak & Uhlinger, 2000). Dies verringert die Interaktionsfähigkeit von RhoA mit RhoGEFs oder Effektoren (Lang *et al.*, 1996; Laudanna *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1998). Mutationsstudien haben gezeigt, dass die inhibitorisch wirkende Phosphorylierung von RhoA am Serin 188 durch eine phosphorylierungsresistente RhoA-Mutante S188A aufgehoben werden kann (Sawada *et al.*, 2001; Ellerbroek *et al.*, 2003; Nusser *et al.*, 2006). Neben der direkten Interaktion mit RhoA scheint die cGKI den Rho-Signalweg jedoch auch ober- und unterhalb von RhoA zu beeinflussen. Dabei hemmt die cGKI sowohl die Aktivierung von endogenem RhoA nach Stimulation mit Serum oder durch aktiviertes $G\alpha_{12/13}$ bzw. $G\alpha_{q/11}$, als auch die SRF-abhängige Genexpression unterhalb von aktiviertem RhoA. Bei der Hemmung der SRF-abhängigen Genexpression scheint der Angriffspunkt der cGKI distal der Rho-Effektoren ROCK, PKN und PRK-2 („proliferation-related kinase“) zu liegen (Gudi *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser cGKI-vermittelten Hemmung der SRF-abhängigen Genexpression wird VASP („vasodilatator-stimulated phosphoprotein“) als mögliches Zielprotein beschrieben (Zhuang *et al.*, 2004). Zhuang und Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass VASP die SRF-abhängige Genexpression distal von Rho stimuliert. Diese Stimulation der SRF-abhängigen Genexpression kann durch eine cGKI-vermittelte Phosphorylierung von VASP an mehreren Phosphorylierungsmotiven inhibiert werden. Bei VASP-Mutanten ohne Phosphorylierungsmotive für die cGKI wird die SRF-abhängige Genexpression durch die cGKI nicht gehemmt (Zhuang *et al.*, 2004). Neben einer Inhibition RhoA-vermittelter Signalwege scheint der NO/cGMP/cGKI-abhängige Signalweg auch die Expression von RhoA zu regulieren. Dieser Mechanismus beinhaltet die cGKI-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-1, welcher als Homodimer an das „cAMP-response-element“ (CRE) des RhoA-Promotors bindet und die Aktivierung des Promotors induziert (Sauzeau *et al.*, 2003). Außerdem erhöht die Aktivierung des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs möglicherweise die Stabilität des RhoA-Proteins. Studien zeigen, dass die cGKI-abhängige Phosphorylierung RhoA vor einer Ubiquitin-vermittelten Degradation an der Plasmamembran durch Forcierung der Rho-GDI vermittelten zytosolischen Lokalisation schützt. Der Mechanismus der cGKI-abhängigen Phosphorylierung stellt folglich einen physiologischen Prozess dar, der das Niveau des stabilen Zustands sowie die Expression von RhoA zu regulieren und RhoGDI/RhoA-GTP nach Stimulation der cGKI-Aktivität im Zytosol zu akkumulieren vermag (Sauzeau *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). *In vivo* Experimente zeigen, dass dieser Prozess aktiv ist und dass eine Stimulation oder Inhibition des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs die RhoA-Phosphorylierung und die Lokalisation in VSMC reguliert (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Der inhibitorische Einfluss von cGMP/cGKI auf RhoA stellt also einen Mechanismus dar, durch welchen endotheliales NO die Relaxation der VSMCs regulieren kann. Eine gesteigerte RhoA-Aktivierung ist zusätzlich zur Modulation der Kontraktion der glatten Muskulatur in die Kontrolle von zahlreichen anderen zellulären Funktionen involviert, wie z. B. die Proliferation und die Migration von VSMCs und Endothelzellen (Seasholtz *et al.*, 1999). Folglich

vermittelt eine cGMP/cGKI-abhängige Phosphorylierung und Inhibition von RhoA durch NO z. B. blutdrucksenkende, antiproliferative und antimigratorische Effekte (Garg & Hassid, 1989; Rudic *et al.*, 1998). Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass unter bestimmten physiologischen Bedingungen, bei denen eine gesteigerte RhoA-Aktivierung induziert wird sowie in VEGF („vascular endothelial growth factor“)-stimulierten Endothelzellen der cGMP/cGKI-abhängige Signalweg keinen Einfluss auf die RhoA-Aktivierung hat bzw. sogar zu einer RhoA-Aktivierung führt (Gratacap *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006; Worner *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2002b).

3.7 Zielsetzungen der Arbeit

p164-RhoGEF, GrinchGEF sowie das bisher funktionell noch nicht charakterisierte RhoGEF10 bilden eine Subfamilie der Dbl-Proteinfamilie. Diese drei Proteine weichen von dem üblichen Modell eines DH-PH-Tandem Motivs ab. Sie bestehen aus einer N-terminal lokalisierten katalytischen DH-Domäne, einer ungewöhnlichen, falls überhaupt existierenden PH-Domäne und einer putativen C-terminalen WD-40-ähnlichen Domäne mit einer β -Propeller-ähnlichen Struktur (Winkler *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2000). Für GrinchGEF und RhoGEF10 wurden zusätzlich putative Transmembransegmente beschrieben (Schmidt & Hall, 2002), welche bei GrinchGEF nicht funktionell sind. Trotz der hohen strukturellen Homologie weisen die drei RhoGEFs ein distinktes Expressionsmuster auf. Während p164-RhoGEF hauptsächlich in gefäßreichen Geweben, wie z. B. Herz, Niere oder Lunge und GrinchGEF vorwiegend im Skelettmuskel und Pankreas exprimiert wird, zeigt RhoGEF10 ein ubiquitäres Vorkommen mit dem höchsten Anteil in gefäßreichen Geweben. Inhärent für p164-RhoGEF ist vermutlich eine Autoinhibition durch eine Interaktion des N- und C-Terminus und eine Spezifität für Rho. GrinchGEF aktiviert die Rho-Isoformen RhoA-C mit einer ähnlichen Präferenz (Yoshizawa *et al.*, 2003; Rumenapp *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2005). Über eine mögliche physiologische Relevanz von GrinchGEF und p164-RhoGEF sowie über mögliche Regulationsmechanismen dieser drei Proteine ist bisher in der Literatur noch nichts beschrieben worden. Für RhoGEF10 wurde eine physiologische Bedeutung bei der Nerven-Weiterleitungsgeschwindigkeit angenommen (Verhoeven *et al.*, 2003).

Das Ziel der Untersuchungen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, war die Charakterisierung der bisher nicht näher untersuchten Guaninnukleotid-Austauschfaktoren p164-RhoGEF und RhoGEF10. Im Besonderen sollten die Aktivierungsmechanismen aufgeklärt und zelluläre Systeme bzw. Gewebe identifiziert werden, in welchen p164-RhoGEF und RhoGEF10 von funktioneller Bedeutung für die physiologische und pathophysiologische Aktivierung von Rho-Proteinen sind.

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. Weitere Materialien wurden bezogen von:

4.1.3 Feinchemikalien

| | |
|--------------------|--|
| Ampholyte | IPG-Puffer, nicht-linear, pH 3-10 GE Healthcare |
| AMP-PNP | Sigma-Aldrich |
| 8-Bromo-cAMP | Sigma-Aldrich |
| 8-Bromo-cGMP | Sigma-Aldrich/Biolog |
| Calyculin A | Santa Cruz |
| GTP | Roche |
| H-1152P | Calbiochem |
| H-89 | Calbiochem |
| KT-5823 | Sigma-Aldrich |
| Okadainsäure | Sigma-Aldrich |
| Protease-Inhibitor | Complete (mini) Tablette, Roche |
| 8-pCPT-cGMP | Biolog |
| Rp-8-pCPT-cGMP | Biolog |
| SNP | Sigma-Aldrich |
| TRITC-Phalloidin | Sigma-Aldrich |
| Y-27632 | Calbiochem |

4.1.4 Radiochemikalien

[8,5'-³H]-GDP, 14.5 Ci/mmol, 536 G Bq/mmol PerkinElmer

4.1.5 Antikörper

Die Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden in TBST-Puffer verdünnt.

| Primärantikörper | Verdünnung | Inkubations- bedingung | Sekundärantikörper |
|--|------------|---------------------------|--------------------|
| anti-RhoA monoklonal, sc-418, Santa Cruz | 1:200 | ü. N., 4°C | anti-Maus |
| Anti-RhoA/B/C (H-70) polyklonal, sc-28565, Santa Cruz | 1:500 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-Rac1 monoklonal, 610650, Transduction | 1:1'000 | 1 h, RT | anti-Maus |
| anti-Cdc42 monoklonal, 17-299, Upstate | 1:250 | ü. N., 4°C | anti-Maus |
| anti-c-myc monoklonal, Klon 9E10, Roche | 1:200 | 1 h, RT | anti-Maus |
| anti-HA polyklonal, K03100R, Bioscience | 1:500 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-GAPDH monoklonal, H86504M, Bioscience | 1:4'000 | ü. N., 4°C | anti-Maus |
| anti-Histon-H1 polyklonal, sc-10806, Santa Cruz | 1:200 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-Gβ monoklonal, sc-378, Santa Cruz | 1:400 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-Phospho-(Ser/Thr)- PKA polyklonal, 9621, Cell Signaling | 1:1'000 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-RhoGEF10 polyklonal, PAB-11686, Orbigen | 1:1'000 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-RhoGEF17 polyklonal, (Kaninchen-Serum; affinitätsaufgereinigt) | 1:1'000 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |
| anti-cGKI polyklonal, (von H. Schlossmann zur Verfügung gestellt) | 1:1'000 | ü. N., 4°C | anti-Kaninchen |

Tab. 1: Primärantikörper.

| Sekundärantikörper | Verdünnung | Inkubations- bedingung |
|---|------------|---------------------------|
| anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase- Konjugat (Ziege) A-9169, Sigma-Aldrich | 1:80'000 | 45 min, RT |
| anti-Maus-IgG-Peroxidase- Konjugat (Ziege) A-9044, Sigma-Aldrich | 1:10'000 | 45 min, RT |

Tab. 2: Sekundärantikörper.

4.1.6 Enzyme

| | |
|---|---|
| Alkalische Phosphatase (CIAP) | Fermentas |
| FideliTaq-Polymerase | USB |
| Klenow (Großes Fragment der DNA Polymerase I) | Fermentas |
| PfuTurboHotstart-Polymerase | Stratagene |
| Restriktionsenzyme | Fermentas, Invitrogen, New England BioLabs |
| Reverse Transkriptase (AMV) | Roche |
| Taq-Polymerase | Qiagen |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas |

4.1.7 Genspezifische Primer

Die Primer wurden von der Firma Sigma-Ark synthetisiert und sind in 5'→3'-Orientierung aufgelistet. „For“ steht für einen Primer in sense- und „rev“ für einen Primer in antisense-Richtung. Die gelieferten Lyophilisate wurden in einer adäquaten Menge dest. Wasser aufgenommen, um eine 100 µM Primerlösung zu erhalten.

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| RhoGEF17-19-for (EcoRI) | aaaggtaccgaattctggcggacggggcacc |
| RhoGEF17-2007-rev (KpnI) | cctgtggtaccaggccgcaa |
| RhoGEF17-5302-for | aggaacagcatgaagctccag |
| RhoGEF17-6108-rev | cccaccacagataccatctt |
| RhoGEF17-Ratte-3636-for | tgacctcatgatcaagccc |
| RhoGEF17-Ratte-6200-rev | tcagagcaggtggttgctgt |
| RhoGEF17-Maus-3151-for | tgctgtagcaagccacaagt |
| RhoGEF17-Maus-3436-rev | tggtcaccaagacgtcttgg |

| | |
|-------------------|-----------------------|
| RhoGEF10-735-for | atcaagtcggtcgagaggaca |
| RhoGEF10-1271-rev | aagatctgtgatcctgtgcga |
| PBGD-for | cctgaaactctgcttcgctg |
| PBGD-rev | ctggaccatcttcttgctgaa |

Mutagenese-Primer:

Die Mutagenese-Primer wurden mit einer „stillen“ Restriktionsschnittstelle konzipiert, um die erfolgreiche Mutagenese zu überprüfen. In Tabelle 3 sind die durchgeführten Mutagenesen aufgelistet.

| | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| RhoGEF17-ΔN-S1324A-for (BamHI) | ctgaagcgaaaggcaggatccctgcggcgc |
| RhoGEF17-ΔN-S1324A-rev (BamHI) | gcgccgcagggatcctgccttcgcttcag |
| RhoGEF17-ΔN-SS1330/31AA-for (NruI) | tccctgcggcgcacccgatgagcctgtac |
| RhoGEF17-ΔN-SS1330/31AA-rev (NruI) | gtacaggctcatcgcatgcccgcaggga |
| RhoGEF17-ΔN-S1331E-for | tccctgcggcgcagcgagatgagcctgtac |
| RhoGEF17-ΔN-S1331E-rev | gtacaggctcatctcgctgcgccgcaggga |
| RhoGEF17-ΔN-SS1716/17AA-for (NcoI) | gcccttcgccgcgccatccatggctcctccacc |
| RhoGEF17-ΔN-SS1716/17AA-rev (NcoI) | ggtaggagggccatggatggcgcggcgaagggc |
| RhoGEF17-ΔN-S1765A-for (HindIII) | gaccgcaggaacatcatgaagcttcagcatgcg |
| RhoGEF17-ΔN-S1765A-rev (HindIII) | cgcatgctgaagcttcatgatgttctcggtc |
| RhoA-S188A-for (BsrFI) | cgtgggaagaaaaagccggtgcctgtcttg |
| RhoA-S188A-rev (BsrFI) | caagacaaggcaaccggcttttcttcccacg |
| RhoA-S188E-for | cgtgggaagaaaaagagggtgcctgtcttg |
| RhoA-S188E-rev | caagacaaggcaaccctcttttcttcccacg |

| Name des Klons | „template“ bzw. Matrize | Primer |
|-------------------------|-------------------------|--|
| RhoGEF17-ΔN-S1324A | RhoGEF17-ΔN* | RhoGEF17-ΔN-S1324A-for (BamHI) RhoGEF17-ΔN-S1324A-rev (BamHI) |
| RhoGEF17-ΔN-SS1330/31AA | RhoGEF17-ΔN* | RhoGEF17-ΔN-SS1330/31AA-for (NruI) RhoGEF17-ΔN-SS1330/31AA-rev (NruI) |
| RhoGEF17-ΔN-S1331E | RhoGEF17-ΔN-SS1330/31AA | RhoGEF17-ΔN-S1331E-for RhoGEF17-ΔN-S1331E-rev |
| RhoGEF17-ΔN-SS1716/17AA | RhoGEF17-ΔN* | RhoGEF17-ΔN-SS1716/17AA-for (NcoI) RhoGEF17-ΔN-SS1716/17AA-rev (NcoI) |
| RhoGEF17-ΔN-S1765 | RhoGEF17-ΔN* | RhoGEF17-ΔN-S1765-for (HindIII) RhoGEF17-ΔN-S1765-rev (HindIII) |
| RhoA-S188A | RhoA-wt | RhoA-S188A-for (BsrFI) RhoA-S188A-rev (BsrFI) |
| RhoA-S188E | RhoA-S188A | RhoA-S188E-for RhoA-S188E-rev |

* wurde von Rumenapp und Mitarbeitern kloniert (Rumenapp *et al.*, 2002)

Tab. 3: Mutagenese.

4.1.8 siRNA-Sequenzen und DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA

Die siRNA-Sequenzen wurde von Invitrogen bezogen und in 1 mL DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen, um eine 20 μM Lösung zu erhalten.

Für die Herstellung der Haarnadelschleifen-shRNAs mussten die siRNA Sequenzen, die bei transienten Transfektions-Experimenten getestet wurden, modifiziert werden. Ein spezielles Software-Programm (www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html) konvertierte die vorhandene Sequenzen in DNA-Oligonukleotid-Matrizen, die eine BamHI-Enzym-Schnittstelle, einen sense-Strang, eine Schleifen-Sequenz, einen antisense-Strang, einen RNA pol III Terminator und eine Hind III-Schnittstelle beinhalteten (Abb. 5). Die DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA wurden bei der Firma Sigma-Ark bestellt und in einer adäquaten Menge dest. H₂O aufgenommen um eine 200 μM Lösung zu erhalten.

siRNA-Sequenzen:

sense-siRNA-RhoGEF17-Ratte-4041

cagugucauugauacagccagcaaa

antisense-siRNA-RhoGEF17-Ratte-4041

uuugcuggcuguaucacacacug

DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA:

sense-Haarnadelschleifen-shRNA-Insert-RhoGEF17-Ratte-4041

gatccccagtgctcattgatacagccagcaaatcaagagatttgctggctgtatcaatgacactgttttggaaa

antisense-Haarnadelschleifen-shRNA-Insert-RhoGEF17-Ratte-4041

agcttttcaaaaacagtgctcattgatacagccagcaaatcttgaatttgctggctgtatcaatgacactggg

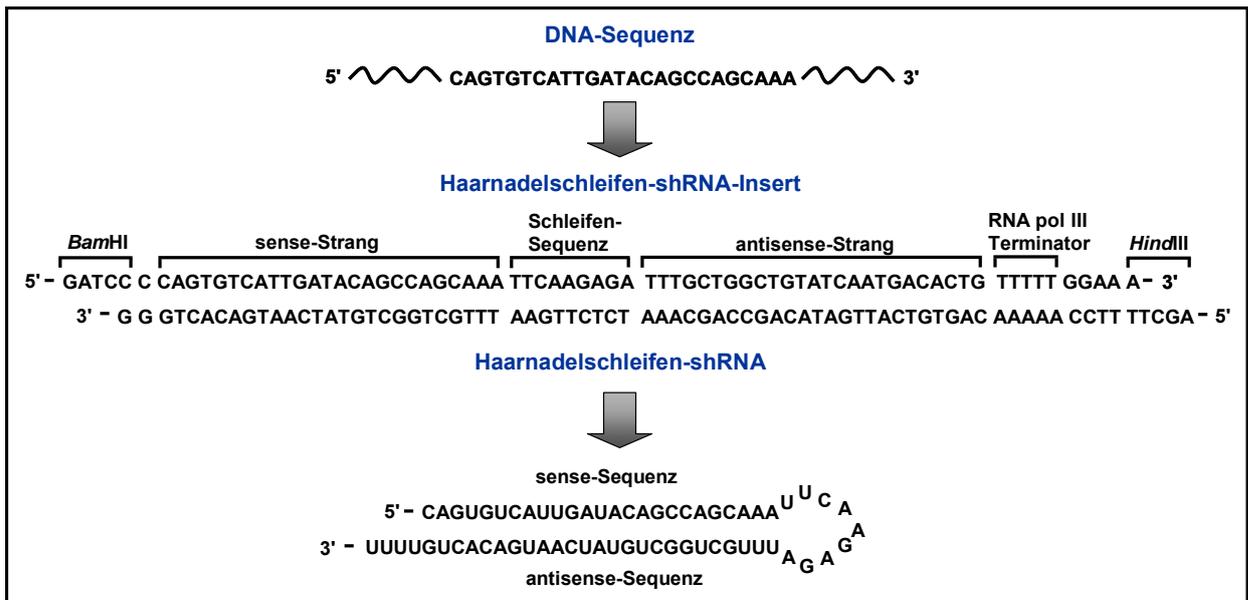


Abb. 5: DNA-Oligonukleotid-Matrixe für Haarnadelschleifen-shRNA.

4.1.9 Plasmide

pCMV-Tag3/2 A, B, C

Stratagene

pcDNA 3.1

Invitrogen

pDrive Cloning Vector

Qiagen

pGEX-2T

Amersham

pSRE.L

Dian Wu, Rochester, USA

pRL-TK

Promega

pAdEasy-1

Bert Vogelstein, Baltimore, USA

pAdTrack-CMV

Bert Vogelstein, Baltimore, USA

pAdTrack-CMV-shRNA

Susanne Lutz, Mannheim

4.1.10 Klonierungen

4.1.10.1 Tabellarische Übersicht der Klonierungen

| | Name des Klons | Vektor | Klonierung |
|----------|----------------------------|--------------|--|
| A | RhoGEF17 | pCMV-Tag 3C | 2007 bp großes PCR-Amplifikat mit den entsprechenden in 4.1.7 aufgeführten Primern RhoGEF17-19-for (EcoRI) und RhoGEF17-2007-rev (KpnI) (19 - 2007 bp) in EcoRI (737 bp in MCS vorne/4917 bp in RhoGEF17 -554*) und KpnI (328 bp) geschnittenen RhoGEF17 -554* (Abb. 5 A) |
| B | RhoGEF17- Δ DH | pCMV-Tag 3C | RhoGEF17 -554- Δ DH* XhoI (1344 in RhoGEF17 -554- Δ DH*/771 bp in MCS hinten) geschnitten → 3606 bp großes Fragment in XhoI (3022 in RhoGEF17/771 bp in MCS hinten von pCMV-Tag 3C) geschnittenen RhoGEF17 (Abb. 5 B) |
| C | RhoGEF17-SS1330/31AA | pCMV-Tag 3C | RhoGEF17- Δ N*SS1330/31AA AgeI (3929 bp)/Bsp119I (3038 in pCMV-Tag 3B) geschnitten → 4951 bp großes Fragment in AgeI (3929 bp)/Bsp119I (3038 bp in pCMV-Tag 3C) geschnittenen RhoGEF17 (Abb. 5 C) |
| D | RhoGEF17-S1331E | pCMV-Tag 3C | RhoGEF17- Δ N*S1331E AgeI (3929 bp)/Bsp119I (3038 in pCMV-Tag 3B) geschnitten → 4951 bp großes Fragment in AgeI (3929 bp)/Bsp119I (3038 bp in pCMV-Tag 3C) geschnittenen RhoGEF17 (Abb. 5 D) |
| E | RhoGEF17 -55 | pCMV-Tag 3A | RhoGEF17 SmaI (166 bp)/HindIII (750 bp in MCS hinten) geschnitten → 6422 bp großes Fragment in SmaI/ HindII (712/740 bp in MCS) geschnittenen pCMV-Tag 3A (Abb. 5 E) |
| F | RhoGEF17 -109 | pCMV-Tag 3B | RhoGEF17 NotI (341bp blunt)/HindIII (750 bp in MCS hinten) geschnitten → 6247 bp großes Fragment in SmaI/HindIII (712/740 bp in MCS) geschnittenen pCMV-Tag 3B (Abb. 5 F) |
| G | pAdTrack-RhoGEF17 | pAdTrack-CMV | RhoGEF17 NotI (667 bp in pCMV-Tag 3C)/HindIII (750 bp in MCS hinten) geschnitten → 6658 bp großes Fragment in NotI/HindIII (2376/2368 bp in MCS) geschnittenen pAd-Track-CMV (Abb. 5 G) |
| H | RhoGEF17- Δ N-Ratte | pCMV-Tag 3C | I. 2590 bp großes PCR-Amplifikat mit den entsprechenden in 4.1.7 aufgeführten Primern RhoGEF17-Ratte-3636-for und RhoGEF17-Ratte-6200-rev (3636 - 6220 bp) in EcoRV (713 bp in MCS) linearisierten pCMV-Script II. pCMV-Script-RhoGEF17- Δ N-Ratte BclI (3645 bp)/XhoI (739 bp in MCS hinten) geschnitten → 2601 bp großes Fragment in BamHI/ XhoI (719/770 bp in MCS) geschnittenen pCMV-Tag 3C (Abb. 5 H) |
| I | RhoGEF10 | pCMV-Tag 3B | KIAA0294 Eco47III (515 bp)/HpaI (4713 bp) geschnitten → 4198 bp großes Fragment in EcoRV (744 bp in MCS) linearisierten pCMV-Tag 3B (Abb. 5 I) |

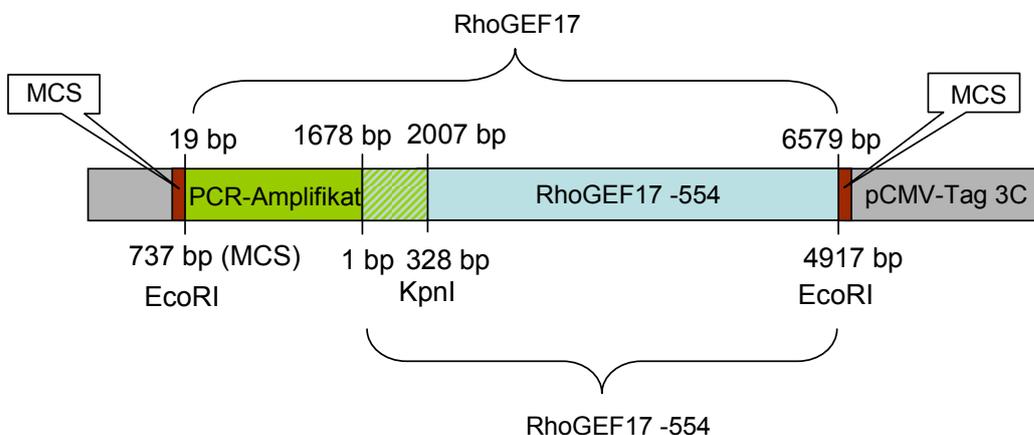
| | | | |
|----------|----------------------|-------------|---|
| J | RhoGEF10-kurz | pCMV-Tag 3B | I. 3364 bp großes PCR-Amplifikat mit den entsprechenden in 4.1.7. aufgeführten Primern RhoGEF10-735-for und RhoGEF10-4215-rev in pDrive (Δ 1028 - 1144 bp) II. pDrive RhoGEF10-kurz SapI (956/4166 bp) geschnitten → 3210 bp großes Fragment in SapI (956/4166 bp) linearisierten RhoGEF10 (Abb. 5 J) |
| K | RhoGEF10- Δ C | pCMV-Tag 3B | RhoGEF10 EcoRI (736 bp in MCS vorne/2538 bp) geschnitten → 2032 bp großes Fragment in EcoRI (736 bp in MCS) linearisierten pCMV-Tag 3B (Abb. 5 K) |
| L | RhoGEF10- Δ N | pCMV-Tag 3B | RhoGEF10 Sall (1397 bp/764 bp in MCS hinten) geschnitten → 3335 bp großes Fragment in Sall (764 bp in MCS) linearisierten pCMV-Tag 3B (Abb. 5 L) |
| M | RhoGEF10-DH | pCMV-Tag 3B | RhoGEF10 BglII (1265 bp)/EcoRI (2538 bp) geschnitten → 1273 bp großes Fragment in BamHI/EcoRI (719 in MCS/737 bp in MCS) geschnittenen pCMV-Tag 3B (Abb. 5 M) |
| N | RhoGEF10-DH | pGEX-2T | RhoGEF10 BglII (1265 bp)/EcoRI (2538 bp) geschnitten → 1273 bp großes Fragment in BamHI/EcoRI (930 bp in MCS/940 bp in MCS) geschnittenen pGEX-2T (Abb. 5 N) |

* wurde von Rümenapp und Mitarbeitern kloniert (RhoGEF17 -554 entspricht p164-FL; RhoGEF17 -554- Δ DH entspricht p164- Δ DH) (Rumenapp *et al.*, 2002)

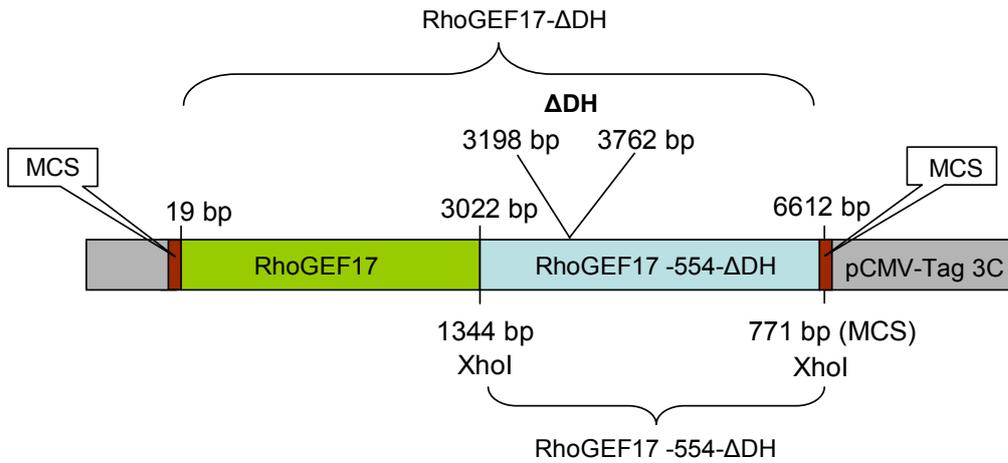
Tab. 4: Klonierungen.

4.1.10.2 Schematische Darstellung der Klonierungen

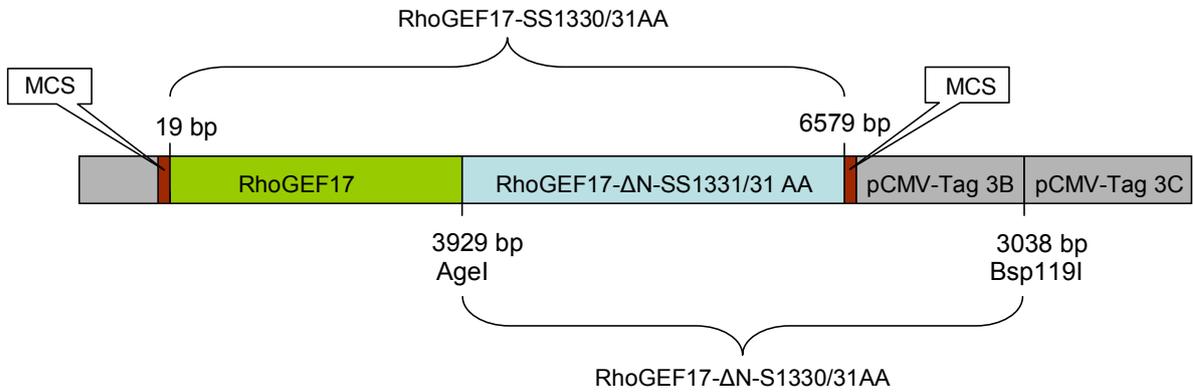
A. RhoGEF17



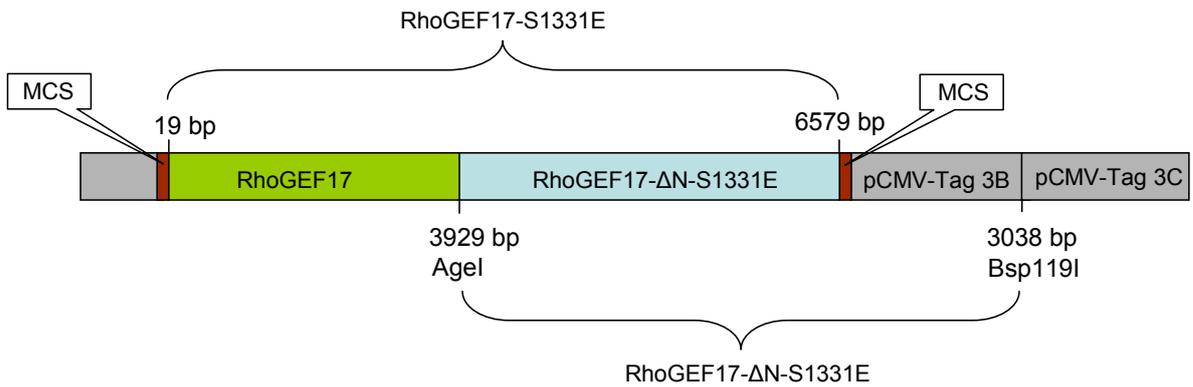
B. RhoGEF17-ΔDH



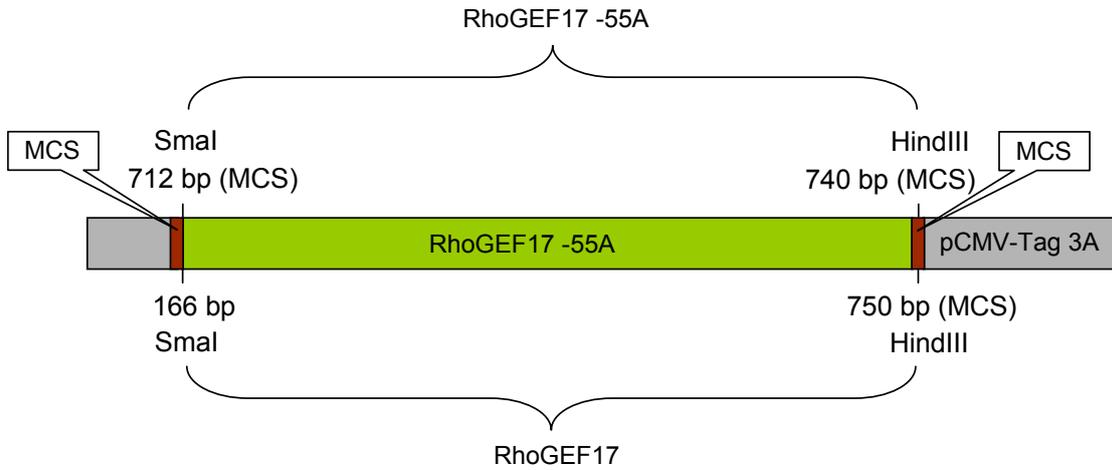
C. RhoGEF17-SS1330/31AA



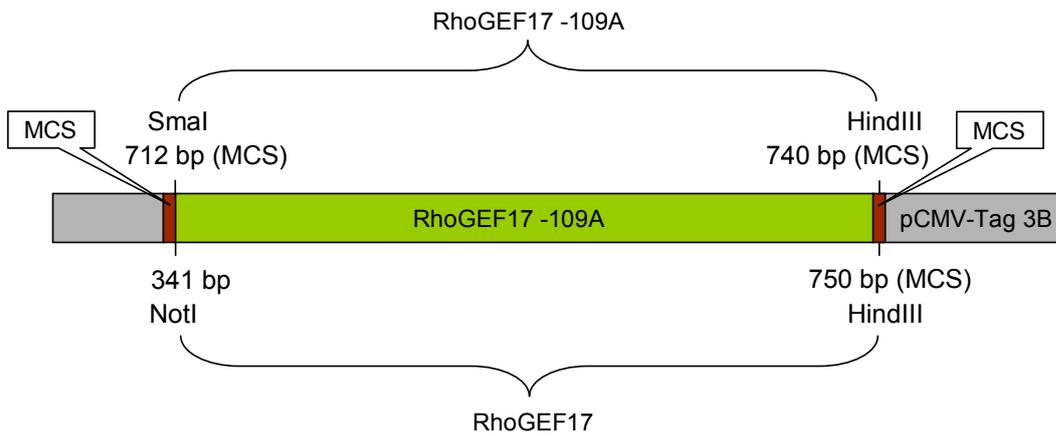
D. RhoGEF17-S1331E



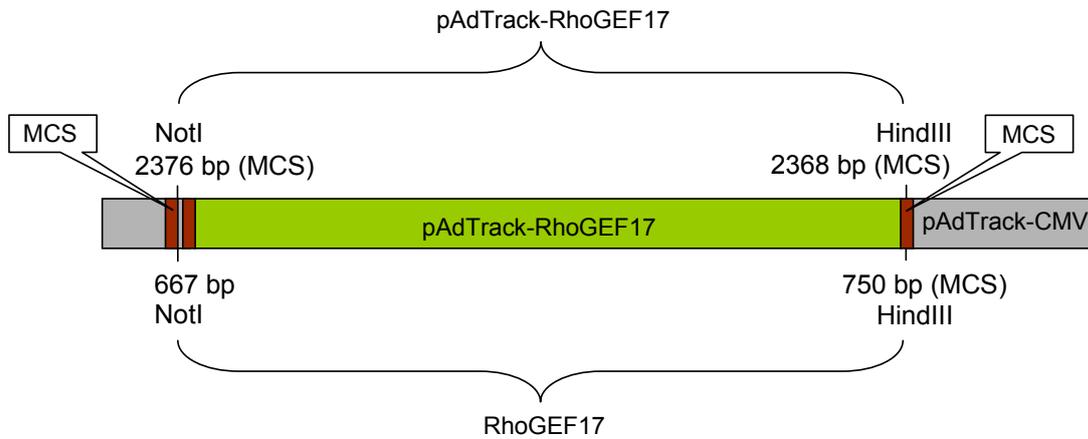
E. RhoGEF17 -55



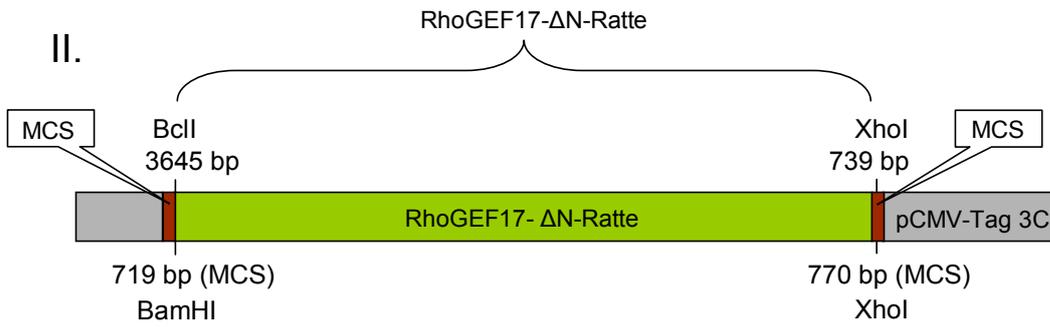
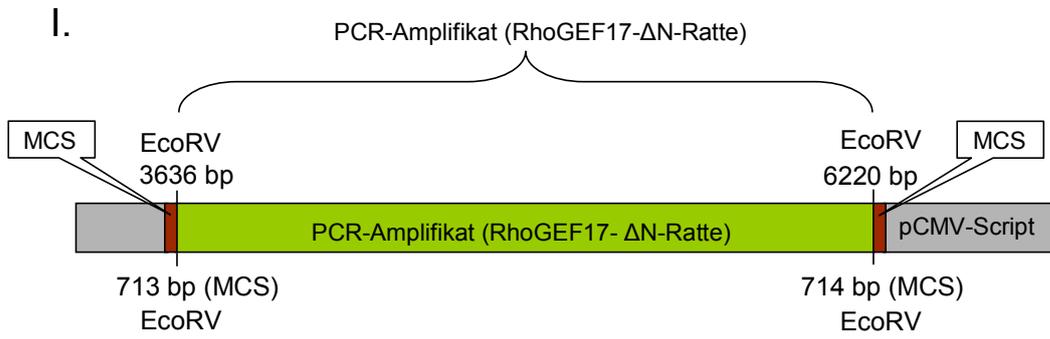
F. RhoGEF17 -109



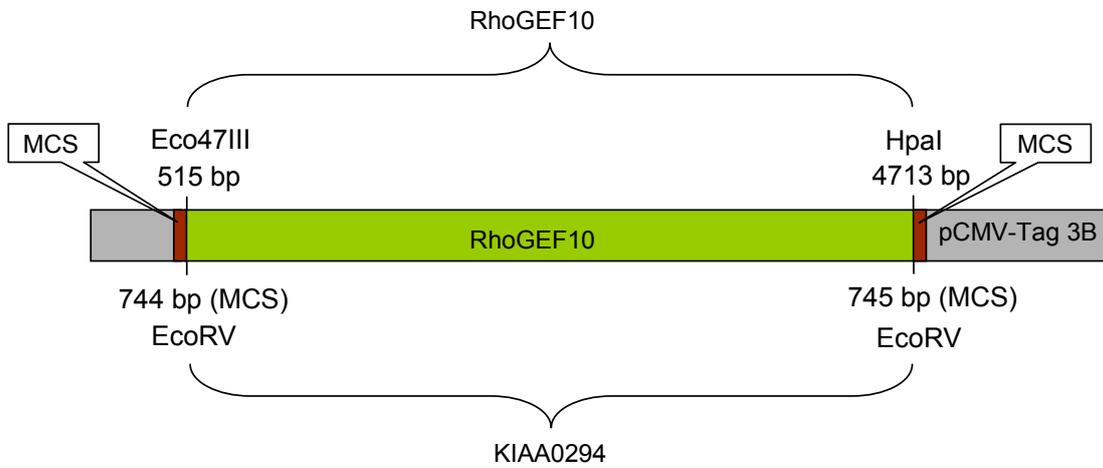
G. pAdTrack-RhoGEF17



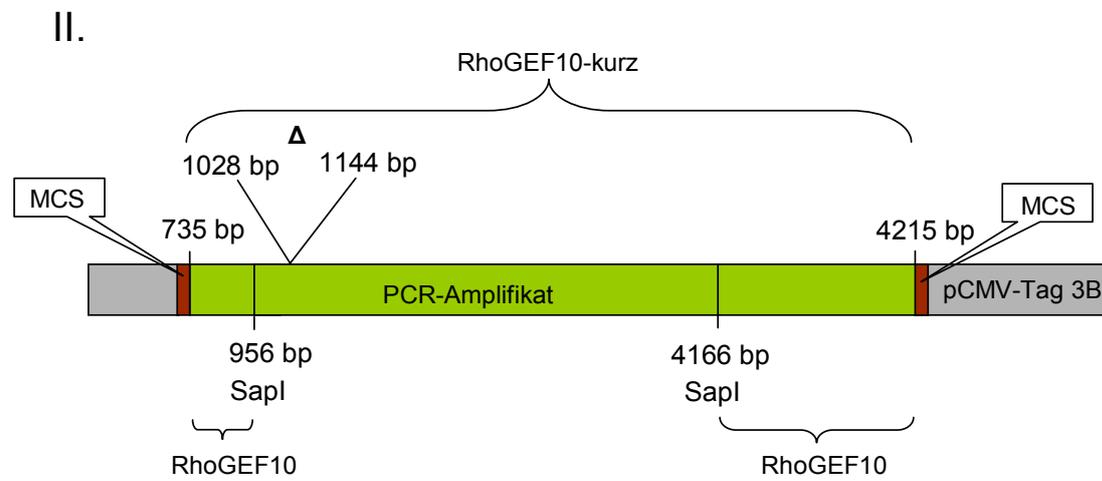
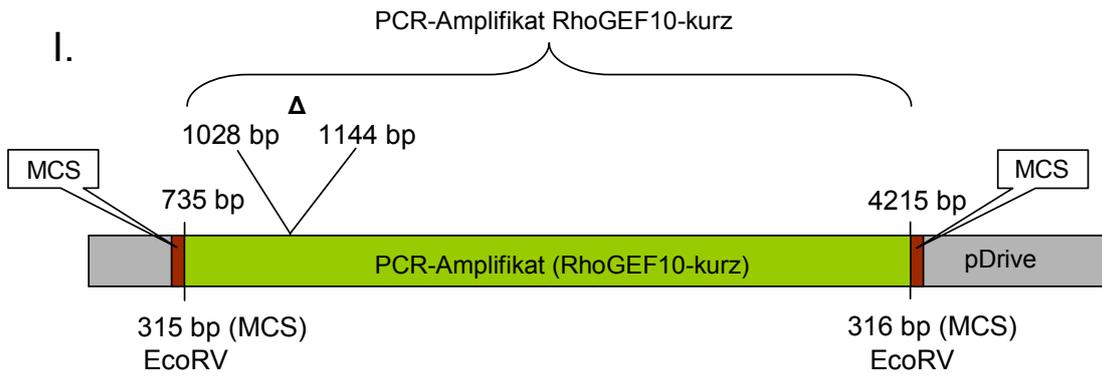
H. RhoGEF17-ΔN-Ratte



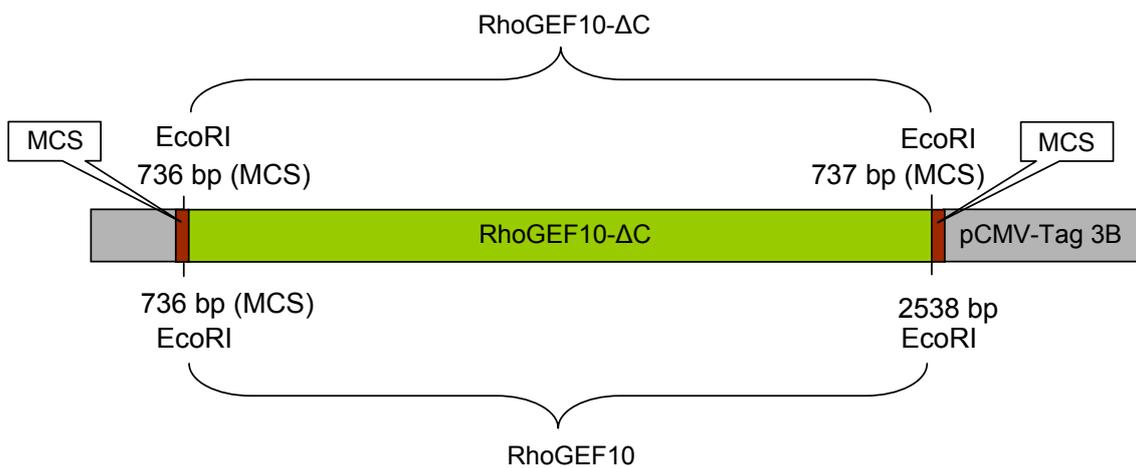
I. RhoGEF10



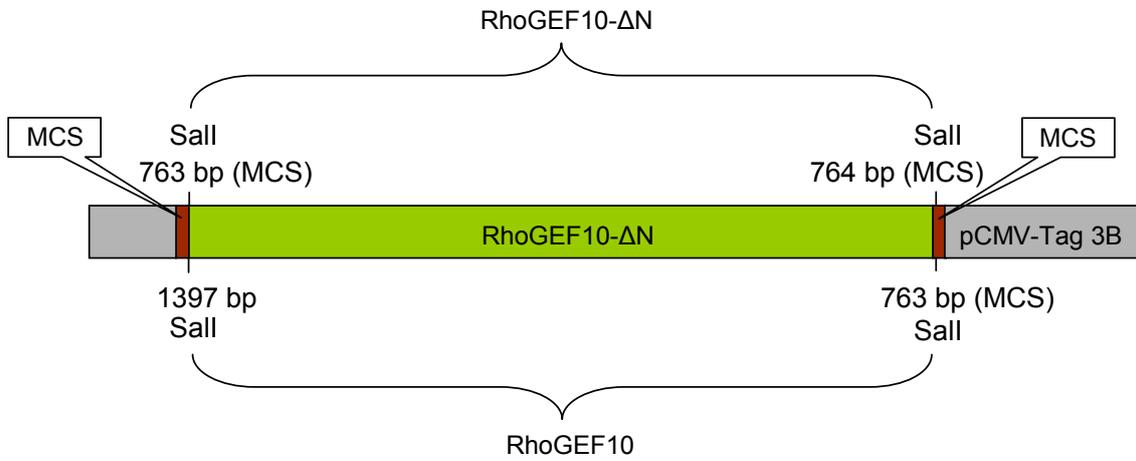
J. RhoGEF10-kurz



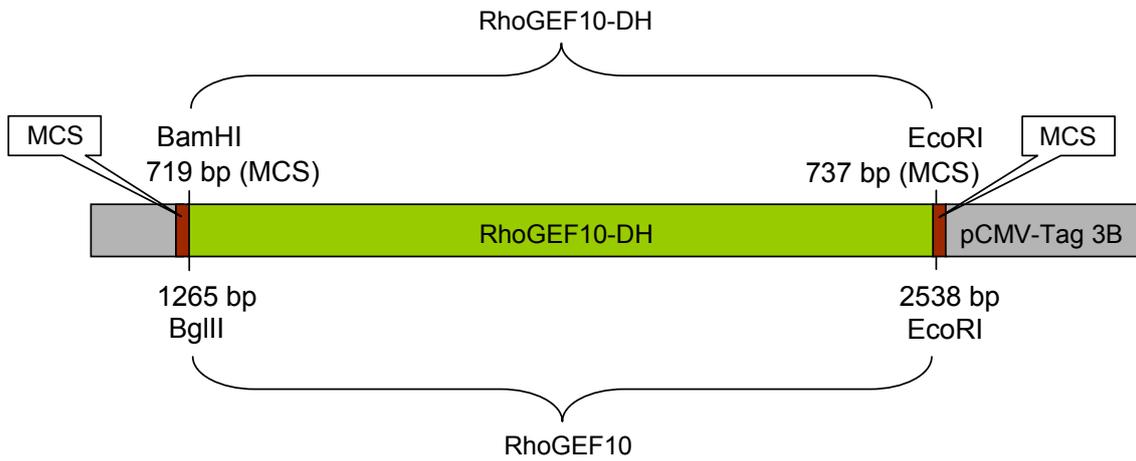
K. RhoGEF10-ΔC



L. RhoGEF10-ΔN



M. RhoGEF10-DH



N. RhoGEF10-DH

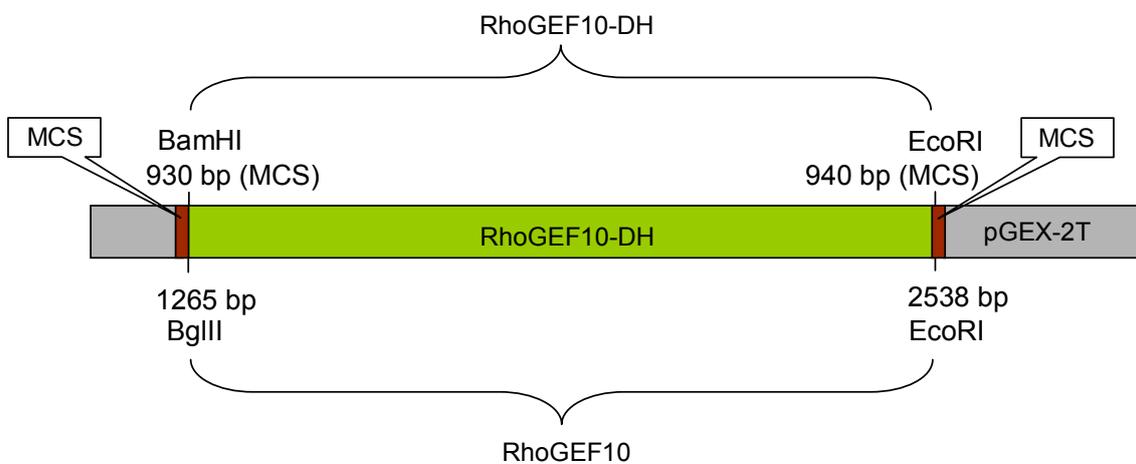


Abb. 6: Schematische Darstellung der Klonierungen.

4.1.11 Bakterien

E. coli BL21 (DE3) pLysS {F⁻ *ompT hsdS_B* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm met* (DE3) pLysS (Cam^R)}
Novagen

E. coli BJ5183 {*endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT bsdR* (Str^r)}
Stratagene

E. coli dam⁻/dcm⁻ {*ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 gal K2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^s endA1 rspL136* (Str^r) *dam13:: Tn9* (Cam^R) *xyIA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*}
New England BioLabs

E. coli XL10 Gold {Tet^r *D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZDM15 Tn10* (Tet^r) Tn5 (Kan^r) Amy]}
Stratagene

E. coli RosettaTM {F⁻ *ompT hsdS_B* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm pRARE²* (CamR)}
Novagen

4.1.12 Zellkultur

| | |
|--------------------------------|---------------|
| DMEM | Sigma-Aldrich |
| Endothelzellen-Wachstumsmedium | PromoCell |
| Fötale Kälberserum | Biozol |
| Gelatine | Sigma-Aldrich |
| Kollagen I | Upstate |
| Kolagenase Type II-S | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich |
| PBS | Sigma-Aldrich |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma-Aldrich |
| Trypsin-EDTA | Sigma-Aldrich |

4.1.13 Transfektionsreagenzien

| | |
|-------------------|------------|
| PolyFect | Qiagen |
| Lipofectamine2000 | Invitrogen |

4.1.14 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--------------------|---------------------------|
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Zellkulturmaterial | Sarstedt, Nalge Nunc Int. |

4.1.15 Sonstige Materialien

| | |
|-------------------------------|--|
| anti-c-myc-Agarose konjugiert | Sigma-Aldrich |
| Cyanogenbromid-Agarose | Sigma-Aldrich |
| DNA-Größenmarker | 1 kb DNA-Leiter, Peqlab |
| Glutathion-Sepharose Beads | Glutathion-Sepharose 4 Fast-Flow, GE Healthcare |
| Nitrozellulose-Membran | Protran, Schleicher&Schuell |
| Photofilm | Hyperfilm MP, GE Healthcare |
| Protein-Marker | Roti-Mark Standard, Roth |
| Protein A-Sepharose CL-4B | GE Healthcare |
| Streifen für IEF | Immobiline Dry Strip, linear, pH 3-10, 7cm, GE Healthcare |

4.1.16 Geräte

| | |
|------------------------------------|---|
| Bakterienbrutschrank | Memmert |
| Elektroporator | GenePulser, Biorad |
| Ettan IPGphor IEF System | GE Healthcare |
| Feinwaage | Sartorius |
| Gelelektrophoresekammer/Blot Modul | Protean II/ Biorad |
| Gel-Imager | Multi Image Light Cabinet, AlphaImager™ 2200, Alpha-Innotech |
| Heizblock | Thermomixer comfort, Eppendorf |
| Homogenisator | Braun-Sonic 300, Quigley-Rochester, Inc Polytron PT1200E, Kinematica |
| Mikroskop | Axiovert 25, Zeiss DMRBE, Leica |
| Mikroskop-Kamera | DC500, Leica |
| Mikroskop-Software | IM50, Leica |
| Multilabel Reader | EnVision, Perkin Elmer |
| PCR-Gerät | Techne |
| pH-Meter | Microprocessor pH-Meter, WTW |
| Photometer | Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech Titertek Multiskan MCC/340 |

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| Rotor für Ultrazentrifuge | SW 27, Beckmann |
| Schüttler | Neolab |
| | REAX2, Heidolph |
| Sterile Werkbank | HeraSafe, Heraeus |
| Ultrazentrifuge | L5,65, Beckmann |
| Vakuum-Konzentrator | Speed Vac Concentrator, Backofer |
| Waage | PC440, Mettler |
| Zellkulturbrutschrank | HeraCell, Heraeus |
| Zentrifugen | Biofuge fresco, Heraeus |
| | Centrifuge 54125C, Eppendorf |
| | Hettich Rotixa/K |
| | J2-21, Beckmann |

4.2 Puffer und Nährmedien

4.2.1 Puffer für molekularbiologische Methoden

DNA-Gelelektrophorese:

| | |
|-----------------|------------------------|
| 50x TAE-Puffer: | 2 M Tris-HCl, pH 8 |
| | 5,7 % Essigsäure (v/v) |
| | 0,05 M EDTA |

Klonieren von Haarnadelschleifen-shRNA-Insert in einen Expressionsvektor:

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| 10x Annealing-Puffer: | 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 10 mM EDTA |
| | 1 M NaCl |

4.2.2 Puffer für proteinbiochemische Methoden

Probenvorbereitung für die SDS-PAGE:

| | |
|------------|----------------------|
| TE-Puffer: | 10 mM Tris-HCl, pH 8 |
| | 1 mM EDTA |

SDS-PAGE:

| | |
|---|---|
| Elektrophorese-Puffer: | 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 1,25 M Glycin 0,5 % SDS (w/v) |
| Western Blot-Puffer: | 25 mM Tris-HCl 190 mM Glycin 20 % Methanol (v/v) |
| 10x TBS-Puffer: | 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 1,5 M NaCl |
| TBST-Puffer: | 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,15 M NaCl 0,1 % Tween-20 (v/v) |
| Ponceau-S-Färbelösung: | 0,2 % Ponceau-S (w/v) 3 % Essigsäure (v/v) |
| 4x SDS-PAGE Probenpuffer: (Laemmli-Puffer) | 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 8 % SDS (w/v) 0,4 % Bromphenolblau (w/v) 40 % Glycerin (v/v) 10 % β -Mercaptoethanol (v/v) |
| Coomassie-Färbelösung: | 0,14 % Coomassie-Brilliant-Blue R250 (w/v) 50 % Methanol 20 % Essigsäure |
| Coomassie-Entfärbelösung: | 10 % Methanol 10 % Essigsäure |
| Strip-Puffer: | 2 % SDS (w/v) 0,1 M β -Mercaptoethanol 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 |

GDP/GTP-Austausch-Assay:

| | |
|----------------------------------|---|
| 10x Beladungspuffer-Stammlösung: | 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 M NaCl 20 mM EDTA |
| 1x Beladungspuffer: | 100 µL 10x Beladungspuffer-Stammlösung 1 µL 100 mM AMP-PNP 10 µL 10 mM DTT 3 µL [8,5'- ³ H]-GDP (kurz vor Versuchsbeginn) → ad 1000 µL dest. H ₂ O |
| 10x Versuchspuffer-Stammlösung: | 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 800 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 0,4 % BSA |
| 1x Versuchspuffer: | 100 µL 10x Versuchspuffer-Stammlösung 10 µL 10 mM DTT 10 µL 100 mM GTP 10 µL 100mM AMP-PNP → ad 1000 µL dest. H ₂ O |
| 10x Waschpuffer-Stammlösung: | 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 80 mM NaCl 100 mM MgCl ₂ |
| 1x Waschpuffer: | 10 mL 10x Waschpuffer-Stammlösung 90 mM H ₂ O 50 µL β-Mercaptoethanol |

Adenovirus-Aufreinigung:

| | |
|----------------------|--|
| Cäsiumchlorid-light: | 11,02 g CsCl ad 50 mL 1x VSB-Puffer {1 mL \approx 1,2 g; 22,4 % (w/w)} |
| Cäsiumchlorid-heavy: | 21,1 g CsCl ad 1x VSB-Puffer {1 mL \approx 1,45g; 42,2 % (w/w)} |
| 10x VSB-Puffer: | 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 1,37 M NaCl 50 mM KCl 10 mM MgCl ₂ |

Ko- bzw. Immunopräzipitation (IP):

| | |
|--------------|---|
| IP-Puffer: | 0,1 % Triton X-100 1 % PMSF-Lösung 2 mM NaF 2mM Na ₃ VO ₄ → 1 x TBS |
| PMSF-Lösung: | 100 mM PMSF (in Isopropanol) |

Isoelektrische Fokussierung:

| | |
|-------------|---|
| Lysepuffer: | 8 M Urea 1 M Thiourea 2 % Chaps 1 % Triton X-100 80 mM DTT 20 mM Tris-HCl 2 % Ampholyte (nicht-linear; pH 3-10) 0,5 x Complete (mini) 1 Tablette 0,004 % Bromphenolblau |
|-------------|---|

2-D-Äquilibriumspuffer:**Stammlösung:**

6 M Urea
34,5 % Glycerin (v/v)
70 mM SDS
1 M Tris-HCl, pH 8,8

2-D-Äquilibriumspuffer I:

20 mg/mL DTT (in 2-D-
Äquilibriumspuffer-Stammlösung)

2-D-Äquilibriumspuffer II:

20 mg/mL Iodacetamid (in 2-D-
Äquilibriumspuffer-Stammlösung)

Pulldown-Assay:**GST-Fish-Puffer:**

50 mM Tris-HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
2 mM MgCl₂
10 % Glycerol (v/v)
1 % Igepal CA630 (v/v)

ROCK-Assay:**Lysepuffer:**

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,1 % Triton X-100
1 mM EDTA
0,2 mM PMSF
2 mM NaF
2 mM Na₃VO₄
10 mM β-Mercaptoethanol
0,5 x Complete (mini) 1 Tablette

Immunhistologie:**Citratpuffer**

0,1 M Citrat
0,1 M Tri-Natriumcitrat
→ pH 6,0

4.2.3 Medien für die Zellkultur und Bakterienzucht

| | |
|---------------|---|
| SOC-Medium: | 2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose → mit 0,45 µm Filter steril filtrieren |
| 2x YT-Medium: | 16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl → ad 1 L mit dest. H ₂ O; autoklavieren |
| LB-Medium: | 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl → ad 1 L mit dest. H ₂ O; autoklavieren |
| LB-Platten: | 2,8 g Agar-Agar 200 mL autoklaviertes LB-Medium → Zusätze entweder 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin |
| PBS-Puffer: | 148 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM NaHPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ → pH 7,4; autoklavieren |

| | |
|--|--|
| Zellkulturwachstumsmedien: | DMEM + Zusätze: 0,5 bzw. 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 0,1 mg/mL Streptomycin Endothelzellen-Wachstumsmedium + Zusätze: 0,4 % ECGS/ H 2 % FCS 0,1 ng/mL EGF 1 µg/mL Hydrocortison 1 ng/mL bFGF |
| Einfriermedium für eukaryotische Zellen: | DMEM mit 10 % DMSO und 10 % FCS |
| Einfriermedium für prokaryotische Zellen (<i>E. coli</i>): | 50 % Glycerin in dest. H ₂ O |

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

Einzelne Bakterienkolonien wurden in 5 mL bzw. 150 mL LB-Medium (50 µg/mL Kanamycin oder 100 mg/mL Ampicillin) ü. N. mit 250 rpm bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmidpräparationen erfolgten mit dem „Plasmid Mini Kit“ bzw. dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Sigma-Aldrich. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix. Zur Verifizierung der aufgereinigten Plasmide wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

4.3.2 DNA-Fällung

Zur Aufreinigung und Fällung von DNA wurden 0,1 Volumenanteile Natriumacetat (3 M, pH 5) und 0,7 Volumenanteile Isopropanol zugegeben. Dadurch wurde die Hydrathülle der DNA von den Kationen verdrängt und die Ionenbindung zwischen den Kationen und den Phosphatgruppen der DNA ermöglicht. Die dadurch als Salz ausgefällte DNA wurde mittels Zentrifugation pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in einer geeigneten Menge TE-Puffer aufgenommen. Die Fällung erfolgte bei niedrigen Temperaturen, da die Löslichkeit der DNA hier geringer ist.

4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen (nach Clark und Swika, 1977) wurde in einem Spektralphotometer eine geeignete Menge der Nukleinsäurelösung mit dest. H₂O verdünnt und in einer Quartzküvette gemessen. Für die Konzentrationsberechnung von Nukleinsäurelösungen gelten folgende Zusammenhänge (Cryer *et al.*, 1975):

Doppelsträngige (ds) DNA: 1 OD_{260nm} entspricht E 50 µg/mL

Einzelsträngige (ss) RNA: 1 OD_{260nm} entspricht E 37 µg/mL

Einzelsträngige (ss) DNA: 1 OD_{260nm} entspricht E 20 µg/mL

Durch Bestimmen der Extinktion bei 230, 260 und 280 nm können Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen bestimmt werden. Für eine ausreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren gelten folgende Richtwerte (Marmur & Doty, 1961):

$$E_{260}/E_{280} \approx 1,8$$

$$E_{260}/E_{230} \approx 2,2$$

4.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse von Nukleinsäurepräparationen wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Nukleinsäuren wurden in einem elektrischen Feld in einer Agarosematrix (üblicherweise 1 %iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt (Mcdonnell *et al.*, 1977). Die Agarose wurde unter Erwärmung in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf 50°C mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können, wurde in die Proben Bromphenolblau (6x DNA Ladepuffer, peqLab) gegeben und als Größenmarker wurde die „1 kb DNA-Leiter“ der Firma Peqlab verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer mit einer elektrischen Spannung von 120 V durchgeführt. Unter UV Durchstrahlung (302 nm) können DNA-Stränge durch Einlagerung von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Zur Isolierung eines DNA-Fragmentes wurde dieses unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) aufgereinigt.

4.3.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC durchgeführt.

4.3.6 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Spezifische palindromische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen werden von Restriktionsendonuklasen vom Typ II erkannt. Sie hydrolisieren die DNA innerhalb der Erkennungssequenzen (Arber, 1978). Dabei entstehen entweder 5'- bzw. 3'- überstehende („sticky-ends“) oder glatte („blunt-ends“) Enden. Zu analytischen Zwecken wurden 1 bis 3 µg DNA (20 µL Ansatz) und zu präparativen Zwecken 15 bis 20 µg DNA (100 µL Ansatz) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. 1 bis 10 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA wurden für 1 bis 3 h in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer bei geeigneter Reaktionstemperatur inkubiert. Mittels einer horizontalen Agarosegelelektrophorese wurde der Restriktionsverdau überprüft.

4.3.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

DNA-Enden wurden durch direkte Zugabe von alkalischer Phosphatase in den Restriktionsansatz (CIAP) (0,05 U/pmol DNA-Enden) dephosphoryliert. Bei glatten Enden oder 3'-überhängenden Enden wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C und für 30 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde erneut CIAP zugegeben und die Inkubationsschritte wiederholt. Bei 5'-überhängenden Enden wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die CIAP wurde durch Erhitzen auf 85°C für 15 min inaktiviert.

4.3.8 Enzymatische Verlängerung von DNA-Enden

Das Auffüllen von 3'-überhängenden Enden erfolgte mit dem großen Fragment der Polymerase I (Klenow, Fermentas). Der Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben hergestellt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min auf 70°C erhitzt.

4.3.9 Verknüpfung von DNA-Molekülen mit der T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von doppelsträngigen DNA-Molekülen (Weiss *et al.*, 1968). Die Ligationsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers mit dem mitgelieferten Puffersystem durchgeführt. Für den Ligationsansatz wurden 0,3 pmol Insert-DNA und 0,1 pmol Vektor-DNA verwendet und ü. N. bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Insert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ligationsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt und einer Chloroformextraktion unterzogen. Nach Zugabe von 50 µL Chloroform wurde der Ligationsansatz gemischt, für 3 min bei 16'000 g zentrifugiert und auf ein Urglas gegeben. Die wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen.

Für die Verknüpfung von PCR-Fragmenten, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden und an jedem Ende einzelne Adenosinüberhänge aufwiesen, wurde der „Qiagen PCR Cloning Kit“

verwendet. Der im Kit in linearer Form vorhandene „pDrive Cloning Vektor“ weist an den Enden einzelne Uracilüberhänge auf, wodurch eine Ligation der PCR-Fragmente in diesen Vektor möglich wird. Zusätzlich zur Antibiotika-Selektion ist bei diesem Vektor eine Blau/Weiß-Selektion möglich. Die „multiple cloning site“ (MCS) des Vektors verläuft durch den für β -Galaktosidase kodierenden Bereich im Vektor. Bei zusätzlicher Behandlung von LB-Platten mit 50 μ M Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) und 80 μ g/mL 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-gal) führte dies bei Bakterienkolonien, die das Plasmid ohne Insert aufgenommen haben, zu einer β -Galaktosidase-Expression und damit zu einer Blaufärbung. Hingegen blieben Bakterienkolonien, die das Plasmid mit Insert aufgenommen haben weiß. PCR-Fragmente, die mit einer Pfu-Polymerase amplifiziert wurden, wurden mittels des „pCMV-Script PCR Cloning Kit“ (Stratagene) gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Vektor verknüpft. Da die Pfu-Polymerase im Gegensatz zur Taq-Polymerase nicht über eine terminale Transferase-Aktivität verfügt, besitzen die amplifizierten PCR-Produkte glatte Enden, welche in den „blund end“ SrfI linearisierten pCMV-Script-Vektor ligiert werden können.

4.3.10 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wurden zunächst kompetente Bakterienzellen nach Hanahan (Hanahan, 1983) hergestellt. Bei der Elektrotransformation wurden 2 - 4 μ L des gereinigten Ligationsansatzes oder 100 ng Plasmid-DNA und 50 μ L elektrokompente Bakterien in eine kalte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die DNA wurde mit Hilfe eines „Gene Pulsers“ (25 μ F, 200 Ω , 2,5 kV) in die Bakterien gebracht. Anschließend wurde zu den Bakterien 200 μ L 37°C warmes SOC-Medium gegeben und für 20 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen (Kanamycin oder Ampicilin) und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Für die chemische Transformation wurden die Bakterien zusammen mit 5 μ L des Ligationsansatzes bzw. 100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 sec auf 42°C erwärmt. Danach wurden die Bakterien für 5 min auf Eis gekühlt, anschließend 250 μ L SOC-Medium zugegeben und für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Unter Verwendung von Antibiotika wurden die Bakterien auf Agarplatten selektiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

4.3.11 Kryokonservierung von Bakterien

Bakterien aus einer Übernachtskultur wurden 1:1 mit 50 % Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

4.3.12 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit dem „RNeasy Mini Elute cleanup Kit“ der Firma Qiagen. Zu den Zellen wurde ein Lysepuffer zugegeben, der Guanidiniumthiocyanat und Ethanol enthielt. Diese Reagenzien fördern die selektive Bindung von RNA an eine Silikamatrix. Die RNA wurde durch RNase-freies, hochreines H₂O von der Matrix eluiert. Da alle RNA-Moleküle, die größer als 200 Nukleotide sind, durch diese Isolation aufgereinigt werden, führte dies zu einer Anreicherung von mRNA und rRNA.

4.3.13 Reverse Transkription von RNA

Die Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR“ (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde mit Hilfe des Enzyms AMV („avian myeloblastosis virus“)-Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz (Tab. 5) wurde auf Eis pipettiert und in einem PCR-Gerät für 10 min bei 25°C, für 60 min bei 42°C und für 5 min bei 99°C inkubiert.

| Reagenz | Volumen | Endkonzentration |
|---------------------------|---------|------------------|
| 10 x Reaktionspuffer | 2,0 µL | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 4,0 µL | 5 mM |
| Desoxynukleotid-Mix | 2,0 µL | 1 mM |
| Random-Hexamere | 2,0 µL | 0,2 µg/µL |
| RNase-Inhibitor | 1,0 µL | 50 U |
| Gelatine | 0,4 µL | 0,01 µg/µL |
| AMV-Reverse-Transkriptase | 1,0 µL | ≥ 20 U |
| Gesamt-RNA | x µL | 2 µg |
| H ₂ O | x µL | |
| Gesamt | 20 µL | |

Tab. 5: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

4.3.14 PCR

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte entweder mit der Taq-Polymerase oder mit der PfuTurbo- bzw. der Fidelity-Taq-Polymerase, um längere und fehlerärmere PCR-Produkte zu erhalten. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden gemäß den Angaben des Herstellers pipettiert. Um unspezifische Reaktionen zu minimieren, wurde das PCR-Gerät auf die Denaturierungstemperatur vorgeheizt und anschließend der Reaktionsansatz hineingestellt.

4.3.15 Mutagenese

Der Austausch einzelner Basen erfolgte mit dem „Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) gemäß den Angaben des Herstellers. Das PCR-Programm ist in Tabelle 6 dargestellt.

| Zyklus | Zeit | Temperatur | Anzahl der Zyklen |
|------------------------|----------|------------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 30sec | 95°C | 1 |
| Denaturierung | 30 sec | 95°C | } 16 |
| Anlagerung | 1 min | 55°C | |
| Extension | 2 min/kb | 68°C | |
| Kühlung | ∞ | 4°C | |

Tab. 6: Reaktionsansatz für die gerichtete Mutagenese.

4.3.16 Herstellung rekombinanter Adenoviren

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgte mit dem pAdEasy1-System, welches genomische Abschnitte des Adenovirus Serotyp-5 (Ad5) enthält. Die dadurch generierten Adenoviren sind durch eine Deletion des E1 und E3 Gens, des linearen doppelsträngigen 36 kb großen Ad5-Genoms zwar infektiös, aber replikationsdefizient. In Abbildung 7 ist das Schema der Adenovirus-Generierung dargestellt, dessen Vorgehensweise im Anschluss genauer erläutert wird (He *et al.*, 1998).

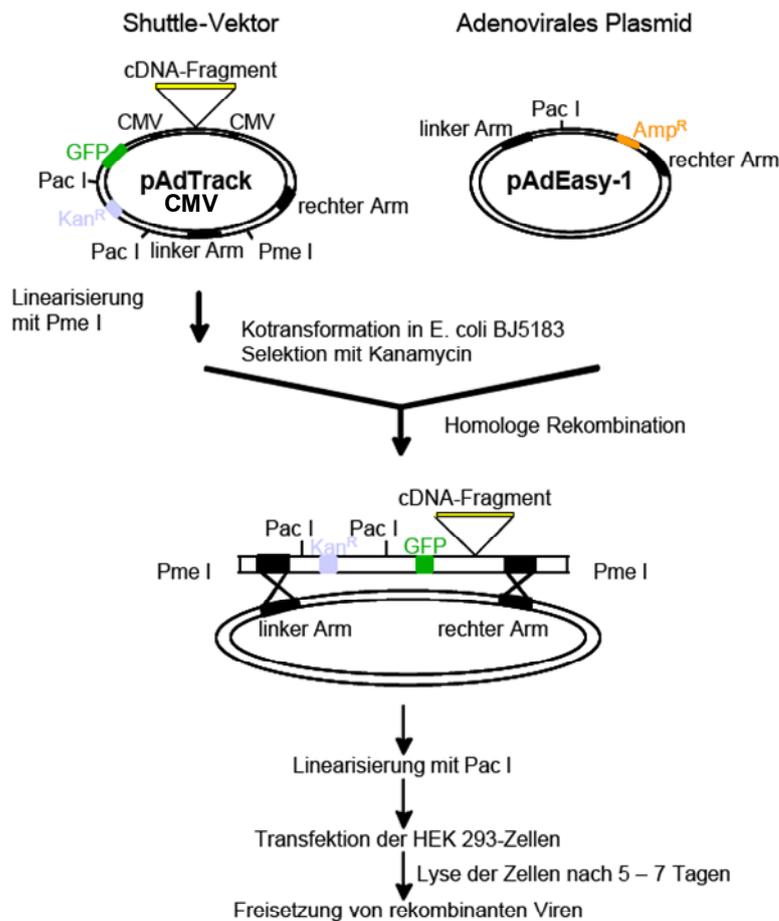


Abb. 7: Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels des pAdEasy1-Systems. Nach Insertion des entsprechenden Fremdgens in den Transfervektor pAdTrack-CMV erfolgt eine homologe Rekombination mit dem Vektor pAdEasy-1 in *E. coli* BJ 5183-Bakterien. Für die anschließende Produktion rekombinanter Adenoviren wurden HEK-Zellen mit dem rekombinierten und Pac1 linearisierten Vektorkonstrukt transfiziert.

Zunächst wurde die spezifische cDNA bzw. das Haarnadelschleifen-shRNA-Insert in den Transfervektor bzw. Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV oder entsprechend in den Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV-shRNA kloniert, der zusätzlich für das grün fluoreszierende Protein EGFP („enhanced green fluorescent protein“) kodiert. Dies erlaubte in den folgenden Schritten die direkte Visualisierung und Abschätzung der Transfektionseffizienz sowie die Verfolgung der Infektion des Adenovirus. Der zweite Schritt beinhaltete eine homologe Rekombination. Hierfür wurde zunächst der pAdTrack-CMV-Vektor, der das spezifische Gen enthält, mit dem Restriktionsenzym PmeI linearisiert und anschließend mittels einer horizontalen Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Zur homologen Rekombination wurden 100 ng des linearisierten Transfervektors mit 1 µg des supercoiled vorliegenden Vektors pAdEasy1 mittels Elektroporation in *E. coli* BJ 5183 Bakterienzellen kotransformiert. Durch die homologe Rekombination in den Bakterien kam es zur Übertragung der cDNA des Zielgens auf das Virusgenom und zusätzlich zu einem Austausch des Gens für die Ampicillin-Resistenz des

pAdEasy1-Vektors gegen das Kanamycin-Resistenzgen des pAdTrack-CMV-Vektors. Positive Klone konnten deshalb auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten selektiert werden. Mit dem Restriktionsenzym Pac I wurde die homologe Rekombination überprüft, wobei bei erfolgreicher homologer Rekombination zwei DNA-Fragmente mit 33 kb bzw. 4,1 kb im Agarosegel erkennbar waren. Das so gewonnene adenovirale Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym Pac I linearisiert. Der produktive Zyklus dieser rekombinanten Adenoviren, der zur Lyse der infizierten Wirtszellen führt, findet nur in permissiven Zellen, wie z. B. HEK („human embryonal kidney“)-Zellen statt, die zu einer Komplementierung der fehlenden E1-Region in der Lage sind (Graham *et al.*, 1977). Bei Zellen, wie z. B. glatten Muskelzellen, die den Replikationsdefekt der E1-Region nicht komplementieren können, erfolgt nach einer Infektion mit der replikationsdefizienten Ad5-Deletionsmutante keine Produktion infektiöser Viren. Die Amplifikation wurde durch die Transfektion von HEK-Zellen in einer 6 cm Schale mit dem Pac I linearisierten adenoviralen Plasmid durchgeführt. Die Zellen wurden für die Dauer von mindestens 10 Tagen kultiviert. Während der Inkubation konnte der Erfolg der Transfektion und die Virusproduktion anhand der Expression des Reportergens EGFP mit Hilfe eines inversen Mikroskops kontrolliert werden. Zu diesem Zweck verfügte das Mikroskop über eine Epifluoreszenzeinrichtung mit einem Filtersatz für EGFP (Anregung 470 nm, Emission 515 nm). Die Isolierung der rekombinanten Adenoviren erfolgte durch mechanisches Ablösen der infizierten HEK-Zellen von der Schalenoberfläche. Die erhaltene Zellsuspension wurde dreimal in flüssigem N₂ eingefroren, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 600 g entfernt. Mit den im Überstand befindlichen rekombinanten Adenoviren wurden nach und nach bis zu 5×10^8 Zellen infiziert. Anschließend wurden die adenoviral infizierten HEK-Zellen bei beginnender Zelllyse geerntet, indem etwa 20×10^6 Zellen mit 5 mL serumreduzierten DMEM-Medium von der Schalenoberfläche abgespült wurden. Die Zellen zeichnen sich bei Beginn der Zelllyse dadurch aus, dass sie abgerundet sind, aber noch an der Schalenoberfläche haften. Die Zellsuspension wurde bei 150 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 50 mL PBS vorsichtig resuspendiert. Anschließend folgte nochmals ein Zentrifugationsschritt bei 150 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch dreimaliges schockgefrieren in flüssigem N₂ und ein Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation der virenhaltigen Suspension bei 600 g für 5 min. Die Aufreinigung und Konzentrierung der rekombinanten Adenoviren erfolgte durch eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation. Der CsCl-Dichtegradient wurde hergestellt, indem zuerst 5 mL der CsCl-Lösung mit der höheren Dichte („Cäsiumchlorid-heavy“; 42,2 % {w/w}) in das Zentrifugationsröhrchen (Herolab, PA dünnwandig, 17 mL) gegeben wurden, die anschließend vorsichtig mit 5 mL CsCl-Lösung mit der niedrigeren Dichte („Cäsiumchlorid-light“; 22,4 % {w/w}) überschichtet wurden. Anschließend wurde die virushaltige Suspension vorsichtig auf den CsCl-Gradienten pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte in einer J2-21 Beckmann-Ultrazentrifuge mit

einem SW-27 Schwenkbecher-Rotor bei 87'000 g für etwa 20 h bei 4°C. Die rekombinanten Adenoviren befanden sich aufgrund der höheren Dichte unterhalb der leeren Kapside (Abb. 8).

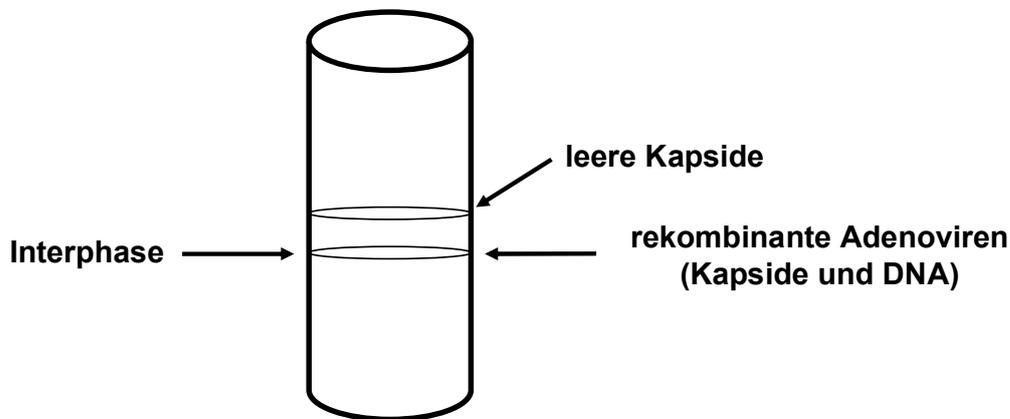


Abb. 8: Schematische Darstellung des Virusrings. Nach der Ultrazentrifugation war an der Interphase zwischen der leichten und schweren Phase des CsCl-Gradienten eine dünne, weiße Bande (rekombinante Adenoviren) und eine dickere weiße Bande (leere Kapside) im oberen Drittel des Ultrazentrifugationsröhrchens zu sehen.

Der Virusring wurde mit einer Spritze abgenommen und zunächst für 8 h und danach ü. N. gegen PBS dialysiert (Float-A-Lyzer, 15 kDa MWCO, 3 mL; Spectrum). Anschließend erfolgte eine 6-stündige Dialyse gegen 1x VSB-Puffer. Die Lagerung des rekombinanten Adenovirus erfolgte bei -20°C durch Zugabe des gleichen Volumens einer 90 %igen Glycerinlösung in 1x VSB-Puffer.

4.3.17 Klonierung von Haarnadelschleifen-shRNA-Inserts in einen Expressionsvektor (pAdTrack-CMV-shRNA)

Die Haarnadelschleifen-shRNA Oligonukleotid-Matrizen wurden „aufgeschmolzen“ (annealing) und in den linearisierten Vektor ligiert. Dies erfolgte zunächst durch Verdünnen der beiden komplementären einzelsträngigen 75 bp großen DNA-Oligonukleotid-Matrizen für shRNA in einem Reaktionsansatz mit Annealing-Puffer, so dass die Oligonukleotidkonzentration jeweils 50 µM betrug. Die Zusammenlagerung der beiden einzelsträngigen Oligonukleotide erfolgte durch 4-minütiges Aufkochen des Reaktionsansatzes bei 94°C und anschließendem Abkühlen bei RT für 10 min. Danach wurde das doppelsträngige Oligonukleotid auf eine Konzentration von 5 nM verdünnt. Da die DNA-Oligonukleotid-Matrizen für shRNA über eine zusätzliche 5'-lokalisierte BamHI bzw. 3'-lokalisierte HindIII Schnittstelle verfügen, war eine gerichtete Klonierung in den Vektor pAdTrack-CMV-shRNA möglich. Dazu wurde 1 µL der 5 nM doppelsträngigen Oligonukleotidlösung mit 100 ng HindIII/BamHI-linearisiertem pAdTrack-CMV-shRNA ligiert. Der pAdTrack-CMV-shRNA Vektor verfügt über einen Polymerase III Promotor, den H1 Promotor, wodurch die Expression der shRNA steuert wird.

Im Anschluss wurden *E. coli* Zellen (XL10-Gold, Stratagene) mit dem Ligations-Produkt transformiert. Als negative Kontrolle wurde ein Aliquot von *E. coli* Zellen mit Minus-Insert (Vektor

ohne Insert) Ligation transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (50 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Klone gepickt, in 5 mL LB-Medium mit Kanamycin überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „Plasmid Mini Kit“ (Sigma-Aldrich) isoliert und die DNA Konzentrationen spektrometrisch bestimmt. Um zu kontrollieren, ob das shRNA-Insert in den Vektor aufgenommen wurde, wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Die Restriktionsprodukte wurden dann mittels eines 2 %igen Agarosegels aufgetrennt, um das Vorhandensein der Insert-Bande zu überprüfen. Mit den Klonen, die das shRNA Insert enthielten, wurden größere Kulturen angesetzt (200 ml LB-Medium mit Kanamycin) und über Nacht schüttelnd bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem „Plasmid Midi Kit“ (Sigma-Aldrich) isoliert und die DNA Konzentrationen spektrometrisch bestimmt.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteingewinnung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen mit PBS gespült und mit einer adäquaten Menge kaltem TE-Puffer abgeschabt. Die Proben wurden mit einem Polytron auf Eis dreimal für 15 sec mit jeweils 15 sec Pause lysiert. Danach wurden die Zelltrümmer für 10 min mit 16'000 g bei 4°C abzentrifugiert. Ein Teil der Proben wurde in 4x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht und der andere Teil wurde bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.2 SDS-PAGE

In der SDS-PAGE wurden Proteinlysate (30 - 100 µg) für die immunologische Detektion und Coomassie-Färbung aufgetrennt. Die Proteinlysate wurden hierfür mit einer adäquaten Menge Laemmli-Puffer versetzt und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen in einer „Mini Protean II“-Apparatur (Biorad) bei 200 V aufgetrennt (Laemmli, 1970). Anhand eines Molekulargewichtsstandards „Roti-Mark Standard“ (Roth) wurden die Größen der aufgetrennten Proteine ermittelt. Der prozentuale Anteil der Acrylamid-Bisacrylamidlösung der verwendeten Trenngele variierte je nach Größe des nachzuweisenden Proteins von 6-15 %. Die Sammelgele besaßen eine Acrylamid-Bisacrylamidkonzentration von 5 %. Die aufgetrennten Proteine wurden durch eine anschließende Coomassie-Färbung oder eine immunologische Detektion mittels Western Blot sichtbar gemacht.

4.4.3 Western Blot

In einer Blotkammer der Firma Biorad wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Nassblotverfahren bei 100 V auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Transferzeit betrug durchschnittlich 1 h bzw. bei Proteinen mit einem Molekulargewicht größer als 200 kDa 2 h. Mit einer 0,2 %igen Ponceau-S-Lösung wurden die Proteine nach dem Transfer auf der Membran reversibel angefärbt und mit einem Imager (AlphaInnotech) dokumentiert. Anschließend wurde das Ponceau-S mit TBST abgewaschen und die Membran zur Blockierung freier Bindungsstellen mit einem Blockpuffer (5 % BSA oder RotiBlock, Roth) für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen um ungebundenen Blockpuffer zu entfernen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte wie in Tabelle 1 (siehe 4.1.5, Seite 25) beschrieben. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 45 min bei RT mit dem entsprechenden Sekundäantikörper inkubiert (anti-Maus 1:10'000, anti-Kaninchen 1:80'000 in TBST). Die Membran wurde abschließend dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Danach erfolgte mittels eines Chemolumineszenz-Substrats der Firma Roche (LumiLight-Plus) die Detektion der Primär-Sekundär-Antikörperkomplexe über die an die Sekundäantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase. Die Signale wurden ebenfalls mit einem Imager (AlphaInnotech) dokumentiert.

4.4.4 ROCK-Assay

Die Aktivitätsmessung der ROCK erfolgte mit dem „Rho-kinase Assay Kit“ der Firma CycLex im 96-well ELISA-Format. Transient transfizierte HEK-Zellen einer 6-well Platte wurden nach einer 48-stündigen Inkubation mit PBS gewaschen und mit 300 µL Lysepuffer abgeschabt. Die Zellen wurden auf Eis dreimal für 15 sec mit einem Handpolytron lysiert und die Zelltrümmer bei 4°C für 5 min mit 16'000 g abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford. Die Bestimmung der ROCK-Aktivität erfolgte zunächst durch eine 30-minütige Inkubation von 300 ng Proteinlysate bei 30°C mit dem auf der Oberfläche der Mikrotitervertiefungen immobilisierten Peptid des rekombinanten C-Terminus von MBS („myosin binding substrate“). Nach fünf-maligem Waschen wurde für 1 h bei RT ein Meerrettichperoxidasegekoppelter anti-Phospho-MBS-Threonine 696-spezifischer monoklonaler Antikörper zugesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit TMBH₂ (eine Leukoform von Tetra-Methylbenzidin (TMB)) und die abschließende Zugabe eines H₂SO₄-haltigen Stopreagenzes. Die Meerrettichperoxidase des gebundenen Antikörpers katalysierte die äquivalente Umwandlung der Leukoform des chromogenen Substrats TMBH₂ zu TMB bzw. die Umwandlung einer farblosen zu einer blauen Lösung. Der Zusatz von H₂SO₄ stoppte die katalytische Umwandlung von TMBH₂ zu TMB und bewirkte einen Farbumschlag nach Gelb. Die Extinktionen der Proben wurden in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm gemessen.

4.4.5 Coomassie-Färbung

Um Proteine nach einer erfolgten Trennung mittels SDS-Gelelektrophorese im Gel zu fixieren und sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Coomassie-Brilliant-Blue-R250 angefärbt. Dafür wurde das Gel dreimal mit der Färbelösung in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend bis zur gewünschten Verringerung des Hintergrundes mit der Entfärbelösung gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch eine Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischung, in der die Coomassie-Farbe enthalten ist. Daraufhin erfolgte die Dokumentation mit einem Imager (AlphaInnotech). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1 - 0,1 µg.

4.4.6 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Die Proben sowie die Proteinstandardreihe (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 µg BSA) wurden in Triplikaten in einer Mikrotiterplatte in einem Volumen von 50 µL vorbereitet. Das Bradford-Reagenz (Biorad) wurde vor der Messung 1 : 4 in dest. H₂O verdünnt und jeweils 200 µL zu den Proben gegeben. Die entstandene Farbveränderung wurde in einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardreihe mathematisch ermittelt.

4.4.7 Kopplung des RhoGEF17-spezifischen Peptids an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Um das RhoGEF17-spezifische Peptid (DSDSDEESSPSPSGT, Aminosäuren 1640 - 1655 von RhoGEF17) kovalent an eine Sepharosematrix zu binden, wurde zunächst 0,6 g CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) zweimal in 50 mL kalter 1 mM HCl für 30 min rehydriert. Danach wurde die gequollene Sepharose mit 50 mL H₂O gewaschen, anschließend abzentrifugiert und in einem Volumen von 5 mL H₂O in eine geeignete Säule überführt. Zur Aktivierung der Sepharose wurde die Säule mit 3 mL 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl-Lösung (pH 8,4) gewaschen. Anschließend wurden 2 mg des zu koppelnden RhoGEF17-spezifischen Peptids, welches in 1 mL 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl (pH 8,4) gelöst wurde, auf die Säule gegeben und ü. N. bei 4°C auf einem „Über-Kopf-Schüttler“ mit der aktivierten Sepharose inkubiert. Um ungebundenes Peptid zu entfernen wurde die Säule am nächsten Tag fünfmal mit 5 mL 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl-Lösung (pH 8,4) gewaschen. Um die noch vorhandenen freien reaktiven Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Säule mit 0,2 M Glycinlösung (pH 8,0) ü. N. bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule abwechselnd je viermal mit 5 mL 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl-Lösung (pH 8,4) und 5 mL 0,1 M NaAc/0,5 M NaCl (pH 4,0) gewaschen. Abschließend wurde die Säule in 5 mL 1 M NaCl mit 0,1 % NaN₃ bei 4°C gelagert.

4.4.8 Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers RhoGEF17

Das RhoGEF17-spezifische Antiserum wurde von der Firma Biogenesis hergestellt. Das erhaltene Antiserum der immunisierten Kaninchen wurde mittels einer Affinitätschromatographie über eine CNBr-Sepharose 4B-Säule mit kovalent gekoppeltem RhoGEF17-spezifischem Peptid aufgereinigt. Hierfür wurde die Säule fünfmal mit jeweils 5 mL kaltem PBS gewaschen, anschließend 5 mL des RhoGEF17-spezifischen Antikörperserums zugegeben und ü. N. bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Säule viermal mit 5 mL kaltem PBS gewaschen. Die Elution des RhoGEF17-spezifischen Antikörpers erfolgte fraktionsweise mit je 2 mL 100 mM Glycinlösung (pH 2,5). Die Fraktion, welche den eluierten, aufgereinigten Antikörper enthielt, wurde mit einer Proteinbestimmung detektiert. Abschließend wurde der Antikörper mit einer Vivaspinsäule (10 kDa MWCO; VivaScience) konzentriert und in einer adäquaten Menge PBS aufgenommen, so dass der Antikörper eine Endkonzentration von 1 µg/µL aufwies.

4.4.9 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Transfizierte HEK-Zellen einer 10 cm Schale wurden mit 500 µL Lysepuffer abgeschabt und bei -20°C ü. N. eingefroren. Für die IEF wurde ein 7 cm IEF-Streifen (Immobiline DryStrip, pH 3-10, linear, Fa. GE Healthcare) mit 100 µL Proteinlysate beladen und in einer Nasskammer ü. N. aufgequollen. Die Fokussierung erfolgte in einem Ettan IPGphor (GE Healthcare) nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Programm. Die Proteine wandern in einem pH-Gradienten unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bis sie den Punkt erreichen, an dem ihre Nettoladung null beträgt. Diesen pH-Wert bezeichnet man als „isoelektrischen Punkt“ (pI) des Proteins. Da das Molekül an seinem pI keine Nettoladung mehr trägt, hat das angelegte elektrische Feld keinen Einfluss mehr auf das Protein. Damit ist die IEF eine Endpunktmethode. Nach erfolgter IEF wurden die Streifen jeweils nacheinander für 15 min mit dem Äquilibriumspuffer I und II behandelt. Abschließend erfolgte eine Auftrennung der Proteine mittels der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese und eine immunologische Detektion mittels des Western Blot Verfahrens.

| Schritt | Spannung (V) | Zeit (Vhrs) |
|---------|--------------|-------------|
| 1 | 300 | 200 |
| 2 | 1000 | 300 |
| 3 | 5000 | 4000 |
| 4 | 5000 | 2000 |

Tab. 7: Laufbedingungen der IEF.

4.4.10 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung diente als Methode zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen in Zellen. Dazu wurden HEK-Zellen lysiert und anschließend mittels unterschiedlicher Zentrifugationsschritte in eine partikuläre Fraktion und eine zytosolische Fraktion aufgetrennt. Die Effektivität der Auftrennung wurde im anschließenden Western Blot anhand von Markerproteinen kontrolliert. Als Marker für die partikuläre Fraktion wurde die β -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine ($G\beta$) und für die zytosolische Fraktion die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Für die Zellfraktionierung wurden drei 10 cm Schalen mit HEK-Zellen 48 h nach Transfektion mit jeweils 10 mL PBS gespült und dann mit je 2 mL PBS abgeschabt. Die Proben wurden vereinigt, danach mit einem Glas-Glas-Homogenisator mit 20 Stößen homogenisiert und anschließend für 5 min mit 200 g bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde für 20 min mit 16'000 g bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand (zytosolische Fraktion) wurde abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pellet wurde in 10 mL PBS resuspendiert, mit einem Polytron fünfmal für 15 sec bei 30 Hz homogenisiert, für 20 min bei 16'000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde dreimal durchgeführt, das so gewonnene Pellet (partikuläre Fraktion) zuletzt in 200 μ L PBS aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle Proben wurden bis zum anschließenden Western Blot bei -80°C gelagert.

4.4.11 Ko- bzw. Immunopräzipitation (IP)

Für die Ko- bzw. Immunopräzipitation wurden transient transfizierte HEK-Zellen einer 10 cm Kulturschale nach 48-stündiger Inkubation mit PBS gewaschen und mit 1 mL IP-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden dreimal für 15 sec mit einem Polytron auf Eis lysiert und die Zelltrümmer bei 4°C für 10 min bei 16'000 g abzentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford. Von der Proteinlösung wurden 2 mg, sowie 8 μ g anti-c-myc-Antikörper und 50 μ L Protein A-Sepharose, welche in IP-Puffer äquilibriert wurden, für die Ko- bzw. Immunopräzipitation verwendet und 4 h bei 4°C über Kopf schüttelnd inkubiert. Alternativ wurde eine entsprechende Menge anti-c-myc-Antikörper eingesetzt, welcher kovalent an die Protein A-Sepharose gekoppelt war. Abschließend wurde die Protein A-Sepharose viermal mit 1 mL IP-Puffer gewaschen. Beim letzten Waschschritt wurden etwa 20 μ L Überstand über der Protein A-Sepharose stehen gelassen und mit 5 μ L Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden gut gemischt, anschließend für 2 min bei 16'000 g abzentrifugiert und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Der Überstand mit den denaturierten immunopräzipitierten Proteinen wurde mittels einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und immunologisch im Western Blot Verfahren nachgewiesen.

4.4.12 Pulldown-Assay

Aktiviert, GTP-gebundene monomere GTPasen binden mit einer sehr hohen Affinität an die GTPase-bindende Domäne (GBD) von Effektormolekülen. Diese Eigenschaft wird im Pulldown-Assay genutzt, um die Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 in Zelllysaten zu bestimmen (Benard & Bokoch, 2002; Ren & Schwartz, 2000). Die jeweilige Bindedomäne des Effektormoleküls der kleinen GTPasen wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* Rosetta™ Bakterien exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Für Rac1-GTP und Cdc42-GTP wurde GST-PBD (p21 Bindedomäne von Pak1) verwendet, sowie GST-Rhotekin-RBD (Rho-Bindedomäne von Rhotekin) um RhoA-GTP nachzuweisen. Zur Herstellung der verwendeten GST-Fusionsproteine wurde die entsprechende GTPase-bindende Domäne in den pGEX2T-Vektor kloniert, die für das entsprechende Protein zusammen mit einem Glutathion-S-Transferase-Fusionsanteil kodiert. Ausgehend von einer ü. N. Kultur wurden 100 mL 2x YT Medium (100 µg/mL Ampicillin) angeimpft und bis zu einer OD (600 nm) von 0,6 bis 0,8 bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Dann wurde die Proteinsynthese mit 100 µL 1 M IPTG bei 25°C und 250 rpm für 1 h induziert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min mit 3'000 g bei 4°C abzentrifugiert, mit 10 mL kaltem PBS resuspendiert und fünfmal für 30 sec mit Ultraschall lysiert. Nach Zugabe von 1 mL 10 %igem Triton X-100 wurde der Ansatz für 30 min auf Eis schüttelnd inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 10 min mit 20'000 g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand zu 300 µL Glutathion-Sepharose (Fastflow, Amersham Biosciences) gegeben, die zuvor zweimal mit 10 mL kaltem PBS gewaschen wurde. Das Lysat mit der vereinigten Glutathion-Sepharose wurde für 45 min schüttelnd auf Eis inkubiert. Dann wurde die Glutathion-Sepharose für 2 min mit 1'000 g bei 4°C abzentrifugiert, mit 50 mL PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert, bevor die Proteinkonzentration der Probe bestimmt wurde. Der Pulldown-Assay wurde bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Dazu wurde das Medium der 48 h zuvor transfizierten Zellen abgenommen und die 6-well Platte senkrecht auf Eis gestellt um restliches Medium absaugen zu können. Dann wurden die Zellen mit 500 µL GST-Fish-Puffer pro well abgeschabt und für 5 min bei 16'000 g und 4°C abzentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurden je 400 µL vom Überstand mit 40 µg GST-Fusionsprotein, welches an Glutathion-Sepharose gebundenen ist, für 60 min auf Eis über Kopf schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Proben zweimal mit 1 mL GST-Fish-Puffer gewaschen, mit 5 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min aufgekocht und mittels Immunoblot analysiert.

4.4.13 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen für den GDP/GTP-Austausch-Assay

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden cDNAs in den pGEX2T-Vektor kloniert und anschließend in den Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert, der eine Proteinexpression ermöglicht. Unter Verwendung von Ampicillin wurden die Bakterien auf Agarplatten selektiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie in 5 mL LB-Ampicillin ü. N. bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 500 µL der ü. N. Kultur in 200 mL LB-Ampicillin überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Induktion der Proteinexpression für 1 h mit 200 µL 1M IPTG bei 25°C und 250 rpm. Nach Pelletierung der Bakterienkultur für 10 min bei 3'000 g wurde das Pellet in 10 mL PBS resuspendiert und mit Ultraschall fünfmal für 30 sec (60 Hz) lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 16'000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 300 µL Glutathion-Sepharose versetzt, die zuvor zweimal mit 10 mL kaltem PBS gewaschen wurde. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Sepharose erfolgte durch 45-minütiges schütteln auf Eis. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose für 2 min mit 3'000 g abzentrifugiert und zweimal mit 50 mL kaltem PBS gewaschen. Die Elution des GST-Fusionproteins von der Glutathion-Sepharose erfolgte durch Zugabe von Elutionspuffer (GST-Fish-Puffer mit 20 mM Glutathion). Der Ansatz wurde zweimal mit je 1 mL Elutionspuffer für 15 min bei 4°C über Kopf schüttelnd inkubiert, abzentrifugiert und die Überstände vereinigt. Abschließend wurden die eluierten Proteine mit einer Vivaspinsäule (10 kDa MWCO, VivaScience) konzentriert und in den Versuchspuffer des GDP/GTP-Austausch-Assays umgepuffert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradfordmethode.

4.4.14 GDP/GTP-Austausch-Assay

Der GDP/GTP-Austausch-Assay diente der *in vitro* Substratspezifitätsbestimmung des Guaninnukleotid-Austauschfaktors RhoGEF10s. Dazu wurde bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-RhoA, GST-Rac1 oder GST-Cdc42 mit 3 µM [³H]-GDP beladen und anschließend der durch den RhoGEF katalysierten Austausch gegen nicht markiertes GTP bestimmt (Zheng *et al.*, 1995). Um die Konzentrationsabhängigkeit der RhoGEF-Aktivität zu bestimmen, wurden die aus *E. coli* BL21 aufgereinigten GST-GTPasen (0,6 µM) in 100 µL Beladungspuffer für 5 min bei RT mit [³H]-GDP inkubiert. Die Beladung wurde durch Zugabe von 1 µL 500 mM MgCl₂ gestoppt und der Ansatz für weitere 20 min bei RT inkubiert. Während dessen wurden ansteigende Konzentrationen des aufgereinigten GST-RhoGEF-DHs (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 µM) in 20 µL Versuchspuffer für 5 min bei RT äquilibriert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der [³H]-GDP beladenen GST-GTPasen gestartet und für 20 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Vakuumpumpe durch eine Nitrozellulosemembran filtriert und der Filter mit 3 mL Waschpuffer gespült. Während ungebundenes [³H]-GDP die Membran passieren konnte, blieb das gebundene [³H]-GDP auf der Membran zurück. Die Nitrozellulosemembran

wurde in Szintillationsröhrchen gegeben und mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Firma Packard) versetzt. Die Aktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler „Tri-Carb 2100 TR“ der Firma Packard gemessen.

4.4.15 Immunhistologie

Die Perfusion von Wistar-Kyoto-Ratten erfolgte für 10 min mit kaltem PBS und 0,1 % Heparin (200 IU/Tier), indem mit einer Nadel in die linke Herzkammer eingestochen und in die rechte Herzkammer ein kleiner Schnitt gemacht wurde. Dadurch wurde das Blut gegen PBS ausgetauscht, wobei Heparin die Blutgerinnung verhinderte. Anschließend erfolgte für 20 min eine Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS. Die thorakale Aorta wurde aus dem Tier entnommen und in eine Einbettkassette (Turboflow, Micron International) gelegt. Daraufhin folgte eine Postfixierung der thorakalen Aorta für 12 h bei 4°C in 4 % PFA in PBS. Danach wurden etwa 0,5 mm große Aortenringe geschnitten, in die Einbettkassette gelegt und eine Paraffinierung vorgenommen. Hierfür wurden die Aortenringe einmal für 5 min und dreimal für 15 min bei RT in PBS gewaschen, anschließend für jeweils 30 min in 70 %igem, 90 %igem und dreimal in 100 %igem Ethanol sowie dreimal für 60 min in jeweils frischer Rotihistollösung (Roth) entwässert. Die Präparate wurden für 6 - 12 h in einem absteigendem Rotihistol/Paraffingemisch (2:1, 1:1, 1:2) bei 58°C inkubiert, danach dreimal für 4 h in jeweils frischem, reinem Paraffin bei 58°C inkubiert und anschließend mit frischem Paraffin in einer Standardkassette eingebettet. Daraufhin wurden an einem Rotationsmikrotom (Mikrom, HM 340E) 7 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt, diese auf Objektträger aufgelegt und bei 37°C ü. N. im Wärmeschrank getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Präparate entparaffiniert, indem diese zweimal für 10 min mit Rotihistol und jeweils für 5 min in 100 %igem, 96 %igem, 90 %igem und 70 %igem Ethanol behandelt wurden. Anschließend erfolgte ein Waschschrift für 5 min in dest. H₂O und für 5 min in Citratpuffer. In einer Färbeküvette wurden die Präparate dreimal für 5 min in 200 mL Citratpuffer in der Mikrowelle bei etwa 600 W erhitzt. Zusätzlich wurden 2 Bechergläser mit je 200 mL dest. H₂O zur Energieaufnahme in die Mikrowelle gestellt. Nach 30-minütigem Abkühlen der Präparate bei RT wurden diese für 5 min in etwa 22°C warmem PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung der Aldehyde für 15 min in 0,1 M Ammoniumchloridlösung in PBS. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in PBS wurden die Aortenringe auf dem Objektträger mit einem Fettstift umkreist, um das Volumen der nachfolgenden Lösungen zu reduzieren. Die Blockierung der Avidine und Biotine erfolgte für jeweils 15 min bei RT mit entsprechender Avidin- bzw. Biotin-Blockierlösung (Blocking Kit, Linaris SP 2001, Wertheim-Bettingen). Die endogenen Peroxidasen wurden für 15 min bei RT mit einer 0,3 %igen H₂O₂-Lösung blockiert. Die Präparate wurden jeweils nach jedem Blockierungsschritt für 5 min bei RT mit PBS gewaschen. Die Präinkubation der Aorten erfolgte für 30 min in 3 %igem n-goat-Serum sowie 1 % BSA in PBS. Letzlich folgte eine Immunfärbung mit den entsprechenden Antikörpern und eine Behandlung der Präparate entsprechend den Angaben des Herstellers mit ABC-Lösung (Vector Laboratories, Inc.,

Burlingame, USA) sowie Histo-Green (Kat. Nr. E109, Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland). Die Dehydratisierung nach der Histo-Green Färbung erfolgte jeweils für 30 sec in 70 %igem, 90 %igem, 96 %igem und 100 %igem Ethanol sowie dreimal für 30 sec in Rotihistollösung. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckelt und bei 4°C gelagert. Die Auswertung und Dokumentation wurde an einem DMRBE-Mikroskop der Firma Leica durchgeführt.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen

Für die Kultivierung der HEK-293-, TSA- und der thorakalen glattmuskulären Rattenaorta (RASMC)-Zellen wurde DMEM mit den entsprechenden Zusätzen (10 % FCS + 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 mM Glutamin) von der Firma Sigma verwendet. Humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC) wurden mit speziellem Endothel-Wachstumsmedium und den entsprechenden Zusätzen von PromoCell kultiviert (siehe 4.2.3, Seite 45).

| Zelltyp | Wachstumsbedingungen | Plattenbeschichtung | Anwendung | Transfektionsreagenz/Adenovirus |
|--|---------------------------|-------------------------------|--|---------------------------------|
| HEK-293 (humane embryonale Nierenzellen: adenoviral transformiert)* | 37°C, 5 % CO ₂ | Kollagen (45 µg/mL in PBS) | Luciferase-Assay, Pulldown-Assay | PolyFect, Lipofectamin 2000 |
| TSA (humane embryonale Nierenzellen: SV40 transformiert)* | 37°C, 5 % CO ₂ | Kollagen (45 µg/mL in PBS) | Luciferase-Assay, Pulldown-Assay | PolyFect |
| RASMC (glattmuskuläre Zellen der thorakalen Rattenaorta) | 37°C, 5 % CO ₂ | keine | Aktin-Zytoskelett-färbung, Pulldown-Assay | adenoviral |
| HUVEC (humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene) | 37°C, 5 % CO ₂ | 1 % Gelatine | Aktin-Zytoskelett-färbung | adenoviral |

* HEK-293- und TSA-Zellen werden im Folgenden als HEK-Zellen bezeichnet.

Tab. 8: Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen.

4.5.2 Trypsinieren und Passagieren von Zellkulturen

Die permanenten Zelllinien bzw. Primärzellen wurden in dem entsprechenden Wachstumsmedium kultiviert und in einem Inkubationsschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert. Zum Passagieren der Zellkulturen wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und mit einer adäquaten Menge Trypsin-EDTA-Lösung für 3 min bei RT behandelt. Unter dem Mikroskop wurde das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale kontrolliert und die Zellen durch Auf- und Abziehen in einer 10 mL Pipette vereinzelt. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit einem äquivalenten Volumen des entsprechenden Wachstumsmediums aufgenommen und die Zellen bei RT für 2 min mit 150 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der entsprechenden Menge an frischem Wachstumsmedium aufgenommen und nach Bedarf auf neue Zellkulturschalen verteilt. Mussten die Zellkulturschalen mit Kollagen beschichtet werden, so wurden sie vor dem Ausplattieren der Zellen mit 45 µg/mL Kollagen in PBS gespült. Die verwendeten Medien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

4.5.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen in einem Gemisch aus DMEM, 10 % FCS und 10 % DMSO bei -80°C tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, durch Auf- und Abziehen in einer 10 mL Pipette vereinzelt und die Zellen bei RT für 2 min mit 150 g abzentrifugiert. Das Zellpellet einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale wurde mit 1 mL Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C schonend heruntergekühlt.

Beim Auftauen wurden die Zellen so kurz wie nur möglich mit dem toxischen Einfriermedium in Kontakt belassen. Die Kryoröhrchen, welche die eingefrorenen Zellen enthielten wurden dazu im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellen sofort in eine vorbereitete, mit Wachstumsmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Nach erfolgter Adhärenz der Zellen wurde das Wachstumsmedium gewechselt.

4.5.4 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion der HEK-Zellen mit Plasmid-DNA bzw. Kotransfektion mit siRNA wurden die Transfektionsreagenzien „PolyFect Transfection Reagent“ von Qiagen bzw. „Lipofectamin 2000“ von Invitrogen benutzt (Tab. 9 und 10). Das PolyFect-Transfektionsreagenz besteht aus Dendrimer-Molekülen, die stark verzweigt sind. Die Dendrimer-Moleküle interagieren mit ihren positiv geladenen Aminogruppen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure und erzeugen so eine kompakte und zellgängige Struktur der DNA. „Lipofectamin 2000“ verwendet die lipidbasierte Transfektion als Mechanismus, dabei werden Moleküle mit

einem unpolaren, lipophilen Schwanz und einem polaren, positiv geladenen Kopf verwendet, die zusammen mit der DNA in wässriger Lösung Lipoplexe bilden. Mittels eines endozytotischen Aufnahmemechanismus oder der Fusion der Lipoplexe mit der Zytoplasmamembran gelang die DNA in die Zelle. Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von 80 % bei Verwendung von „PolyFect Transfection Reagent“ bzw. 50% bei Verwendung von „Lipofectamin 2000“ und serumreduziertem Medium („PolyFect Transfection Reagent“: 0,5 % FCS, 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin, 2 mM Glutamin; „Lipofectamin 2000“: 0,5 % FCS, 2 mM Glutamin) ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen, üblicherweise nach 6 h, wurde die transiente Transfektion gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der reversen transienten Transfektion wurde die Transfektion direkt nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt.

| Größe der Zellkulturschale | Zellzahl | Gesamtvolumen an Medium auf Zellen* (mL) | Plasmid-DNA # (µg) | Endvolumen der gelösten DNA** (µL) | Volumen des PolyFect Reagenz (µL) | Zugegebenes Medium zu den Zellen* (mL) | Zugegebenes Medium zu PolyFect/DNA Komplex* (mL) |
|----------------------------|-------------------|--|--------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| 24-well Platte | $1,6 \times 10^5$ | 20 | 0,5 | 25 | 5 | 300 | 200 |
| 6-well Platte | $9,6 \times 10^5$ | 3,0 | 2,0 | 100 | 20 | 1,5 | 0,6 |
| 6 cm Schale | $2,5 \times 10^6$ | 5,0 | 4,0 | 150 | 40 | 3,0 | 1,0 |
| 10 cm Schale | $7,0 \times 10^6$ | 8,0 | 8,0 | 300 | 80 | 7,0 | 1,0 |

* 0,5 % FCS in DMEM (100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 mM Glutamin)

in TE-Puffer

** DMEM ohne FCS und Penicillin, Streptomycin, Glutamin

Tab. 9: Parameter für die transiente Plasmid-DNA Transfektion von HEK-Zellen mit dem PolyFect-Transfektionsreagenz.

| Größe der Zellkulturschale | Zellzahl | Gesamt-Volumen an Medium auf Zellen* (mL) | Plasmid-DNA # (ng) | siRNA (pmoL) | DNA/RNA Gesamtvolumen** (µL) | Lipofectamin 2000 in Gesamtvolumen** (µL) |
|----------------------------|--------------------|---|--------------------|--------------|------------------------------|---|
| 96-well Platte | $2,8 \times 10^4$ | 0,1 | 100 | 1 | 25 | 0,2-0,5 in 25 |
| 48-well Platte | $5,6 \times 10^4$ | 0,2 | 100 | 5 | 25 | 0,3-0,8 in 25 |
| 24-well Platte | $11,2 \times 10^4$ | 0,5 | 200 | 10 | 50 | 0,5-1,5 in 50 |
| 6-well Platte | $6,7 \times 10^5$ | 2 | 1000 | 50 | 250 | 2,5-6 in 250 |

* 0,5 % FCS in DMEM + 2 mM Glutamin ohne Penicillin bzw. Streptomycin

in TE-Puffer

** DMEM ohne FCS, Penicillin, Streptomycin und Glutamin

Tab. 10: Parameter für die transiente Plasmid-DNA und siRNA Kotransfektion von HEK-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000.

4.5.5 Adenovirale Infektion von Zellen

Bei der adenoviralen Infektion der RASMC- und HUVEC-Primärzellen wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Anschließend wurde eine adäquate Menge an serumreduziertem Medium (0,5 % FCS) mit dem jeweiligen rekombinanten Adenovirus gemischt und auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 48 h mit dem rekombinanten Adenovirus inkubiert. Die HUVEC-Zellen wurden mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 10 und die RASMC-Zellen mit einer MOI von 150 infiziert. Die Infektionseffizienz der Zellen betrug etwa 80 % - 100 %.

4.5.6 SRE/SRF-Luciferase-Assay

Zur luminometrischen Quantifizierung der Luciferase-Aktivität wurde der „Dual-Luciferase Reporter Assay“ von Promega verwendet (Hill, 1995). Dabei wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „serum response factor“ (SRF) gemessen, der an die Promotor-Regulatorsequenz „serum response element“ (SRE) bindet und damit die Transkription von Genen stimuliert. Ein Reporter-genvektor, welcher für die *Photinus pyralis*-Luciferase kodiert wurde als Richtmaß der SRF-abhängigen Gentranskription verwendet (pSRE.L Plasmid, Dr. J. Mao, Dr.D. Wu, University of Rochester, Rochester, NewYork, USA). Ein Kontrollvektor, der ein *Renilla reniformis*-Luciferase (pRL-TK-Plasmid von Promega) exprimierendes Reporter-gen enthält, wurde als Kontrolle verwendet, und gegen die Messung des experimentellen Reporter-genvektors abgeglichen. Um eine Kontrolle für die transkriptionelle Aktivierung zu gewährleisten, besitzt der Kontrollvektor ein von experimentellen Bedingungen unabhängigen Herpes Simplex Thymidin Kinase (HSV-TK)-Promotor, der für eine schwache, aber konstitutive Expression der *Renilla reniformis*-Luciferase sorgt. Die *Renilla reniformis*- sowie die *Photinus*

pyralis-Luciferase erzeugen ein Biolumineszenzsignal. Die Photonenemission der *Photinus pyralis*-Luciferase erfolgt über Oxidation von Käferluciferin, für dessen Emission das Vorhandensein von ATP, Mg^{2+} und O_2 notwendig ist. Da die Zwischenstufe Luciferyl-AMP sehr schnell umgewandelt wird, würde die Lichtemission schnell wieder abnehmen. Durch Zugabe von Coenzym A, das im Assay bereits enthalten ist, erfolgt eine längerdauernde Lumineszenz. Bei der *Renilla reniformis*-Luciferase ist zur Photonenemission O_2 und Coelenterazin notwendig. Die Bestimmung der SRF-Aktivierung erfolgte in denselben Lysaten durch sukzessive Messung zunächst der *Photinus pyralis*- und danach der *Renilla reniformis*-Luciferase-Expression (*Photinus pyralis*-Luciferase: LARII; *Renilla reniformis*-Luciferase: Stop&Glow Buffer). Abschließend wurde der Quotient aus den beiden Werten gebildet, der unabhängig von der Transfektionseffizienz als Grundlage für die Bestimmung der Promotoraktivierung dient. Die experimentelle Vorgehensweise war die reverse transiente Transfektion von HEK-Zellen in einer 48-well Platte. Die Zellen wurden mit einer 80 %igen Konfluenz ausgesät und mit insgesamt 250 ng DNA pro well transfiziert. Pro well wurden 43 ng pSRE.L und 7 ng pRL-TK verwendet, sowie 200 ng von den jeweils zu untersuchenden Plasmiden. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 50 μ L „Passiv Lysis Buffer“ lysiert. Von den Lysaten wurde 1 μ L gemäß den Angaben des Herstellers in einem Multilabel Reader EnVision (Perkin Elmer) gemessen. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass die *Renilla reniformis*- und *Photinus pyralis*-Luciferase-Expression in einer einzigen Probe gemessen werden kann.

4.5.7 Färbung des Aktin-Zytoskeletts

Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts wurden RASMC oder HUVEC auf speziellen Objektträgern (4-well Culture-Slides, Falcon), entsprechend mit 45 μ g/mL Kollagen in PBS bzw. mit 1 %iger Gelatine beschichtet und mit einer etwa 50 %igen Konfluenz ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min in 3 %igem PFA in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden RASMC mit 0,5 %igem bzw. HUVEC mit 0,05 %igem Triton X-100 für 10 bzw. 3 min permeabilisiert, anschließend wieder mit PBS gewaschen und dann für 1 h mit 0,5 % BSA in PBS blockiert. Die Färbung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte durch Inkubation mit 1 μ g/mL TRITC-Phalloidin in 0,5 % BSA in PBS ü. N. im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer Mowiolösung eingebettet und ü. N. bei 4°C getrocknet. Die Auswertung und Dokumentation der Aktin-Zytoskelett Färbung wurde an einem DMRBE-Mikroskop der Firma Leica durchgeführt.

4.5.8 Isolation von thorakalen Aorten und Kultivierung der isolierten, glattmuskulären Zellen

Die thorakalen Aorten wurden aus 1 - 3 Monate alten Wistar-Kyoto-Ratten präpariert und in kaltes PBS gegeben. Die Aorten wurden mit einer Pinzette in PBS-Lösung von Binde- und Fettgewebe befreit und anschließend mit einem Skalpell in einer 0,4 %igen Kollagenase-Lösung in serumfreiem DMEM-Medium in 2 - 3 mm Ringe geschnitten. Anschließend folgte eine 20 - 30 minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Der Kollagenaseverdau der Aorten wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach erfolgreichem Verdau der Aorten wurde die Kollagenase mit einer äquivalenten Menge Wachstumsmedium inaktiviert und die Aortenringe dreimal mit Wachstumsmedium gewaschen. Dies erfolgte durch Zentrifugation bei 150 g für 5 min bei RT. Abschließend wurden die Aortenringe von 2 - 3 Aorten in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 4 mL Wachstumsmedium überführt. Nach 24 h wurde überprüft, ob sich Zellen an der Zellkulturflasche angeheftet haben und nach weiteren 48 h wurde 3 - 5 mL frisches Wachstumsmedium zugegeben. Nach weiteren 3-4 Tagen erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80 - 90 %. Die isolierten, glattmuskulären Zellen aus der Rattenaorta (RASMC) wurden bis zur Passage 5 für Anwendungen, wie den Pulldown-Assay oder eine Aktin-Zytoskelett Färbung verwendet.

5. Ergebnisse

Die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren RhoGEF10, GrinchGEF (Winkler *et al.*, 2005) und p164-RhoGEF (Rumenapp *et al.*, 2002) lassen sich anhand ihrer beschriebenen cDNA- und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen in einer Subfamilie der Dbl-Proteine zusammenfassen. Der direkte Sequenzvergleich zeigt jedoch, dass der Verwandtschaftsgrad zwischen RhoGEF10 und GrinchGEF höher ist, als der von p164-RhoGEF zu den jeweiligen anderen Austauschfaktoren (Abb. 9). So weisen z. B. nur RhoGEF10 und GrinchGEF C-terminal putative Transmembransegmente auf, deren Funktionalität allerdings für GrinchGEF bereits widerlegt worden ist (Winkler *et al.*, 2005).

Abgesehen von der Primärsequenz ist jedoch bislang wenig über die Spezifität, die Regulation und die physiologische Funktion dieser Subfamilie der Dbl-Proteine bekannt. Daher stand die Charakterisierung der biologischen Bedeutung dieser Proteine, insbesondere von RhoGEF10 und p164-RhoGEF im Fokus dieser Arbeit.

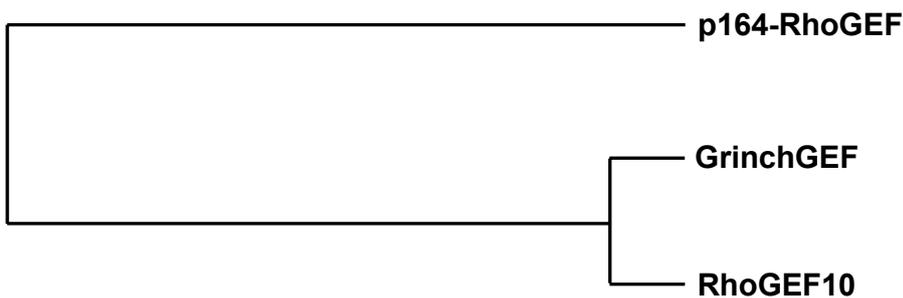


Abb. 9: Phylogenetischer Baum der Dbl-Subfamilie p164-RhoGEF, RhoGEF10 und GrinchGEF erstellt mit dem ClustalW-Computerprogramm. p164-RhoGEF weist bezogen auf die DH-Sequenz eine ~ 44 %ige Homologie zu GrinchGEF und RhoGEF10 auf. Die DH-Sequenz von GrinchGEF ist ~ 60 % homolog zu RhoGEF10.

1. Teil

5.1 Grundcharakterisierung von RhoGEF10

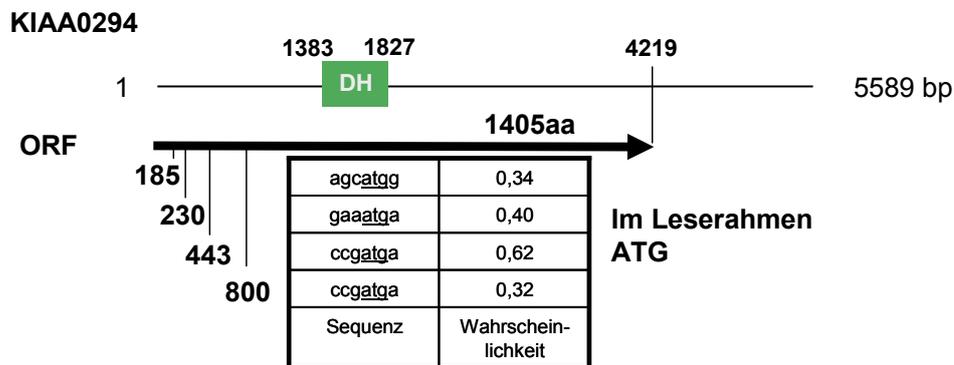
5.1.1 Klonierung und Expression von zwei humanen RhoGEF10-Varianten

Der KIAA0294 Klon, welcher vom Kazusa DNA Research Institute (Chiba, Japan) zur Verfügung gestellt wurde, wies einen offenen Leserahmen von Position +2 bis zu einem in-frame-Stopkodon bei Position 4219 auf. Mit dem Bioinformatik-Programm GeneMark (Borodovsky & Mcininch, 1993) konnten an den Positionen 185, 230, 443 und 800 vier putative Startkodons ermittelt werden (Abb. 10 A), wobei jedoch das ATG an Position 443 als das wahrscheinlichste Startkodon errechnet wurde. Deshalb wurde mittels Restriktionsklonierung zunächst der Sequenzabschnitt von Base 517 bis 4715 in den eukaryoten Expressionsvektor pCMV-Tag3 B kloniert, welcher die Überexpression einer N-terminal c-myc-getaggen, humanen RhoGEF10-Variante erlaubte.

Da in einer genetischen Studie von Verhoeven und Mitarbeitern beschrieben wurde (Verhoeven *et al.*, 2003), dass das murine RhoGEF10-Ortholog einem Gewebe-unabhängigen, alternativen Spleißen des Exons 4 unterliegt, sollte zunächst untersucht werden, ob das korrespondierende humane Exon 8 (Nukleotide 1028 bis 1144) ebenfalls Gegenstand alternativen Spleißens ist. Dazu wurden zunächst mit Exon 8-umspannenden Oligonukleotiden und isolierter Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Geweben eine RT-PCR durchgeführt, die Fragmente anschließend kloniert und sequenziert. Wie aus Abbildung 10 B ersichtlich wird, konnten in allen untersuchten Geweben 2 Amplifikate mit einer Länge von 420 und 537 bp detektiert werden. Die Sequenzierung ergab, dass die Differenz beider Fragmente tatsächlich auf alternativem Spleißen des Exons 8 beruhte und es durch Verlust dieses Exons zu keiner Verschiebung im offenen Leserahmen kam. Darüber hinaus bestätigte diese RT-PCR die von Yoshizawa und Mitarbeitern (Yoshizawa *et al.*, 2003) mittels Northern Blot-Analysen bereits nachgewiesene ubiquitäre Transkription des humanen RhoGEF10-Gens.

Basierend auf der Annahme, dass sich an Position 443 das Startkodon befindet, besteht RhoGEF10 aus 1258 Aminosäuren bzw. RhoGEF10- Δ E8 aus 1219 Aminosäuren. Die berechneten theoretischen Molekulargewichte (Expasy Peptide Mass) betragen ca. 140 bzw. 135 kDa. Weitere bioinformatische Untersuchungen ergaben, dass das RhoGEF10-Gen sich aus 28 Exonen zusammensetzt und auf dem Chromosom 8 an der Position 8p23 lokalisiert ist.

A



B

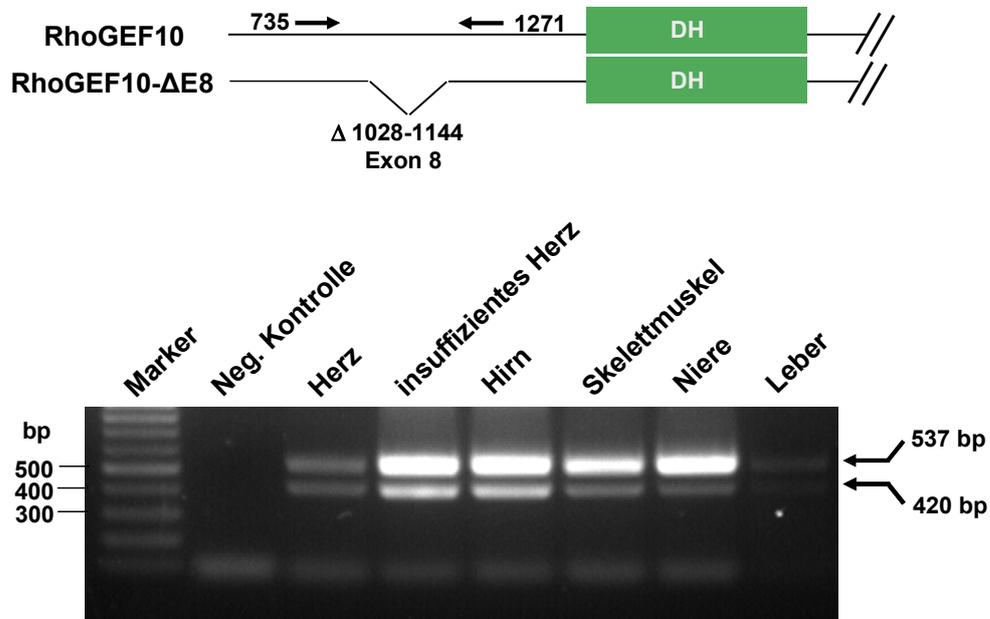


Abb. 10: Primärsequenz und alternative Spleißvariante von RhoGEF10. (A) Die Wahrscheinlichkeit mit der verschiedene ATGs als Startkodons innerhalb der RhoGEF10-Sequenz dienen könnten, wurde mit dem Bioinformatik-Programm GeneMark ermittelt. (B) RT-PCR von verschiedenen humanen Geweben mit Oligonukleotiden, die das Exon 8 umfassen. Für die RT-PCR wurden die in 4.1.7 aufgeführten Primer RhoGEF10-735-for und RhoGEF10-1271-rev verwendet.

5.1.2 Theoretische Analyse der Proteinsequenz von RhoGEF10, Expression und subzelluläre Lokalisation

Sequenzanalysen mit mehreren Bioinformatikprogrammen (InterProScan, TMHMM, Sosui) ergaben, dass RhoGEF10 eine ähnliche Proteindomänenstruktur wie das kürzlich publizierte GrinchGEF (Winkler *et al.*, 2005) aufweist: Neben der Dbl-Homologie-Domäne (Aminosäuren 310 bis 497) konnte eine putative WD40-ähnliche, Protein-Protein-Interaktionsdomäne mit einer β -Propeller-ähnlichen Struktur berechnet werden (Abb. 11 A). Unter Verwendung des dreidimensionalen Homologie-Modelling-Programms Fugue konnte diese etwa 250 Aminosäuren C-terminal der DH-Domäne zwischen den Aminosäuren 765 und 1110 lokalisiert werden. Eine solche Domäne von ähnlicher Größe und Position lies sich auch in p164-RhoGEF nachweisen. Darüber hinaus scheiterten, wie bereits für p164-RhoGEF und GrinchGEF beschrieben, verschiedene Bioinformatikprogramme an der Berechnung der für die Dbl-Familie so typischen PH-Domäne. Nur das hochstringente dreidimensionale Homologie-Modelling-Programm Fugue ermittelte bei RhoGEF10 eine putative PH-ähnliche Domäne zwischen den Aminosäuren 511 und 649. Zusätzlich ließen sich, wie bereits erwähnt, 2 C-terminal lokalisierte Membrandurchspannende Segmente zwischen den Aminosäuren 998 und 1020 sowie 1111 und 1133 berechnen (Abb. 11 A), die theoretisch eine extrazellulär-intrazellulär-extrazelluläre Orientierung bedingen würden. Obwohl dies in Anbetracht der Funktion eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors äußerst unwahrscheinlich erschien, konnte die tatsächliche Lokalisation von RhoGEF10 nur in einem experimentellen Ansatz ermittelt werden. Dazu wurden HEK-Zellen mit einem eukaryoten c-myc-getaggten Expressionsvektor, der für RhoGEF10 kodiert, transfiziert und anschließend die partikulären Kompartimente und Membranfragmente mittels Zentrifugation vom Zytosol abgetrennt. Wie in Abbildung 11 B zu sehen ist, konnte das überexprimierte RhoGEF10 ausschließlich in der zytosolischen, nicht aber in der partikulären Fraktion detektiert werden. Somit wurde eine theoretische Membranintegration widerlegt.

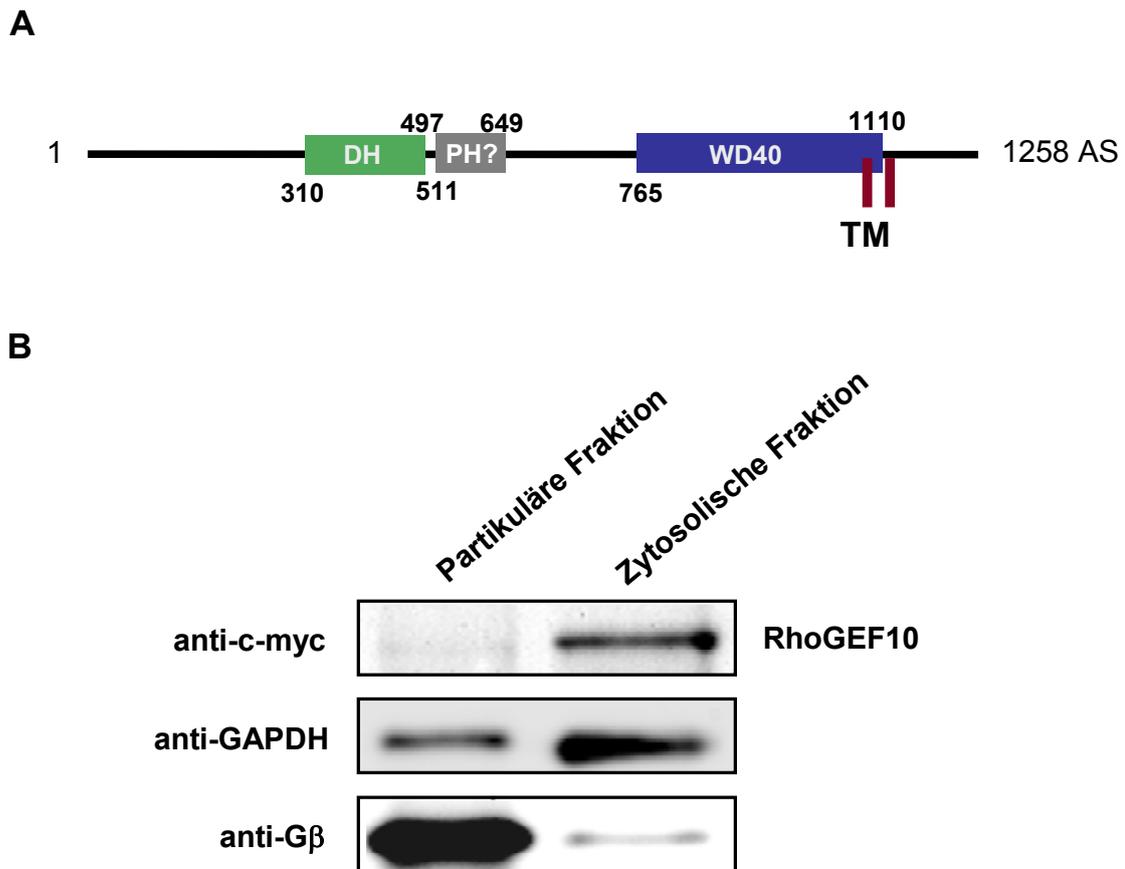


Abb. 11: Abgeleitete Proteindomänenstruktur und subzelluläre Lokalisation von RhoGEF10. (A) Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur von RhoGEF10. (B) HEK-Zellen wurden mit 6 µg pCMV-Tag RhoGEF10 transfiziert. Nach 48 h wurde die zytosolische und die partikuläre Fraktion präpariert (siehe 4.4.10, Seite 58) und gleiche Mengen an Protein im Immunoblot mit einem anti-c-myc-Antikörper untersucht. Der Nachweis der Reinheit der Fraktionen wurde mit einem anti-GAPDH- und einem anti-Gβ-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

5.1.3 RhoGEF10 aktiviert RhoA *in vitro*

Um die Spezifität der katalytischen Aktivität von RhoGEF10 zunächst *in vitro* zu untersuchen, wurde der Austausch von [³H]-GDP gegen nicht radioaktives GTP in aufgereinigten rekombinanten GST-RhoA, GST-Rac1 und GST-Cdc42 Fusionsproteinen untersucht. Dazu wurde die DH-Domäne von RhoGEF10 in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX2T kloniert, die Expression des daraus resultierenden GST-RhoGEF10-DH-Fusionsproteins in *E. coli* induziert und dies mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Im nachfolgenden Austauschexperiment vermochte GST-RhoGEF10-DH, vergleichbar der GST-DH-Domäne des RhoA-aktivierenden Dbs (Whitehead *et al.*, 1999), konzentrationsabhängig GST-RhoA, nicht aber GST-Rac1 und GST-Cdc42 zu aktivieren (Abb. 12).

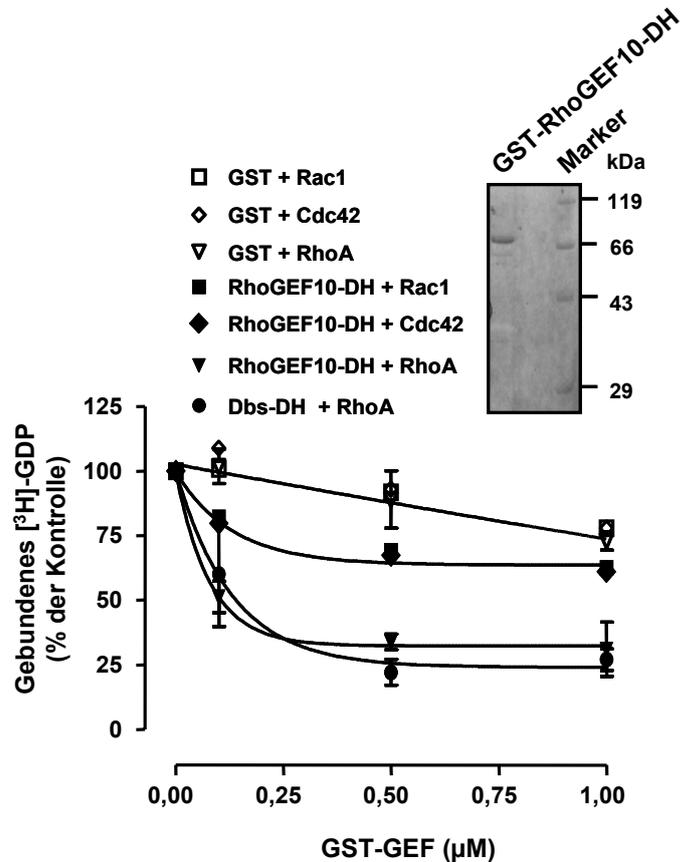
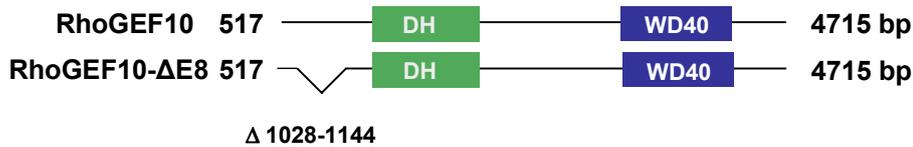


Abb. 12: Guaninnukleotid-Austauschaktivität von RhoGEF10 *in vitro*. RhoGEF10-DH wurde in den Vektor pGEX2T (Amersham) subkloniert und anschließend als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 Bakterien exprimiert, aufgereinigt und in einer 8 %igen SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung kontrolliert (Abb. rechts oben). 0,6 μM der gereinigten Rho-GTPasen (GST-RhoA, GST-Rac1 und GST-Cdc42) wurden für 5 min bei RT mit 3 μM [³H]-GDP beladen und anschließend mit 0; 0,25; 0,5; 0,75 und 1 μM GST-RhoGEF10-DH bzw. GST-Dbs-DH für 20 min bei RT inkubiert. Gebundenes [³H]GDP ist in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle angegeben. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (n=4) ± SD.

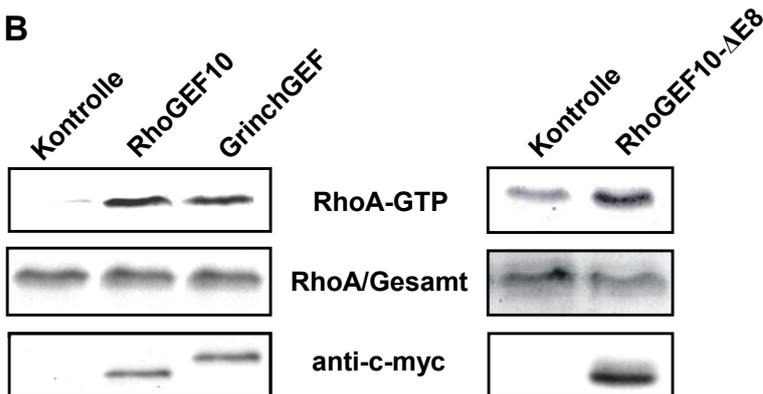
5.1.4 RhoGEF10 aktiviert RhoA-C in intakten Zellen

Um die Spezifität der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von RhoGEF10 und deren Spleißvariante RhoGEF10-ΔE8 (Abb. 13 A) in intakten Zellen zu untersuchen, wurde ein semiquantitativer Effektor-Pulldown-Assay durchgeführt (siehe 4.4.12, Seite 59). Dazu wurden HEK-Zellen mit RhoGEF10 bzw. RhoGEF10-ΔE8 transfiziert und die Aktivierung von endogenem RhoA bzw. überexprimiertem, N-terminal HA-getaggttem RhoB und RhoC untersucht. Als Positivkontrolle der RhoA-Aktivierung diente das engverwandte GrinchGEF. Wie aus Abbildung 13 B und C ersichtlich wird, waren sowohl RhoGEF10, als auch RhoGEF10-ΔE8 gleichermaßen in der Lage die Homologen RhoA-C zu aktivieren. In guter Übereinstimmung mit den *in vitro* Untersuchungen konnte RhoGEF10 auch in intakten Zellen keine Aktivierung von endogenem Rac1 bzw. Cdc42 bewirken (Abb. 13 D). Die Funktionalität dieser Pulldown-Assays wurde parallel durch Überexpression des Rac1-spezifischen RhoGEFs TIAM1, sowie der Cdc42-aktivierenden DH-Domäne von Dbl überprüft.

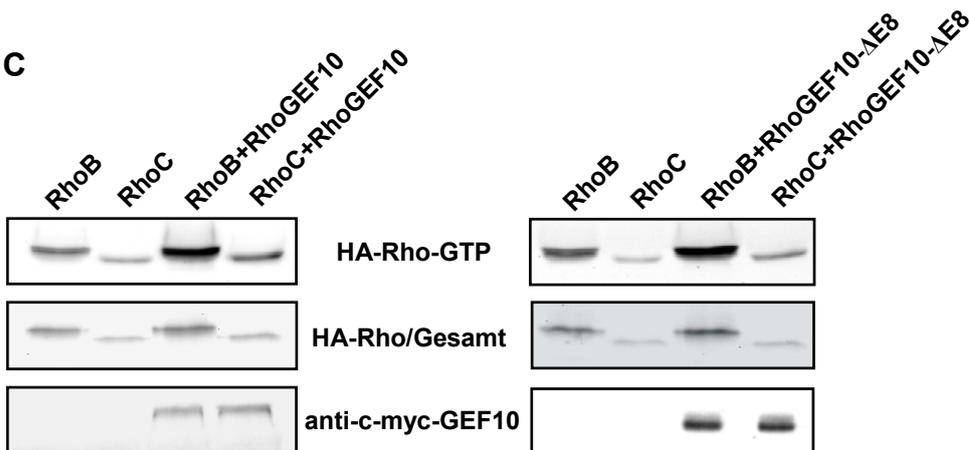
A



B



C



D

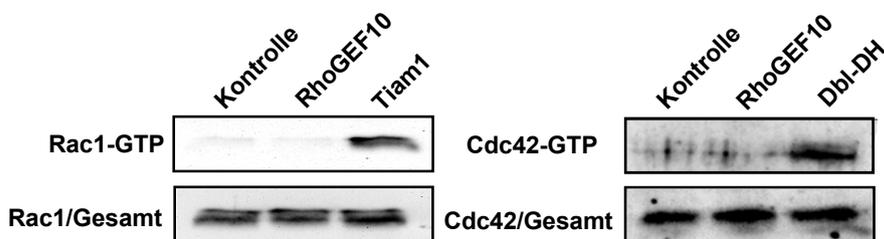
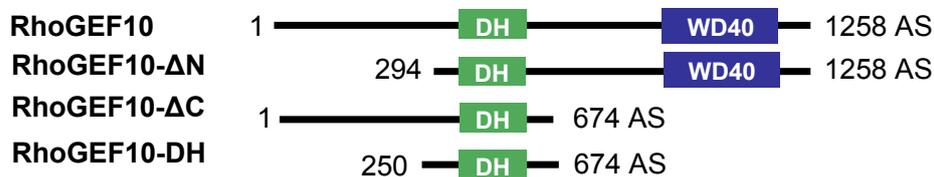


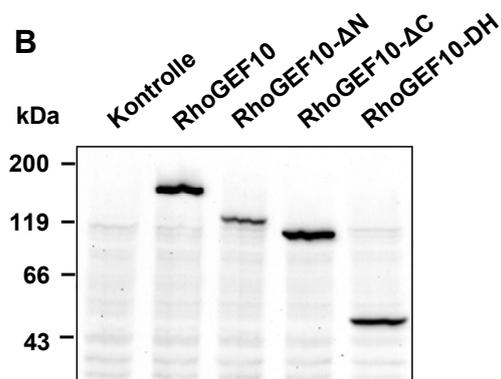
Abb. 13: RhoA-C spezifische Guaninnukleotid-Austauschaktivität von RhoGEF10-Varianten in intakten Zellen. (A) Schematische Darstellung der klonierten cDNA-Sequenz von RhoGEF10 und RhoGEF10-ΔE8. (B), (C), (D) HEK-Zellen wurden mit 1,5 µg Plasmid-DNA des entsprechenden RhoGEFs bzw. 750 ng Plasmid-DNA des entsprechenden RhoGEFs plus 750 ng Plasmid-DNA für RhoB bzw. RhoC und bis zu 1,5 µg Kontrollvektor kotransfiziert. Zur Bestimmung der Gesamtmenge der jeweiligen Rho-GTPase wurde parallel 40 µg der jeweiligen Zelllysate analysiert. Die Expression der RhoGEF10-Varianten und von GrinchGEF wurde mit dem anti-c-myc-Antikörper überprüft.

Da der Pulldown-Assay keine quantitative Aussage über die RhoGEF10-abhängige Aktivierung von RhoA-C erlaubt, wurde anschließend ein SRE/SRF-abhängiger Luciferase-Reporter-Gen-Assay durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zu Zellen, welche mit einem Kontrollplasmid (basale Kontrolle) transfiziert wurden, die Überexpression von RhoA-C, sowie die alleinige Überexpression von RhoGEF10 zu einem moderaten Anstieg der SRF-Aktivierung führte (Abb. 14 C). Zu einer deutlich über-additiven Zunahme der SRF-Aktivierung kam es durch Koexpression der jeweiligen Rho-GTPase mit RhoGEF10. Dabei zeigte RhoGEF10 eine leichte Präferenz gegenüber RhoB, dessen Aktivierung um etwa das 4-fache gesteigert wurde im Gegensatz zur 3-fachen Zunahme der RhoA und RhoC induzierten SRF-Aktivierung. Als Positivkontrolle wurde eine konstitutiv aktive p164-RhoGEF- Δ N-Mutante verwendet (Rumenapp *et al.*, 2002). Diese wies keine Präferenz für eine der drei Rho-Isoformen auf. Ein weiterer Unterschied zwischen p164-RhoGEF und RhoGEF10 wurde anhand der Überexpression verschiedener N- und C-terminal trunkierter Mutanten von RhoGEF10 deutlich (Abb. 14 A, B). Während für p164-RhoGEF eine autoinhibitorische Regulation beschrieben wurde, die durch die Verkürzung des Proteins aufgehoben werden konnte (Rumenapp *et al.*, 2002), erwies sich die Verkürzung von RhoGEF10 nicht als stimulierend, sondern vielmehr als Aktivitäts-inhibierend.

A



B



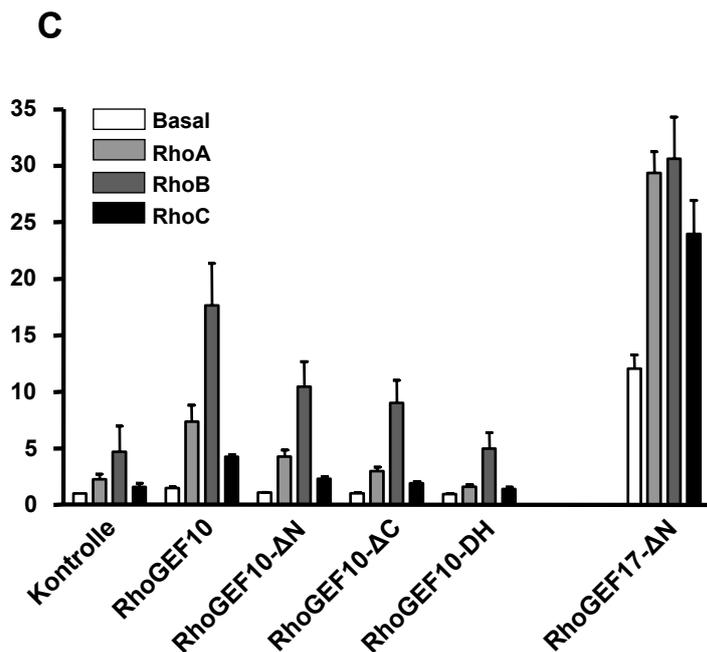


Abb. 14: Stimulation der RhoA-C vermittelten Gentranskription durch verschiedene RhoGEF10-Varianten. (A) Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur der entsprechenden trunkierten RhoGEF10-Mutanten. (B) Nachweis von überexprimierten trunkierten RhoGEF10-Mutanten in HEK-Zellen mittels eines anti-c-myc-Antikörpers im Immunoblot. (C) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und mit 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie mit 150 ng Plasmid-DNA der entsprechenden RhoGEF-Varianten und entsprechend mit 25 ng Plasmid-DNA für RhoA sowie mit 50 ng Plasmid-DNA für RhoB und RhoC sowie bis zu 200 ng Leervektor kotransfiziert. Die Aktivität der *Photinus pyralis*-Luciferase (zur Vereinfachung im Folgenden als *Photinus*-Luciferase abgekürzt) wurde gegen die Aktivität der *Renilla reniformis*-Luciferase (zur Vereinfachung im Folgenden als *Renilla*-Luciferase abgekürzt) normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte ($n=8$) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontroll-transfizierten Zellen.

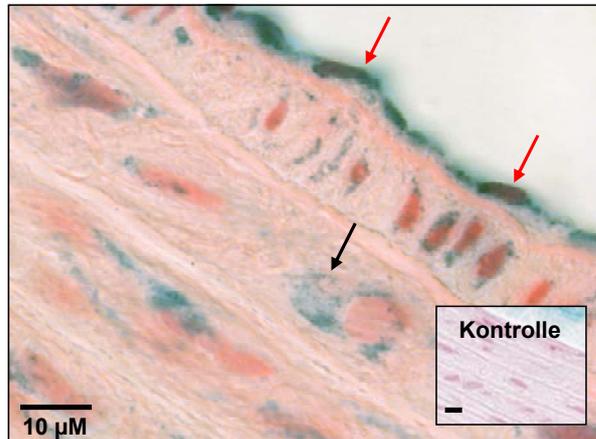
5.1.5 Expression von RhoGEF10 in Endothelzellen

Die von Yoshizawa und Mitarbeitern (Yoshizawa *et al.*, 2003) veröffentlichte Northern Blot-Analyse zur Transkription des RhoGEF10-Gens zeigte, wie bereits erwähnt, ein relativ weit verbreitetes Vorkommen des RhoGEF10-Transkripts in unterschiedlichsten Geweben. Besonders deutliche Signale waren jedoch in gefäßreichem Gewebe, wie Herz, Lunge, Gehirn, Plazenta und Niere aufgetreten. Aufgrund dessen sollte die Expression von RhoGEF10 zunächst in vaskulärem Gewebe untersucht werden. Dazu wurde eine immunhistologische Färbung thorakaler Aortenschnitte der Ratte (wurden freundlicherweise von Dr. Martin Thomas am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg durchgeführt) mit einem spezifischen anti-RhoGEF10-Antikörper durchgeführt. Diese wies eine deutliche Expression von RhoGEF10 in den Endothelzellen und eine wesentlich geringere in den glatten Muskelzellen der Aorta auf (Abb. 15 A). Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit dem Zweitantikörper. Die vorwiegend endotheliale Expression von RhoGEF10 konnte in einem anschließenden Immunoblot mit Lysaten von isolierten humanen Endothelzellen

der Umbilikalvene (HUVEC) bestätigt werden (Abb. 15 B). Dahingegen konnte in einem Immunoblot mit RASMC-Lysaten auf dieser Höhe keine spezifische Bande detektiert werden.

A

RhoGEF10



B

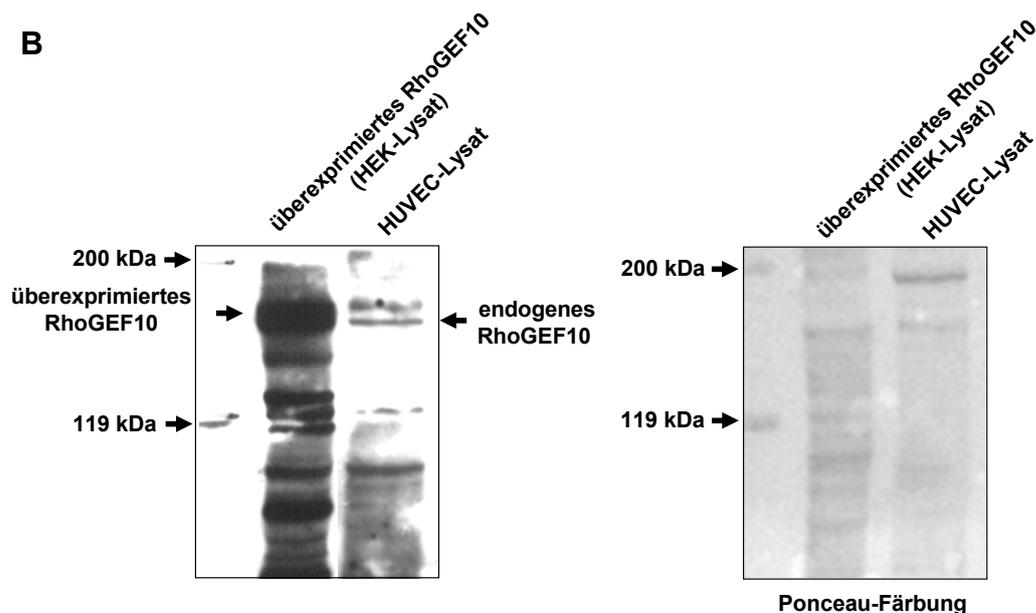


Abb. 15: Endogene Expression von RhoGEF10 in Endothelzellen. (A) Immunhistologische Färbung eines Paraffinschnittes der thorakalen Aorta der Ratte. 1. Antikörper: anti-RhoGEF10 (1:1000; 1h Inkubation). 2. Antikörper: anti-Kaninchen (1:200; 30 min Inkubation). Schwarzer Pfeil: glattmuskuläres Gewebe; roter Pfeil: Endothel. Inset: Kontrollfärbung des Zweitantikörpers. Maßstab: 10 µM (B) Nachweis von endogenem RhoGEF10 in 80 µg HUVEC-Lysat im Immunoblot mit einem anti-RhoGEF10-Antikörper. Als Expressionskontrolle diente das in HEK-Zellen rekombinant überexprimierte RhoGEF10. Die entsprechende Ponceau-Färbung ist im rechten Bild dargestellt.

Zusammenfassend zeigt dieser Teil der Arbeit, dass es sich bei RhoGEF10 um einen unter anderem endothelial exprimierten Guaninnukleotid-Austauschfaktor handelt, der spezifisch RhoA-C zu aktivieren vermag. RhoGEF10 unterliegt nicht, wie das verwandte Protein p164-RhoGEF einer autoinhibitorischen Kontrolle (Rumenapp *et al.*, 2002) und kommt im Menschen, vergleichbar wie in der Maus, zumindest in zwei verschiedenen Spleißvarianten vor.

2. Teil

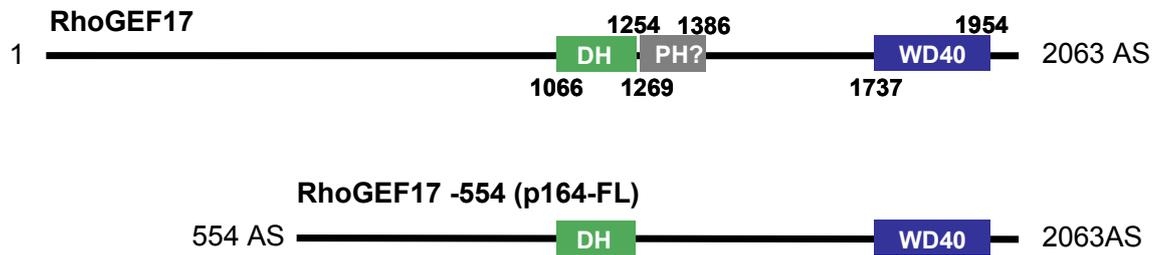
5.2 Regulation von RhoGEF17

5.2.1 Klonierung von RhoGEF17

Bei einem Computer-gestützten Vergleich der cDNA-Sequenzen für p164-RhoGEF von Mensch (Rumenapp *et al.*, 2002) und Maus stellte sich heraus, dass die murine Sequenz ein etwa 1,5 kb längeres 5'-Ende aufwies. Diese Sequenz enthielt ein putatives Startkodon und wies einen durchgängigen offenen Leserahmen auf, welcher in einer zu p164-RhoGEF homologen Aminosäuresequenz mündete. Dies legte die Vermutung nahe, dass diese zusätzliche Sequenz kodierend ist und aufgrund der hohen Homologie (~ 87 %) von Mensch und Maus auch im Mensch vorhanden sein sollte. Der direkte Vergleich dieser murinen Sequenz mit dem menschlichen Genom erbrachte eine entsprechende, hoch homologe Sequenz von 1662 Basen die im Folgenden mittels RT-PCR (entsprechende Primer RhoGEF17-19-for (EcoRI) und RhoGEF17-2007-rev (KpnI) sind in 4.1.7 aufgelistet) aus Gesamt-RNA von HEK-Zellen amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde per Restriktionsklonierung in die bereits vorhandene p164-RhoGEF-cDNA eingefügt. Die nun zur Verfügung stehende 7540 bp lange cDNA wies einen offenen Leserahmen von 6189 bp Länge auf, der für ein putatives, 2063 Aminosäuren langes Protein kodiert (Abb. 16 A). Dieses Protein, welches im Folgenden korrespondierend zu neueren Genbankeinträgen als RhoGEF17 bezeichnet wird, besitzt ein theoretisches Molekulargewicht (ExPASy Peptide Mass) von ca. 221 kDa, das experimentell bestätigt werden konnte (Abb. 16 B). Somit stellt das von Rumenapp und Mitarbeitern beschriebene p164-RhoGEF eine N-terminal trunke Mutante von RhoGEF17 dar und wird deshalb im Folgenden entsprechend der fehlenden 554 Aminosäuren als RhoGEF17 -554 bezeichnet (Abb. 16 A).

Die DH-Domäne von RhoGEF17 konnte mit mehreren Bioinformatikprogrammen (BlastP, ScanProsite oder InterPro) zwischen den Aminosäuren 1066 bis 1254 lokalisiert werden. Außerdem konnte, ähnlich wie für RhoGEF10, eine putative WD40-ähnliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne mit einer β -Propeller-ähnlichen Struktur im Bereich der Aminosäuren 1737 bis 1954 nachgewiesen werden (Touhara *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur Mehrheit der bekannten RhoGEFs verfügt RhoGEF17, vergleichbar mit RhoGEF10 und GrinchGEF, nicht über eine typische PH-Domäne. Mittels des hochstringenten dreidimensionalen Homologie-Modelling-Programms Fugue (Shi *et al.*, 2001) konnte allerdings eine putative PH-ähnliche Domäne errechnet werden, die zwischen den Aminosäuren 1269 und 1386 lokalisiert ist. Die zusätzlichen 554 Aminosäuren am N-Terminus weisen keine distinkten Proteindomänen auf (Abb. 16 A).

A



B



Abb. 16: Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur und Expression von RhoGEF17 und RhoGEF17 -554. (A) Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur von RhoGEF17 und RhoGEF17 -554. Abkürzungen: DH (Dbl-homologe Domäne), PH (Pleckstrin-homologe Domäne), WD40 (kurzes ~ 40 Aminosäuren langes „repeat“ Motiv, welches oft mit einem Tryptophan-Asparaginsäure-Dipeptid endet). (B) Expressionsnachweis von überexprimiertem RhoGEF17 und RhoGEF17 -554 in HEK-Zellen mittels eines anti-c-myc-Antikörpers im Immunoblot.

5.2.2 RhoGEF17 aktiviert spezifisch RhoA-C

Um zu überprüfen, ob das vollständige RhoGEF17-Protein, analog zu RhoGEF17 -554 eine Rho-spezifische GEF-Aktivität aufweist (Rumenapp *et al.*, 2002), wurde ein quantitativer SRE/SRF-Luciferase-Assay durchgeführt. Wie in Abbildung 17 dargestellt, führte die Überexpression von RhoGEF17 in HEK-Zellen zu einer verstärkten Luciferaseproduktion im Vergleich zur Kontrolle. Diese lies sich durch Koexpression der RhoA-C-inhibierenden C3-ADP-Ribosyltransferase (C3T) aus *Clostridium botulinum* komplett hemmen. Bei Überexpression von Wildtyp RhoA-C kam es ebenfalls zu einer SRF-Aktivierung. Die Koexpression von RhoA-C mit RhoGEF17 führte zu einer synergistischen SRF-Aktivierung im Vergleich zu der jeweiligen GTPase alleine, wobei im Unterschied zu RhoGEF10 kein Spezifitätsunterschied zwischen der Aktivierung von RhoA-C erkennbar war. Diese synergistische Aktivierung von RhoA-C mit RhoGEF17 ließ sich ebenfalls durch C3T unterdrücken. In Übereinstimmung mit den Daten, die für RhoGEF17 -554 von Rumenapp und Mitarbeitern beschrieben worden waren (Rumenapp *et al.*, 2002), konnte auch für das vollständige RhoGEF17-Protein keine Aktivierung von Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden.

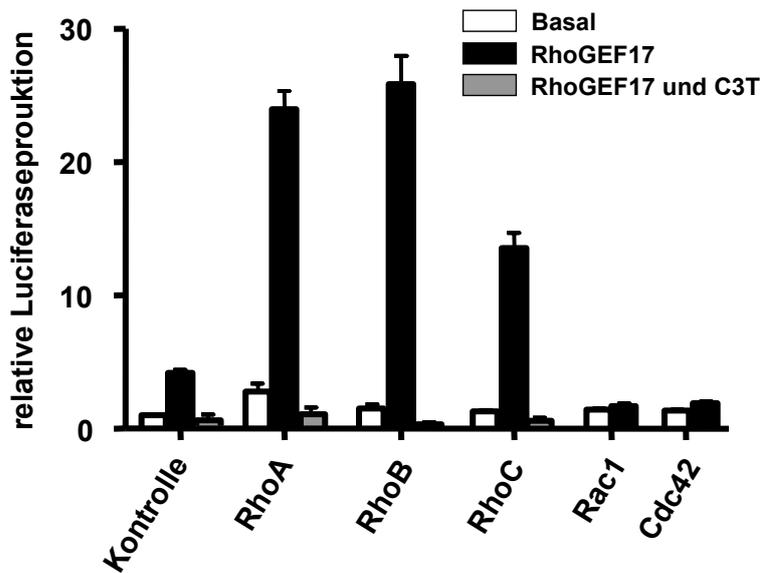


Abb. 17: RhoGEF17 aktiviert spezifisch RhoA-C. HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK zusammen mit jeweils 100 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 sowie entsprechend 25 ng Plasmid-DNA für RhoA und mit 50 ng Plasmid-DNA für RhoB, RhoC, Rac1 und Cdc42 sowie 50 ng Plasmid-DNA für C3T bzw. bis zu 200 ng Leervektor kotransfiziert. Die Aktivität der *Photinus*-Luciferase wurde gegen die Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte (n=5) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontroll-transfizierten Zellen.

5.2.3 Einfluss verschiedener Signalmediatoren auf die Regulation von RhoGEF17

Um die Signalkaskade, in die RhoGEF17 involviert ist, zu ermitteln, wurden in einem SRE/SRF-Luciferase-Assay charakteristische Signalmediatoren verschiedener Signalwege mit RhoGEF17 in HEK-Zellen koexprimiert bzw. die Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. membrangängigen second-messenger-Analoga stimuliert. Stellvertretend für den MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalweg wurden Raf sowie MEKK-1 und für den JNK (c-Jun-NH₂-terminale Proteinkinase)-Signalweg das Gerüstprotein JSAP-1 (JNK/SAPK-assoziiertes Protein) verwendet. Außerdem wurden verschiedene Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, wie G α_{12} und G α_q sowie G $\beta\gamma$ ausgewählt. Weiterhin wurden RhoGEF17-überexprimierende Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (IGF, PDGF und EGF) bzw. 10 % FCS behandelt, sowie die mögliche Beteiligung der cGKI- α bzw. PKA untersucht. Zum Nachweis einer potentiellen Beteiligung der PKA, wurde der Einfluss des membrangängigen cAMP-Analogen 8-Bromo-cAMP bzw. des Adenylylzyklase-Aktivators Forskolin in Kombination mit dem Phosphodiesterase Inhibitor IBMX auf die RhoGEF17 induzierte SRF-Aktivierung ermittelt. Eine mögliche regulatorische Funktion der cGKI- α wurde mittels Koexpression von RhoGEF17 und der Kinase und anschließender Stimulation mit dem membrangängigen cGMP-Analogen 8-Bromo-cGMP untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ausschließlich die Kotransfektion von RhoGEF17 mit cGKI- α bei gleichzeitiger Stimulation mit dem membrangängigen cGMP-

Analogon 8-Bromo-cGMP eine synergistische Verstärkung der SRF-Aktivierung um ca. das 7-fache zu induzieren vermochte (Abb. 18).

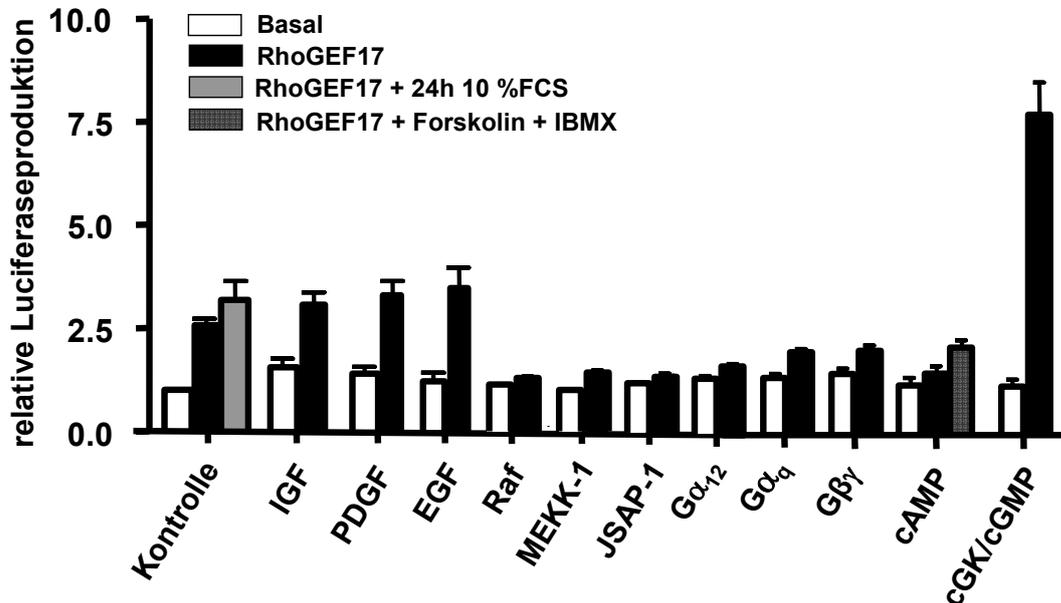
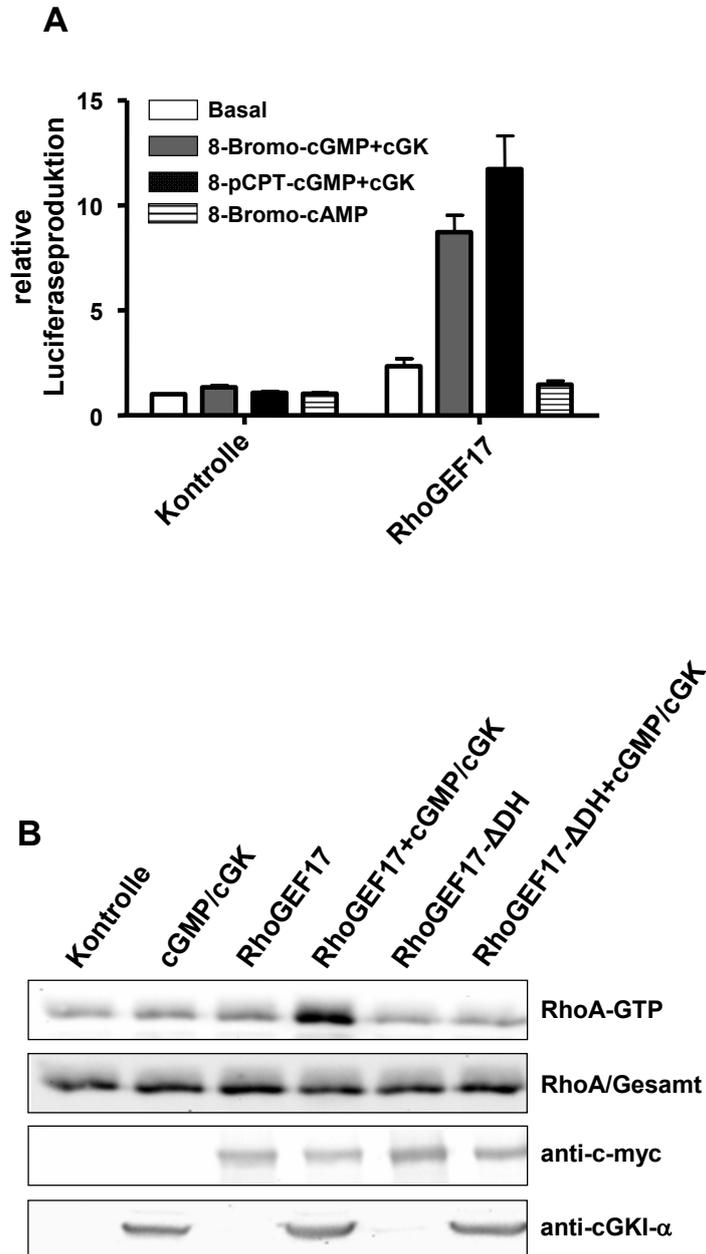


Abb. 18: Regulation von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α . HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie 100 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 bzw. 100 ng Plasmid-DNA für Raf, MEKK-1, JSAP-1 sowie 50 ng Plasmid-DNA für G α_{12} , G α_q , G $\beta\gamma$ und cGKI- α bzw. bis zu 200 ng Leervektor kotransfiziert. Die Zellen wurden entsprechend nach 24 h für 24 h mit 10 ng/mL PDGF, 5 ng/mL EGF, 5 ng/mL IGF bzw. für 24 h mit 10 % FCS, 1 mM 8-Bromo-cGMP, 1 mM 8-Bromo-cAMP sowie 24 h mit 20 μ M Forskolin plus 30 Minuten mit 1 μ M IBMX behandelt. Die Werte sind Mittelwerte (n=6) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten, unstimulierten Zellen.

5.2.4 Aktivierung von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α

Um auszuschließen, dass die beobachtete Aktivierung des SRFs durch RhoGEF17 und cGKI- α auf einem unspezifischen Effekt des 8-Bromo-cGMPs beruht, wurde ein zweites cGMP-Analogon (8-pCPT-cGMP) parallel verwendet. Im Gegensatz zu 8-Bromo-cGMP stellt 8-pCPT-cGMP einen spezifischeren cGK-Agonisten dar und weist gegenüber Phosphodiesterasen eine größere Stabilität auf. Daher konnte es im Vergleich zu 8-Bromo-cGMP in einer geringeren Konzentration verwendet werden. Wie in Abbildung 19 A zu erkennen ist, führte die Stimulation der mit RhoGEF17 und cGKI- α transfizierten Zellen mit 8-pCPT-cGMP zu einer vergleichbaren Aktivierung des SRFs wie 8-Bromo-cGMP. Da es sich bei dem SRE/SRF-Luciferase-Assay jedoch um eine Methode handelt, die nur indirekt Rho-Aktivierung nachweist, wurde im Folgenden die RhoA-Aktivierung direkt mittels Pulldown-Experimenten untersucht. Hier zeigte sich, dass die Überexpression von RhoGEF17 in Verbindung mit der cGKI- α nach Stimulation mit 8-pCPT-cGMP (zur Vereinfachung im Folgenden als cGMP abgekürzt) zu einer deutlichen Zunahme des Anteils GTP-gebundenen RhoAs führte. Wohingegen die Überexpression der katalytisch inaktiven RhoGEF17- Δ DH-Mutante weder allein noch in Anwesenheit von cGKI- α und

cGMP eine RhoA-Aktivierung zu induzieren vermochte (Abb. 19 B). Vergleichbar wie im SRE/SRF-Luciferase-Assay zeigte auch im Pulldown-Experiment die Behandlung der Zellen mit dem membrangängigen cAMP-Analogen 8-Bromo-cAMP keinen Einfluss auf die RhoA-Aktivierung durch RhoGEF17 (Abb. 19 A, C).



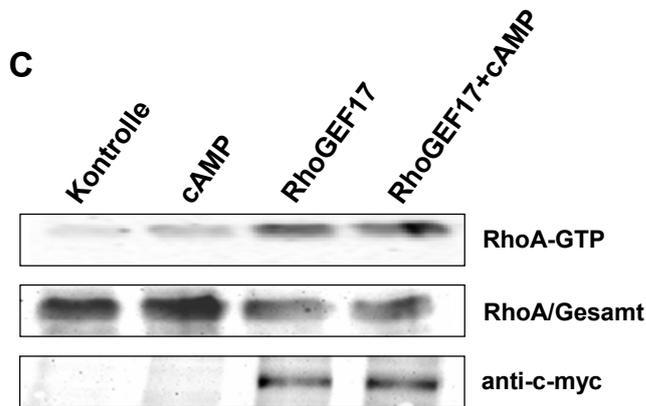


Abb. 19: Regulation der RhoA-Aktivierung durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α . (A) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie 150 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 und 50 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 200 ng Kontrollvektor kotransfiziert und nach 24 h mit 1 mM 8-Bromo-cAMP bzw. 1 mM 8-Bromo-cGMP und 100 μ M 8-pCPT-cGMP für 24 h stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ($n=6$) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten, unstimulierten Zellen. (B), (C) HEK-Zellen wurden entsprechend mit 750 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17- Δ DH bzw. RhoGEF17 und 750 ng cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 1 mM 8-Bromo-cGMP bzw. 1 mM 8-Bromo-cAMP stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g der Zelllysate analysiert. Die Expression von RhoGEF17 bzw. RhoGEF17- Δ DH und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft.

Um die durch RhoGEF17 und cGKI- α induzierte RhoA-Aktivierung näher zu charakterisieren, wurden transfizierte HEK-Zellen unterschiedlich lange mit 8-Bromo-cGMP behandelt und anschließend ein Pulldown-Assay durchgeführt. Wie aus Abbildung 20 A ersichtlich, wurde zum einen die maximale Aktivierung von RhoA durch RhoGEF17 und 8-Bromo-cGMP/cGKI- α bei Stimulationszeiten von größer als einer Stunde erreicht. Zum anderen wurde im SRE/SRF-Luciferase-Assay eine konzentrationsabhängige Steigerung der 8-Bromo-cGMP/cGKI- α -abhängigen SRF-Aktivierung in Gegenwart von RhoGEF17 nachgewiesen (Abb. 20 B). Die relative Zunahme der SRF-Aktivierung betrug bei Stimulation der Zellen mit 1 mM 8-Bromo-cGMP 700 % im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

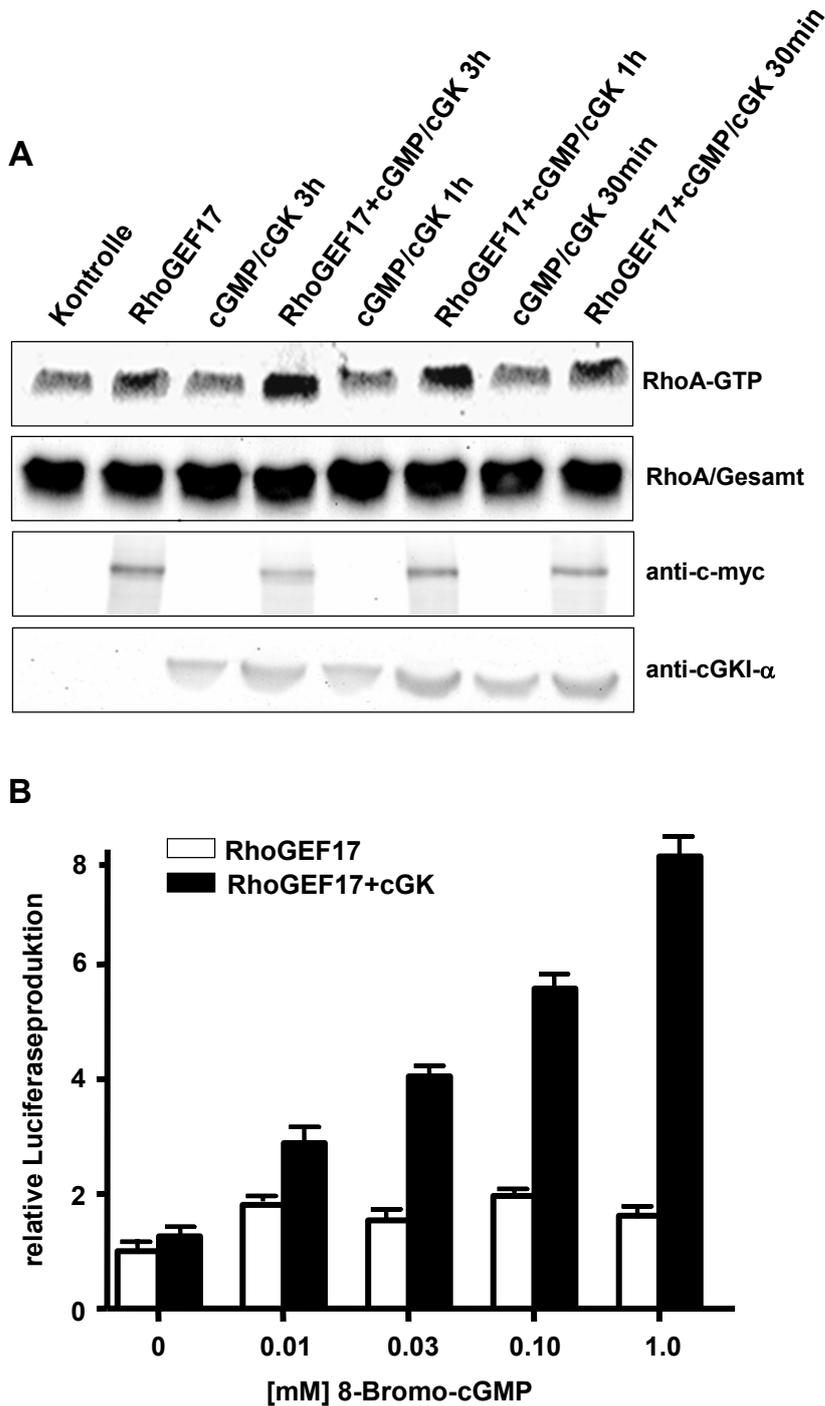
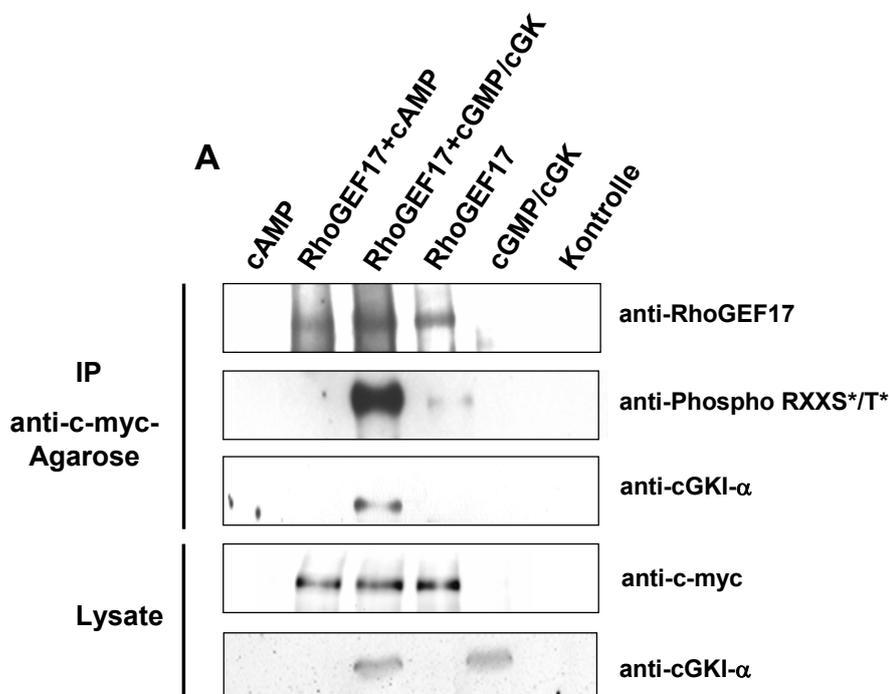


Abb. 20: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α . (A) HEK-Zellen wurden mit 750 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 sowie 750 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 45 h für 30 min, 1h, 2 h bzw. 3 h mit 1 mM 8-Bromo-cGMP stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. Die Expression von RhoGEF17 und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. (B) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie mit 150 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17, 50 ng Plasmid-DNA für cGKI- α und bis zu 50 ng Leervektor kotransfiziert und nach 24 h für 24 h mit 0,01 mM; 0,03 mM; 0,1 mM bzw. 1 mM 8-Bromo-cGMP stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ($n=4$) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten, unstimulierten Zellen.

5.2.5 RhoGEF17 wird durch cGKI- α phosphoryliert und interagiert mit cGKI- α

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die cGMP/cGKI- α -abhängige Aktivierung von RhoGEF17 auf einer direkten Interaktion beider Proteine beruht und RhoGEF17 ein Substrat für die cGKI- α darstellt. Hierfür wurde eine Koimmunopräzipitation von wie folgt transfizierten Zellen durchgeführt: Kontrollvektor; cGKI- α in Anwesenheit von cGMP; RhoGEF17; RhoGEF17 und cGKI- α in Anwesenheit von cGMP; RhoGEF17 in Anwesenheit von 8-Bromo-cAMP und Kontrollvektor-transfizierten Zellen stimuliert mit 8-Bromo-cAMP (Abb. 21 A). Mittels einer anti-c-myc-Agarose wurde das überexprimierte RhoGEF17 präzipitiert und auf eine mögliche Assoziation mit der cGKI- α untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe eines anti-Phospho-Serin/Threonin-spezifischen Antikörpers, der das folgende Konsensusmotiv RXXT* oder RRXS* (X steht für eine beliebige Aminosäure, * steht für die phosphorylierte Aminosäure) erkennt, der Phosphorylierungszustand von RhoGEF17 untersucht. Dieses Experiment zeigte eindeutig, dass RhoGEF17 in Gegenwart von cGKI- α nach Stimulation mit cGMP im phosphorylierten Zustand vorliegt und mit der Kinase eine direkte Interaktion eingeht. Die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA blieb auch hier ohne Effekt. Als zusätzliche Kontrolle diente der cGKI- α Kinase-Inhibitor KT-5823 (Abb. 21 B). Dieser kompetitive Inhibitor unterdrückte vollständig die cGKI- α bedingte Phosphorylierung von RhoGEF17 sowie auch die Assoziation beider Proteine.



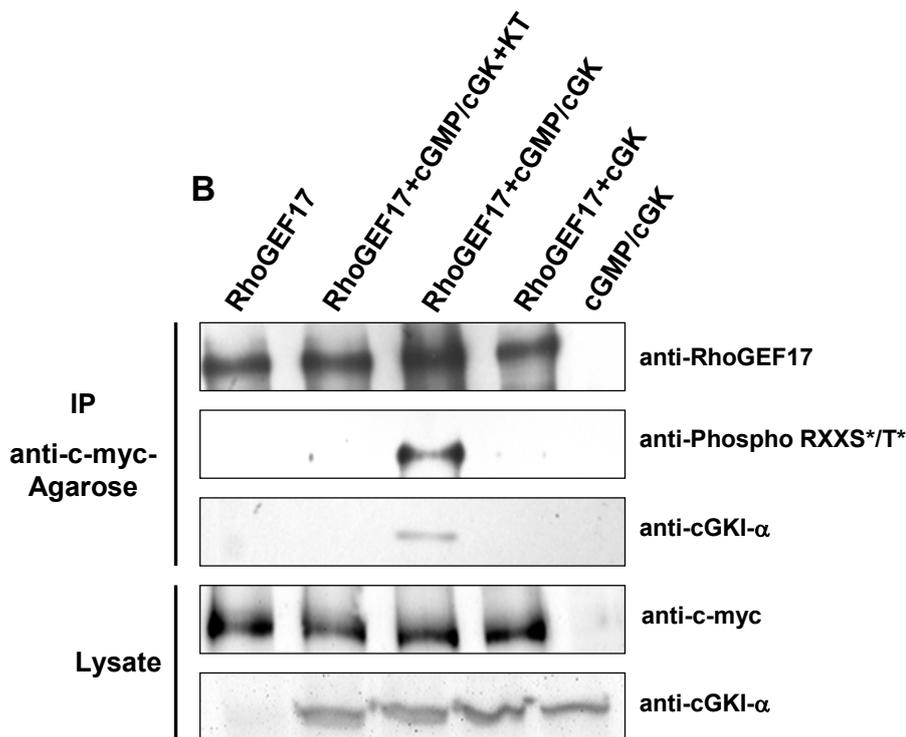


Abb. 21: cGKI- α spezifische Phosphorylierung von RhoGEF17 und Interaktion von cGKI- α mit RhoGEF17. (A), (B) HEK-Zellen wurden entsprechend mit 3 μ g RhoGEF17-Plasmid sowie 3 μ g Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h entsprechend mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP, 1 mM 8-Bromo-cAMP bzw. 100 μ M 8-pCPT-cGMP plus 1 μ M KT-5823 für 24 h behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 mL IP-Puffer abgeschabt und lysiert. 2 mg der Zelllysate wurden mit 8 μ g anti-c-myc-Antikörper und 50 μ L Protein A-Sepharose bei 4°C über Kopf schüttelnd für 4 h inkubiert, anschließend präzipitiert und im Immunoblot untersucht. Die Expression von RhoGEF17 und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern in den Lysaten überprüft.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Experimente zum übergeordneten Aktivierungsmechanismus von RhoGEF17 lassen den Schluss zu, dass RhoGEF17 spezifisch durch einen cGMP/cGKI- α - und nicht durch einen cAMP/PKA-abhängigen Signalweg aktivierbar ist und dies zu einer kooperativen RhoA-Aktivierung führt. Des Weiteren konnte durch Ko- bzw. Immunopräzipitation von RhoGEF17 eindeutig nachgewiesen werden, dass RhoGEF17 cGMP/cGKI- α -abhängig phosphoryliert wird und mit der cGKI- α eine direkte Interaktion eingeht. Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern sollte im Folgenden der detaillierte Phosphorylierungsmechanismus inklusive der entsprechenden Phosphorylierungsstellen von RhoGEF17 näher untersucht werden.

5.2.6 Putative cGK- bzw. PKA-Konsensusmotive des Proteins RhoGEF17

Die bioinformatische Analyse der humanen RhoGEF17-Aminosäuresequenz mit dem Programm ScanProsite ergab, dass der Guaninnukleotid-Austauschfaktor 9 putative PKA- bzw. cGK-spezifische Phosphorylierungsstellen (Abb. 22) besitzt, welche ebenfalls in der Maus und in der Ratte vorhanden sind und somit evolutionär konserviert zu sein scheinen.

Das etwas stringentere Analyseprogramm „Motif Scanner“ berechnete 4 der 9 Serine an den Positionen 43, 142, 1331 und 1765 als hochwahrscheinliche Phosphorylierungsstellen.

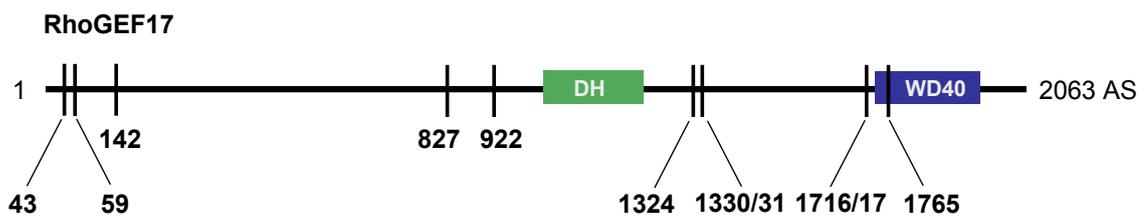


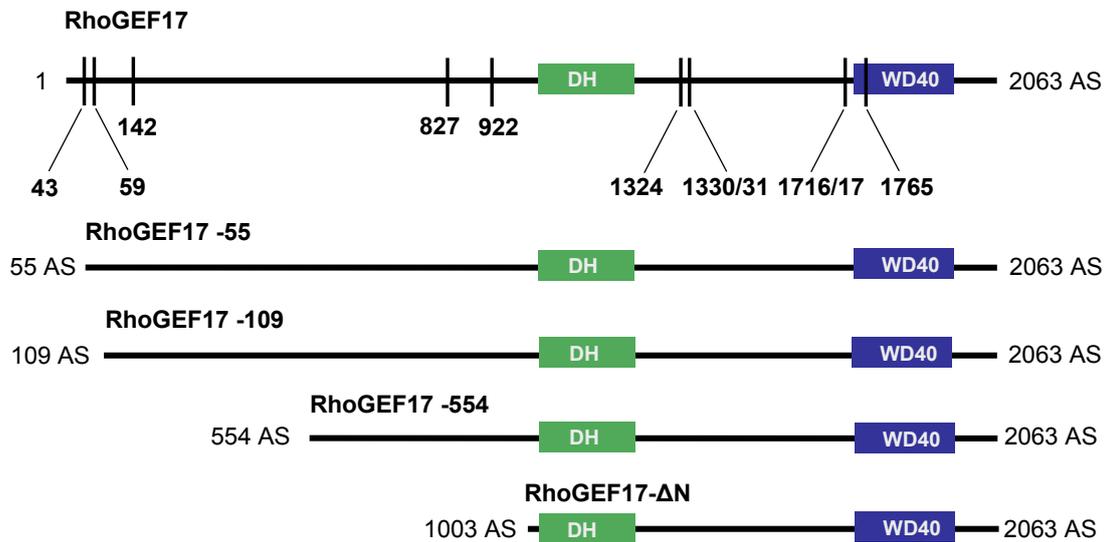
Abb. 22: Schematische Darstellung der putativen cGMP- bzw. cAMP-abhängigen Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen im RhoGEF17 (ScanProsite).

5.2.7 Bedeutung des N-Terminus von RhoGEF17 für dessen Aktivierbarkeit durch cGMP/cGKI- α

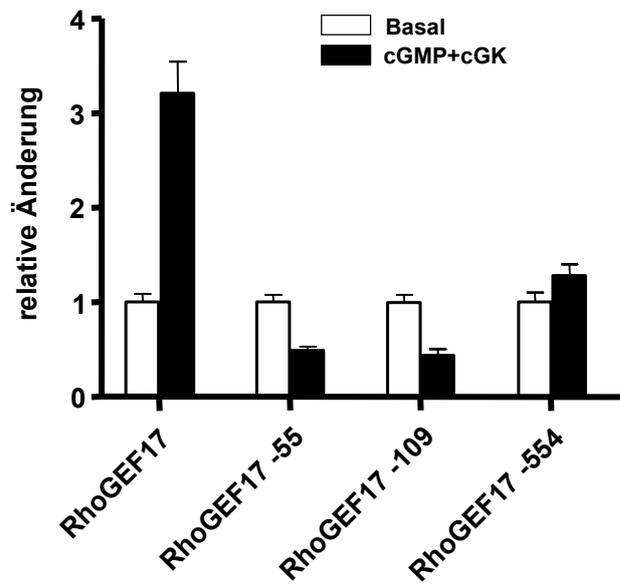
Um die Bedeutung der N-terminal gelegenen, putativen Phosphorylierungsstellen für die Aktivierbarkeit von RhoGEF17 zu untersuchen, wurden zunächst die in Abbildung 23 A schematisch dargestellten, trunkierten Mutanten generiert, in HEK-Zellen mit der cGKI- α koexprimiert und die RhoA- bzw. SRF-Aktivierung untersucht. Wie in Abbildung 23 B, C und D eindeutig zu erkennen ist, führte bereits die Deletion der ersten 55 Aminosäuren und somit des ersten Serins an Position 43 zum Verlust der cGMP/cGKI- α /RhoGEF17-abhängigen RhoA-Aktivierung und der korrespondierenden SRF-Aktivierung. Die weitere sukzessive Verkürzung hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die cGMP/cGKI- α -medierte RhoGEF17-Aktivität. Erst die Deletion von 1003 Aminosäuren und somit nahezu der gesamten N-terminalen Sequenz vor der DH-Domäne wirkte sich wieder auf die Stimulierbarkeit durch cGMP/cGKI- α aus. Allerdings zeigte diese Mutante eine gegenläufige Regulation im Vergleich zum Gesamtprotein: Zum einen war, in Übereinstimmung mit der von Rumenapp und Mitarbeitern publizierten autoinhibitorischen Regulation von p164-RhoGEF (Rumenapp *et al.*, 2002), die basale Aktivität dieser Mutante deutlich höher als die des Vollängenproteins, zum anderen bewirkte die Koexpression von cGKI- α nach Stimulation mit cGMP keine Aktivierung, sondern eine Inhibition der RhoA- und der SRF-Aktivierung um ca. 30% (Abb. 23 E, F). Dieser Befund deutete auf einen komplexen Aktivierungsmechanismus hin, welcher nicht ausschließlich auf der Phosphorylierung des Serins 43 beruhen konnte. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt die einzelnen in Frage

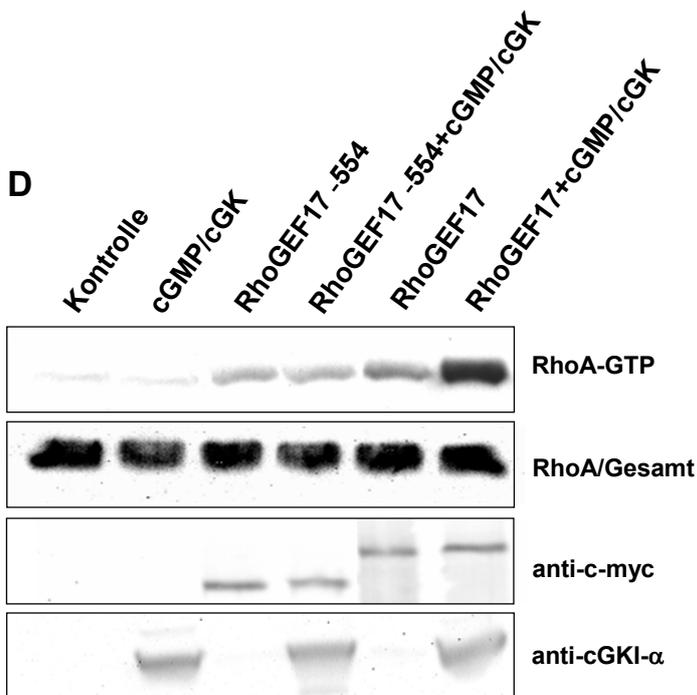
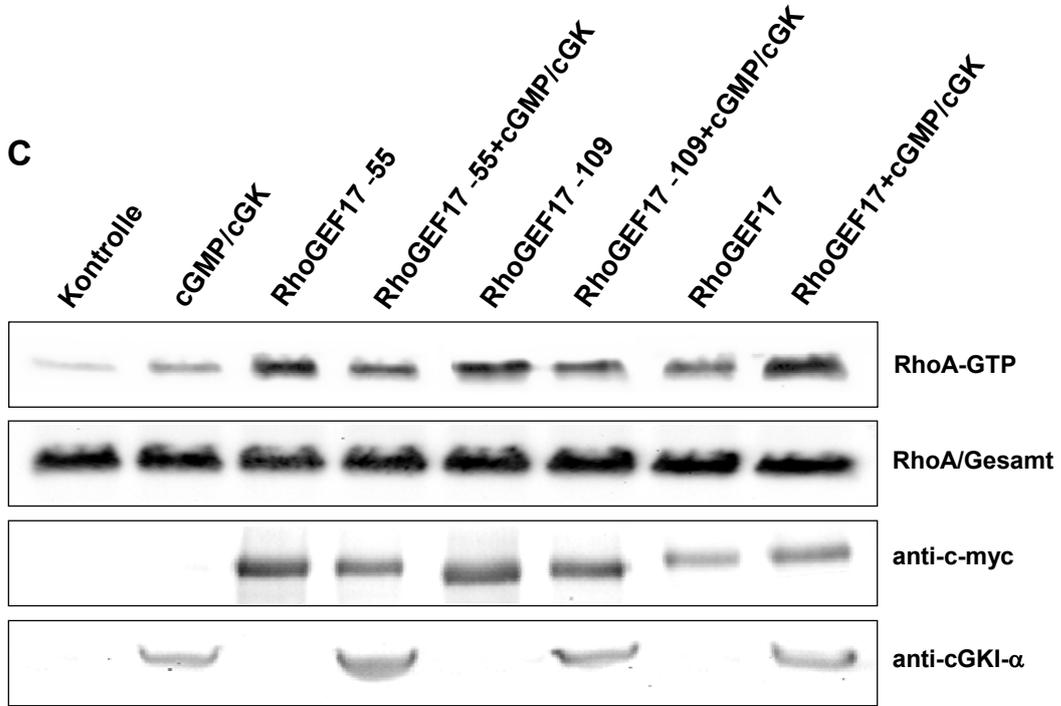
kommenden Serine der Deletionsmutante RhoGEF17- Δ N mittels gezielter Punktmutagenese durch Phosphorylierungs-resistente Alanine ausgetauscht und die entsprechenden Auswirkungen auf die RhoA-Aktivierung untersucht.

A



B





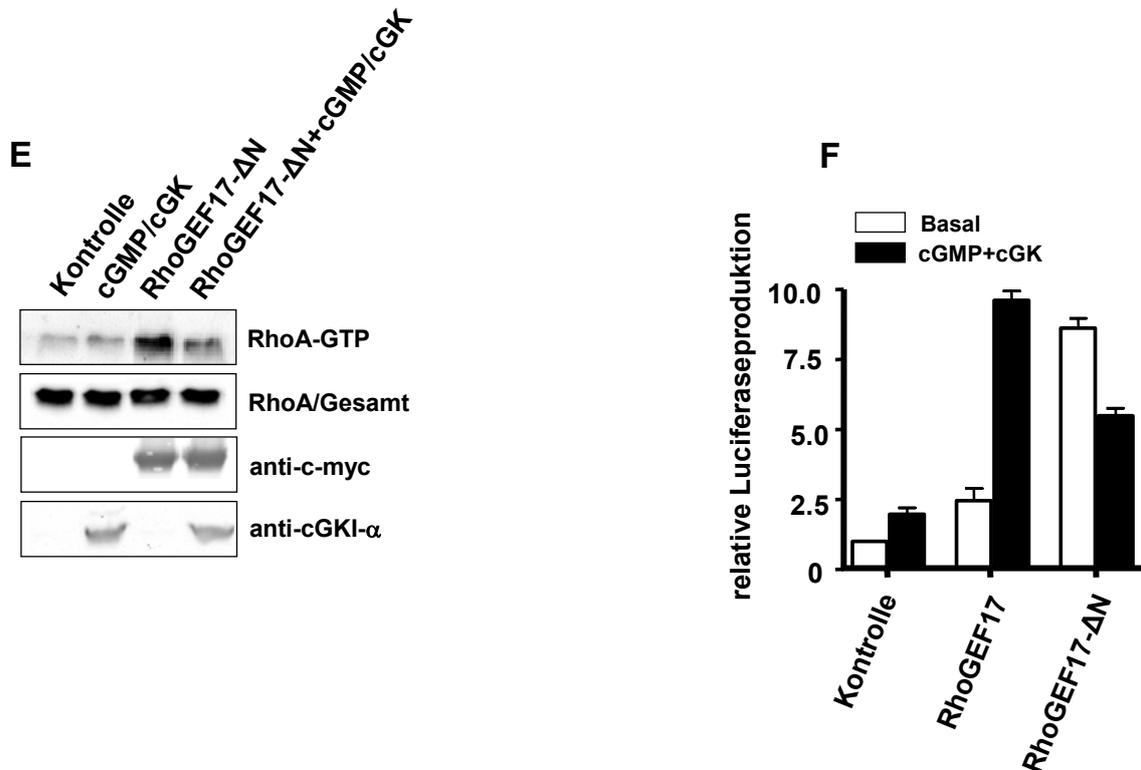
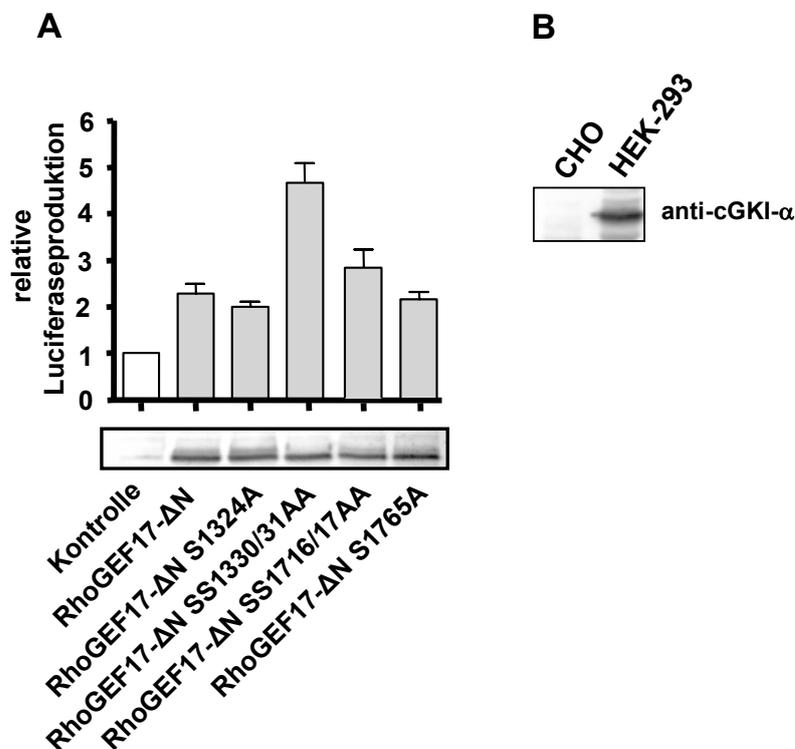


Abb. 23: Einfluss der sukzessiven, N-terminalen Verkürzung von RhoGEF17 auf seine Aktivierbarkeit durch cGMP/cGKI- α . (A) Schematische Darstellung der truncierten RhoGEF17-Mutanten. (B), (F) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie 150 ng Plasmid-DNA für das entsprechende RhoGEF und 50 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 200 ng Leervektor kotransfiziert und nach 24 h für 24 h mit 1 mM 8-Bromo-cGMP behandelt. Die Werte sind Mittelwerte ($n=8$) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten, unstimulierten Zellen. (C), (D), (E) HEK-Zellen wurden mit 750 ng Plasmid-DNA des entsprechenden RhoGEFs sowie 750 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 1 mM 8-Bromo-cGMP stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. Die Expression der jeweiligen RhoGEFs und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft.

5.2.8 Untersuchung der inhibitorisch wirkenden cGKI- α -Phosphorylierungsstelle im RhoGEF17- Δ N

RhoGEF17- Δ N weist noch 4 potentielle, cGK/PKA-spezifische Phosphorylierungsstellen auf, welche im Folgenden durch Punktmutation einzeln entfernt wurden. Wider Erwarten führte dies bei der RhoGEF17- Δ N-SS1330/1331AA-Mutante bei gleicher Expressionsstärke zu einem Anstieg der basalen Aktivität im Vergleich zu RhoGEF17- Δ N (Abb. 24 A). Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Phosphorylierungsstelle im Wildtyp-Protein zumindest teilweise phosphoryliert vorliegt und dies zur cGKI- α vermittelten Inhibition der RhoGEF17- Δ N Aktivität beiträgt. Da bei diesem Experiment keine cGKI- α koexprimiert wurde, wäre eine

Grundvoraussetzung für diese Annahme die endogene Expression der cGKI- α in HEK-Zellen. Um dies zu verifizieren, wurde ein Immunoblot von HEK-Zelllysaten mit einem anti-cGKI-spezifischen Antikörper durchgeführt, welcher einen eindeutig positiven Nachweis der endogenen Expression der Kinase erbrachte. Als Negativkontrolle dienten Lysate von chinesischen Hamsterovarien (CHO)-Zellen, die nachweislich cGKI nicht exprimieren (Ruth *et al.*, 1993) (Abb. 24 B). Eine weitere Bestätigung der aufgestellten Hypothese lieferten Experimente mit den gänzlich unterschiedlich wirkenden cGK-Inhibitoren KT-5823 und Rp-8-pCPT-cGMP: Sowohl der ATP-Kompetitor KT-5823, als auch das allosterisch inhibierende Rp-8-pCPT-cGMP vermochten die basale Aktivität von RhoGEF17- Δ N zu stimulieren, hatten aber auf die Aktivität der RhoGEF17- Δ N-SS1330/1331AA-Mutante keinen Einfluss mehr (Abb. 24 C-E). Weiterhin zeigte die Koexpression der cGKI- α und deren Stimulation mit cGMP keine Wirkung mehr auf die Aktivität dieser Mutante. In einem Parallelansatz wurde der PKA-Inhibitor H89 verwendet, um wie auch in vorhergehenden Untersuchungen eine Beteiligung der cAMP-regulierten Kinase auszuschließen (Abb. 24 C, D). Aus diesen Untersuchungen lässt sich also ableiten, dass die basale Phosphorylierung des Kinasemotivs an Position 1330/1331 einen inhibierenden Einfluss auf die Grundaktivität, zumindest der N-terminal trunkeierten RhoGEF17- Δ N-Mutante, ausübt. Um nun zu eruieren, ob diese Phosphorylierung für die Regulierbarkeit des Volllängenproteins ebenfalls benötigt wird, wurde ein entsprechendes RhoGEF17-SS1330/1331AA-Konstrukt generiert.



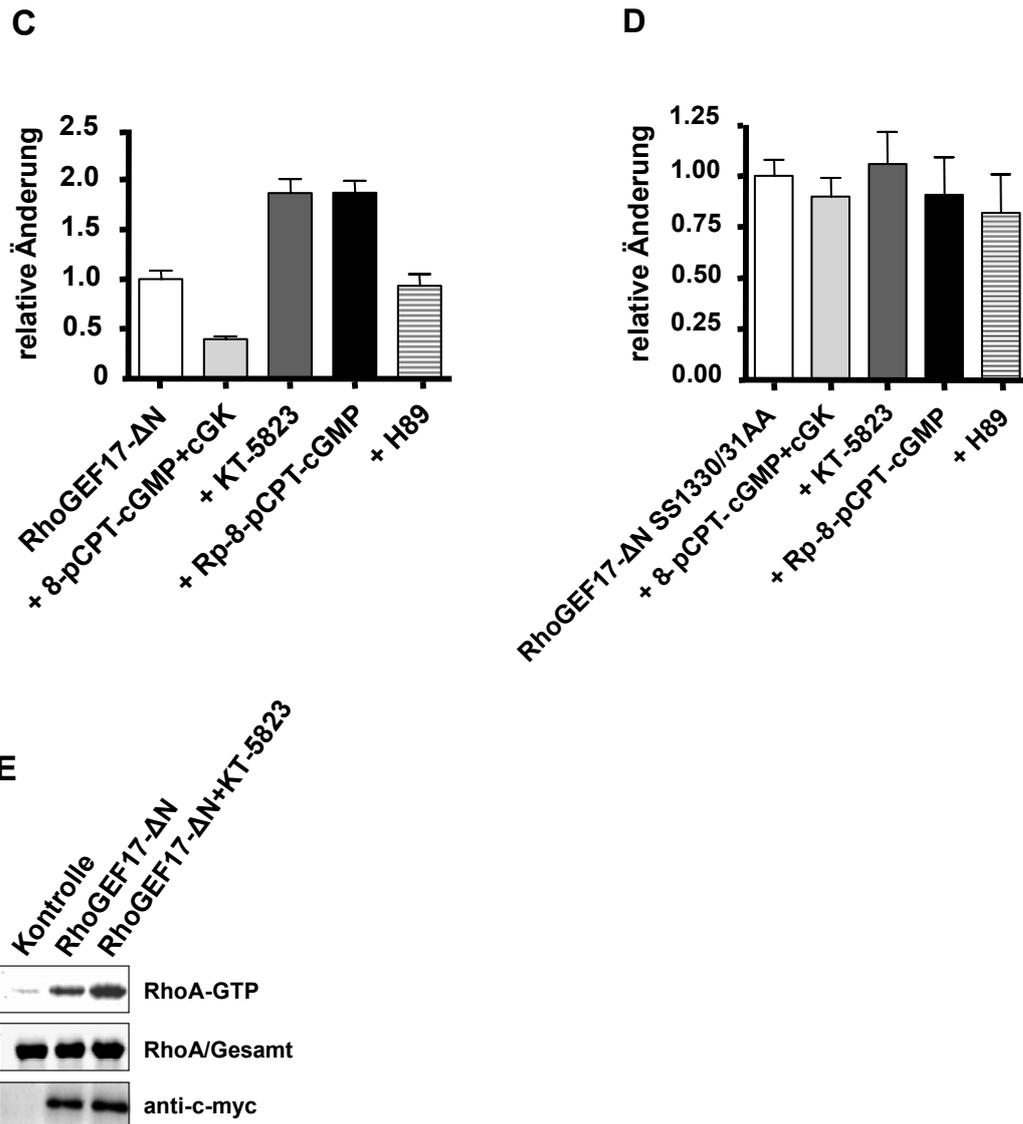
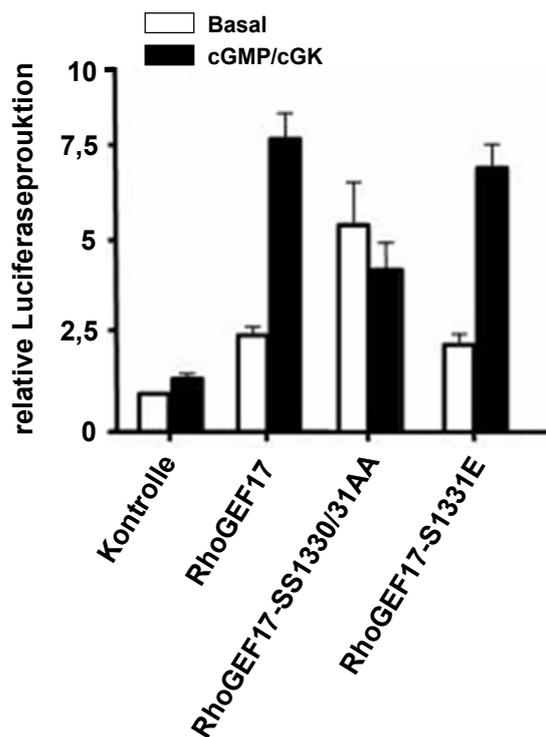


Abb. 24: Untersuchung zur Aktivierbarkeit verschiedener phosphoresistenter RhoGEF17-ΔN-Mutanten. (A) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L, 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie 150 ng Plasmid-DNA für das entsprechende RhoGEF (die entsprechenden Mutagenese-Primer sind in 4.1.7 aufgelistet) und bis zu 200 ng Leervektor kotransfiziert. Der Nachweis der entsprechenden überexprimierten RhoGEFs erfolgte mittels eines anti-c-myc-Antikörpers im Immunoblot. Die Werte sind Mittelwerte ($n=8$) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten, unstimulierten Zellen. (B) Nachweis von cGKI in untransfizierten HEK-Zelllysaten mittels eines spezifischen anti-cGKI-Antikörpers im Immunoblot. CHO-Zelllysate dienen als Negativkontrolle. (C), (D) HEK-Zellen wurden entsprechend mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L, 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK, 150 ng der RhoGEF-kodierenden Plasmide, 50 ng cGKI- α -Plasmid und bis zu 200 ng Leervektor transfiziert. Die Behandlung mit 1 μ M KT-5823, 100 μ M Rp-8-pCPT-cGMP bzw. 1 μ M H-89 erfolgte für 48 h bzw. mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP für 24 h. (E) HEK-Zellen wurden mit 1,5 μ g RhoGEF17-ΔN-Plasmid bzw. Leervektor transfiziert und entsprechend mit 1 μ M KT-5823 für 24 h behandelt. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. Die Expression des RhoGEFs wurde mit dem entsprechenden Antikörper überprüft.

5.2.9 Einfluss der cGKI- α -Phosphorylierungsstelle SS1330/1331 auf die Aktivierung des Volllängenproteins RhoGEF17

Nach Rückklonierung des entsprechenden Mutations-tragenden Abschnitts in die Volllängen-cDNA-Sequenz, wurde zunächst der Einfluss dieser neu generierten RhoGEF17-SS1330/1331AA-Mutante auf die SRF-Aktivierung untersucht (Abb. 25 A). Im direkten Vergleich mit Wildtyp-RhoGEF17 zeigte sich, dass auch hier die Mutation, vergleichbar wie bei der N-terminal trunkierten Variante, zu einer Zunahme von dessen Basalaktivität führte. Interessanterweise war auch bei dieser Mutante kein Ansprechen auf cGMP/cGKI- α mehr detektierbar, trotz des noch vorhandenen, zur Stimulation benötigten Serins 43. Im Gegensatz dazu erwies sich eine äquivalente phosphomimetische RhoGEF17-S1331E-Mutante nach wie vor als vollkommen sensitiv gegenüber der cGKI- α . Dieser Befund konnte auch im Pulldown-Experiment bestätigt werden (Abb. 25 B).

A

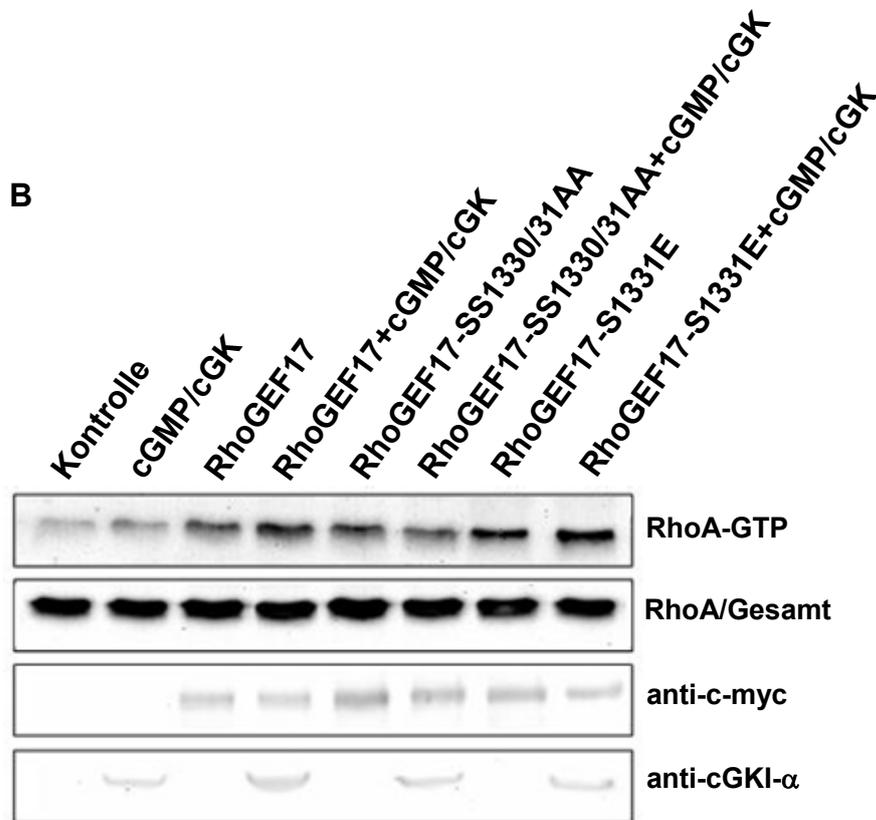


Abb. 25: Untersuchungen zur Aktivierbarkeit der phosphomimetischen bzw. phosphoresistenten RhoGEF17-SS1330/1331-Varianten. (A) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L, 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK, 150 ng des entsprechenden RhoGEF-kodierenden Plasmids, 50 ng cGKI- α -Plasmid und bis zu 200 ng Kontrollvektor kotransfiziert und nach 24 h für 24 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ($n=6$) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten, unstimulierten Zellen. (B) HEK-Zellen wurden mit 750 ng Plasmid-DNA für das entsprechende RhoGEF und 750 ng cGKI- α -Vektor bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP behandelt. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. Die Expression der jeweiligen RhoGEFs und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft.

Zusammenfassend weisen die mittels Mutationsstudien erzielten Ergebnisse darauf hin, dass es für die cGMP/cGKI- α induzierte RhoGEF17-Aktivierung zumindest der Phosphorylierung der Serine 43 und 1331 bedarf, wobei die Phosphorylierung an Position 1331 obligate Voraussetzung für die Phosphorylierung des Serins 43 und somit der Aktivierung von RhoGEF17 zu sein scheint.

5.2.10 Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP/cGKI- α vermittelte Hemmung der Serum-induzierten RhoA-Aktivierung

Die Mehrzahl der bis dato publizierten Erkenntnisse bezüglich der cGMP-abhängigen Regulation der RhoA-Aktivierung, sowie RhoA-mediierter Signaltransduktionsprozesse stehen im Widerspruch zu den bislang hier beschriebenen Ergebnissen. So wurde z. B. gezeigt, dass cGMP die Serum-induzierte RhoA-Aktivierung in bovinen, glattmuskulären Zellen der Aorta (BoASMC) zu inhibieren vermochte (Gudi *et al.*, 2002). Um nun auszuschließen, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten, beruhend auf Untersuchungen in HEK-Zellen, auf einer grundsätzlich gegenläufigen und somit möglicherweise artifiziellen Regulation von RhoA durch cGMP beruht, wurden diese Zellen zunächst entweder mit einem Kontrollplasmid oder dem cGKI- α -Plasmid transfiziert und anschließend mit 10 % Serum stimuliert (Abb. 26). Wie schon bereits von einer anderen Gruppe (Diviani *et al.*, 2004) für HEK-Zellen gezeigt werden konnte, führte auch in dieser Arbeit die Stimulation mit Serum zu einer RhoA-Aktivierung. Diese konnte vergleichbar wie in BoASMCs durch Koapplikation von cGMP in cGKI- α überexprimierenden Zellen inhibiert werden, während in Anwesenheit von RhoGEF17 auch in Serum-stimulierten Zellen nach wie vor eine cGMP/cGKI- α -vermittelte RhoA-Aktivierung zu beobachten war.

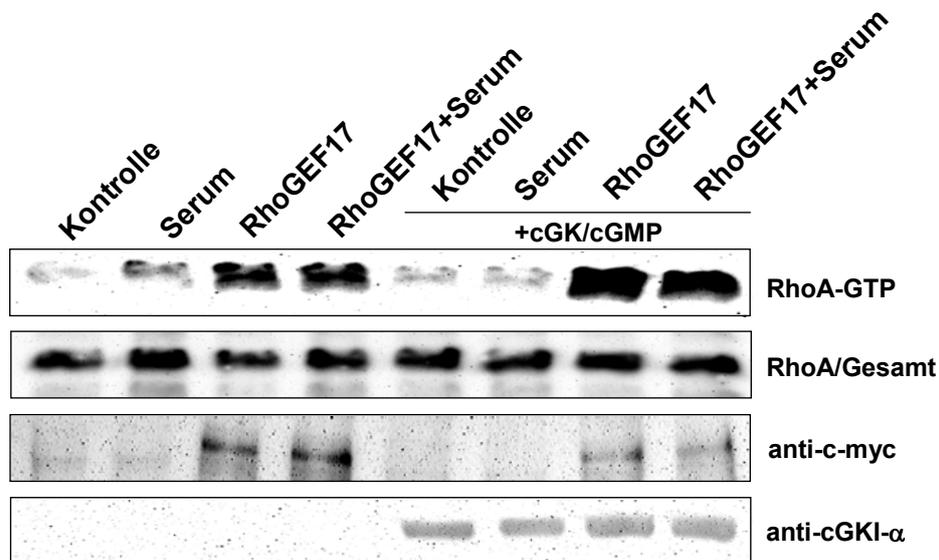


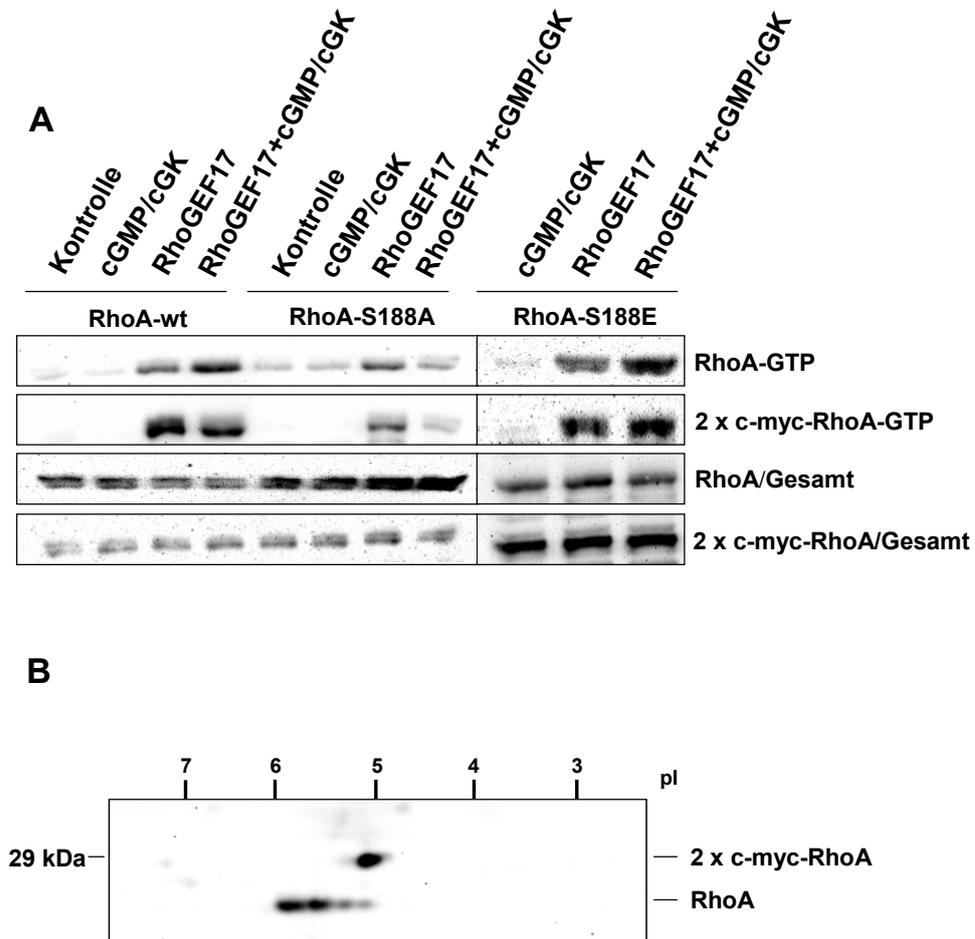
Abb. 26: Einfluss von RhoGEF17 auf die cGMP/cGKI- α vermittelte Hemmung der Serum-induzierten RhoA-Aktivierung. HEK-Zellen wurden entsprechend mit 750 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 bzw. 750 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und für 48 h mit 0,5 %igem fötalem Kälberserum bzw. nach 24 h für 24 h mit 10 %igem nicht hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum sowie nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. Die Expression des RhoGEFs und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft.

5.2.11 Einfluss der Phosphorylierung von RhoA auf dessen Aktivierung durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α

Auch die in dieser Arbeit beschriebene kooperative, durch cGKI- α /RhoGEF17-induzierte SRF-Aktivierung wirft im Hinblick auf die aktuelle Literatur kritische Fragen auf. So wurde mehrfach beschrieben, dass RhoA selbst ein Zielmolekül der cGMP-abhängigen Phosphorylierung darstellt und dies zu einer vermehrten Sequestrierung des RhoAs durch RhoGDI-Proteine führt (Lang *et al.*, 1996; Kwak & Uhlinger, 2000; Sawada *et al.*, 2001; Forget *et al.*, 2002; Ellerbroek *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Durch diesen Vorgang wird die RhoA-abhängige Aktivierung von Effektoren, wie z. B. den Rho-Kinasen (ROCK) unterdrückt und somit entsprechende zelluläre und physiologische Vorgänge inhibiert. Um nun herauszufinden, ob RhoGEF17 in der Lage ist phosphoryliertes RhoA zu aktivieren und unabhängig vom Phosphorylierungsgrad RhoA-Effektoren zu stimulieren, wurde die Aktivierbarkeit verschiedener RhoA-Mutanten untersucht. Neben dem N-terminal 2 x c-myc-getaggten Wildtyp-RhoA, wurde die phosphomimetische RhoA-S188E-, sowie die Phosphorylierungs-resistente RhoA-S188A-Mutante verwendet (Ellerbroek *et al.*, 2003). Wie aus Abbildung 27 A ersichtlich wird, konnte kein Unterschied in der RhoGEF17-vermittelten Aktivierung der drei verschiedenen RhoA-Varianten nachgewiesen werden. Endogenes RhoA wurde in diesen Zellen ebenfalls aktiviert. Überraschenderweise hatte die zusätzliche Expression der cGKI- α plus Stimulation mit cGMP keinen Effekt mehr auf die RhoGEF17-vermittelte Aktivierung des überexprimierten Wildtyp-RhoAs, aber noch immer auf die Aktivierung von endogenem RhoA. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Auswirkung des Zusammenspiels von Kinase und RhoGEF auf das überexprimierte phosphomimetische RhoA-S188E nachgewiesen werden. Die Analyse von endogenem RhoA und dem 2 x c-myc-getaggten Wildtyp-RhoA in der zweidimensionalen Gelelektrophorese lieferte eine mögliche Erklärung für diesen Befund (Abb. 27 B). So zeigte sich, dass endogenes RhoA ($pI=5,83$; mit Expsy berechnet) wie bereits beschrieben (Cicha *et al.*, 2004) in Gegenwart von cGKI- α und 8-pCPT-cGMP phosphoryliert ($pI=5,56$ 1x phosphoryliert; mit Expsy berechnet) und posttranslational modifiziert ($pI=5,3$ bzw. $5,1$) vorlag, wohingegen der 2 x c-myc-getaggte Wildtyp-RhoA ($pI=5,11$) anscheinend weder phosphoryliert noch posttranslational modifiziert wurde. Dies würde bedeuten, dass, zumindest in Anwesenheit der aktiven cGKI- α , RhoGEF17 bevorzugt phosphoryliertes RhoA aktiviert. Es ist hingegen jedoch unklar, warum sich die Koexpression der cGKI- α negativ auf die RhoGEF17-induzierte Stimulation der Phosphorylierungs-resistenten RhoA-S188A-Mutante auswirkt.

Mit diesem experimentellen Ansatz konnte zwar gezeigt werden, dass RhoGEF17 in der Lage ist RhoA unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus zu aktivieren, jedoch wurde damit nicht geklärt, ob die beobachtete SRF-Aktivierung tatsächlich auf der Übertragung des Signals durch das phosphorylierte RhoA beruht oder vielmehr von verbleibendem, nicht-phosphoryliertem RhoA bewerkstelligt wird. Zur Klärung dieser Frage wurden HEK-Zellen sowohl mit den verschiedenen RhoA-Varianten als auch mit RhoGEF17 transfiziert und deren Einfluss auf die transkriptionelle

Aktivierung des SRFs untersucht. Hierbei zeigte sich eindeutig, dass alle drei RhoA-Varianten in der Lage sind SRF zu aktivieren und in Verbindung mit RhoGEF17 diese Aktivierung synergistisch gesteigert wurde (Abb. 27 C).



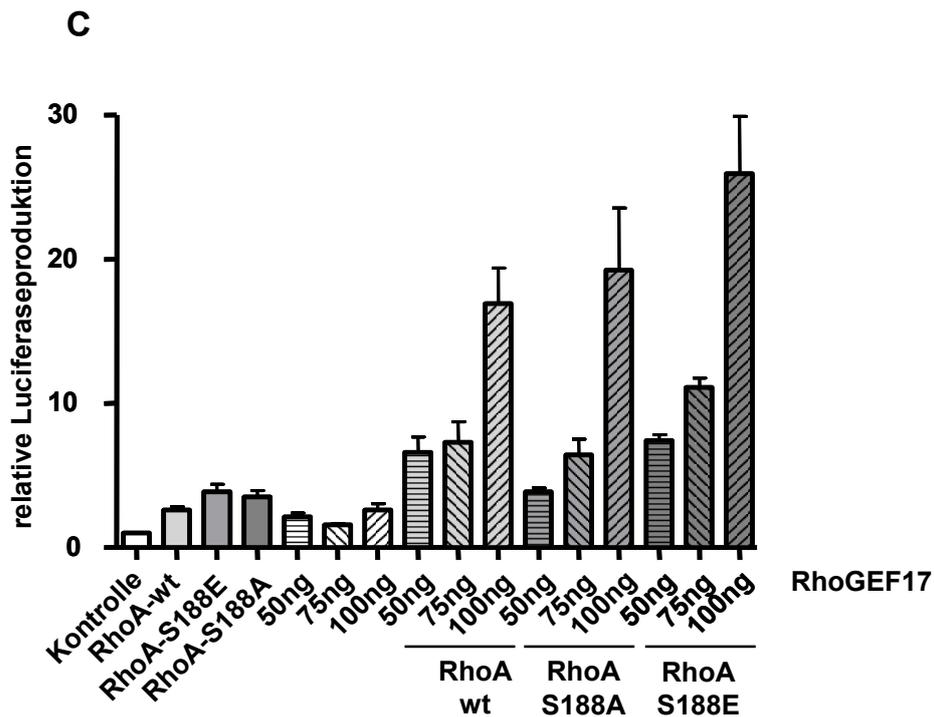


Abb. 27: Einfluss der RhoA-Phosphorylierung auf dessen Aktivierbarkeit durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α . (A) HEK-Zellen wurden mit 600 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17, 600 ng cGKI- α -Vektor und mit 300 ng Plasmid-DNA der entsprechenden RhoA-Variante (die entsprechenden Mutagenese-Primer sind in 4.1.7 aufgelistet) bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge von endogenem und der entsprechenden 2 x c-myc-getaggten RhoA-Mutanten in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. (B) HEK-Zellen wurden mit 10 μ g Plasmid-DNA für cGKI- α und mit 10 μ g Plasmid-DNA für Wildtyp-RhoA kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert, anschließend wurden die Zellen mit 500 μ L Lysepuffer abgeschabt und die Zelllysate bei -20°C ü. N. eingefroren. Für die IEF wurde ein 7 cm IEF-Streifen (Immobiline DryStrip, pH 3-10, linear, Fa. GE Healthcare) mit 100 μ L Proteinlysate beladen und in einer Nasskammer ü. N. aufgequollen. Die Fokussierung erfolgte in einem Ettan IPGphor (GE Healthcare) nach dem in Tabelle 7 (siehe 4.4.9, Seite 57) aufgeführten Programm. Nachweis von endogenem und 2 x c-myc-getaggttem Wildtyp-RhoA nach einer 15 %igen SDS-PAGE im Immunoblot mittels eines anti-RhoA-Antikörpers. (C) HEK-Zellen wurden mit 43 ng Reporterplasmid pSRE.L und 7 ng Kontroll-Plasmid pRL-TK sowie entsprechend mit 25 ng Plasmid-DNA für Wildtyp-RhoA, 50 ng Plasmid-DNA für RhoA-S188A und 50 ng Plasmid-DNA für RhoA-S188E sowie entsprechend mit ansteigenden Konzentrationen 50 ng, 75 ng und 100 ng RhoGEF17-Plasmid bzw. bis zu 200 ng Leervektor kotransfiziert und für 48 h inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte (n=8) \pm SEM, ausgedrückt als Vielfaches der Luciferase-Bildung von Kontrollvektor-transfizierten Zellen.

5.2.12 Regulation von RhoGEF17 durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus über ROCK

Die Serin/Threonin-spezifischen Rho-Kinasen I und II (ROCKI und ROCKII) sind wichtige Effektoren von RhoA-C (Ishizaki *et al.*, 1996; Sahai & Marshall, 2002) und im Gegensatz zum SRF werden sie direkt durch die Rho-Proteine aktiviert. Um auszuschließen, dass die hier beschriebene cGKI- α /RhoGEF17-vermittelte Stimulation des SRFs auf einer unbekanntem Interferenz des cGMPs mit Mediatoren des RhoA-SRF-Signalwegs beruht, wurde zusätzlich die Aktivierung der ROCK untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl cGMP/cGKI- α sowie RhoGEF17 eine minimale Steigerung der ROCK-Aktivität induzieren konnten, welche jedoch durch die Kombination von RhoGEF17 mit cGMP/cGKI- α überadditiv gesteigert wurde. Die Behandlung der Zellysate mit Y-27632, einem ROCK-Inhibitor (Ishizaki *et al.*, 2000), führte zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der durch RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α gesteigerten ROCK-Aktivität (Abb. 28).

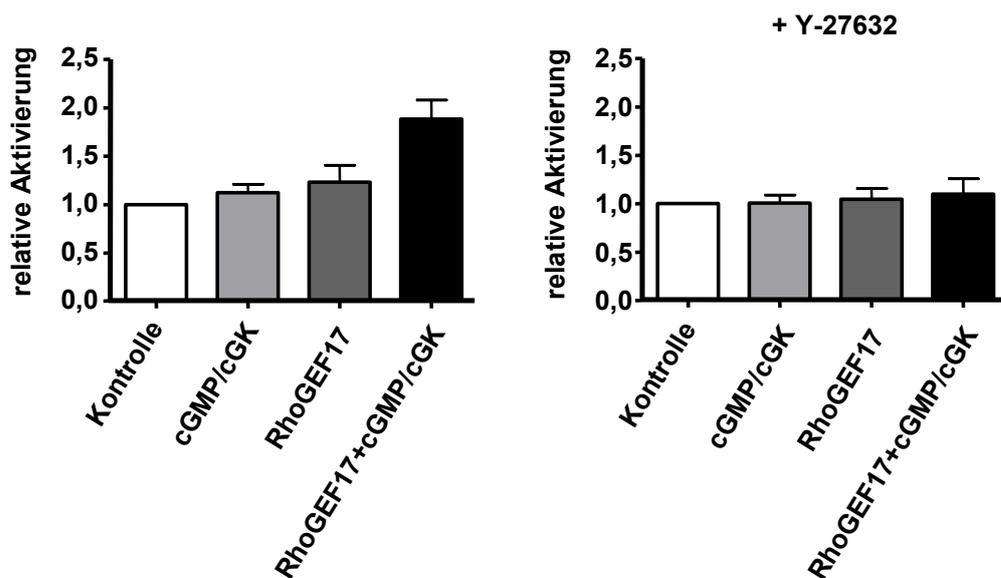


Abb. 28: Nachweis der cGKI- α /RhoGEF17-abhängigen ROCK-Aktivierung. HEK-Zellen wurden entsprechend mit 750 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 und 750 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert. Für die ROCK-Aktivitäts-Messung wurden jeweils 300 ng Proteinlysate eingesetzt und entsprechend für 30 min mit 10 μ M Y-27632 behandelt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die RhoA-abhängige ROCK-Aktivierung Einfluss auf die Aktivität von RhoGEF17 nimmt. Dazu wurde ein Pulldown-Assay unter Verwendung der ROCK-Inhibitoren Y-27632 und H-1152P durchgeführt. Wie aus Abbildung 29 A und B ersichtlich, wurde die basale RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung weder durch Y-27632 noch durch H-1152P beeinflusst. Jedoch zeigte sich, dass die synergistische cGKI- α /RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung durch die Inhibition der ROCK vollständig aufgehoben wurde. Dies konnte

sowohl mit dem weniger potenten und selektiven Inhibitor Y-27632 (K_i 0,15 μM), als auch mit dem wirksameren und spezifischeren Inhibitor H-1152P (K_i 0,006 μM) (Sasaki *et al.*, 2002) beobachtet werden (Abb. 29 A, B). H-1152P hemmte die cGKI- α /RhoGEF17 induzierte RhoA-Aktivierung bereits in einer Konzentration von 1 nM nahezu vollständig (Abb. 29 B).

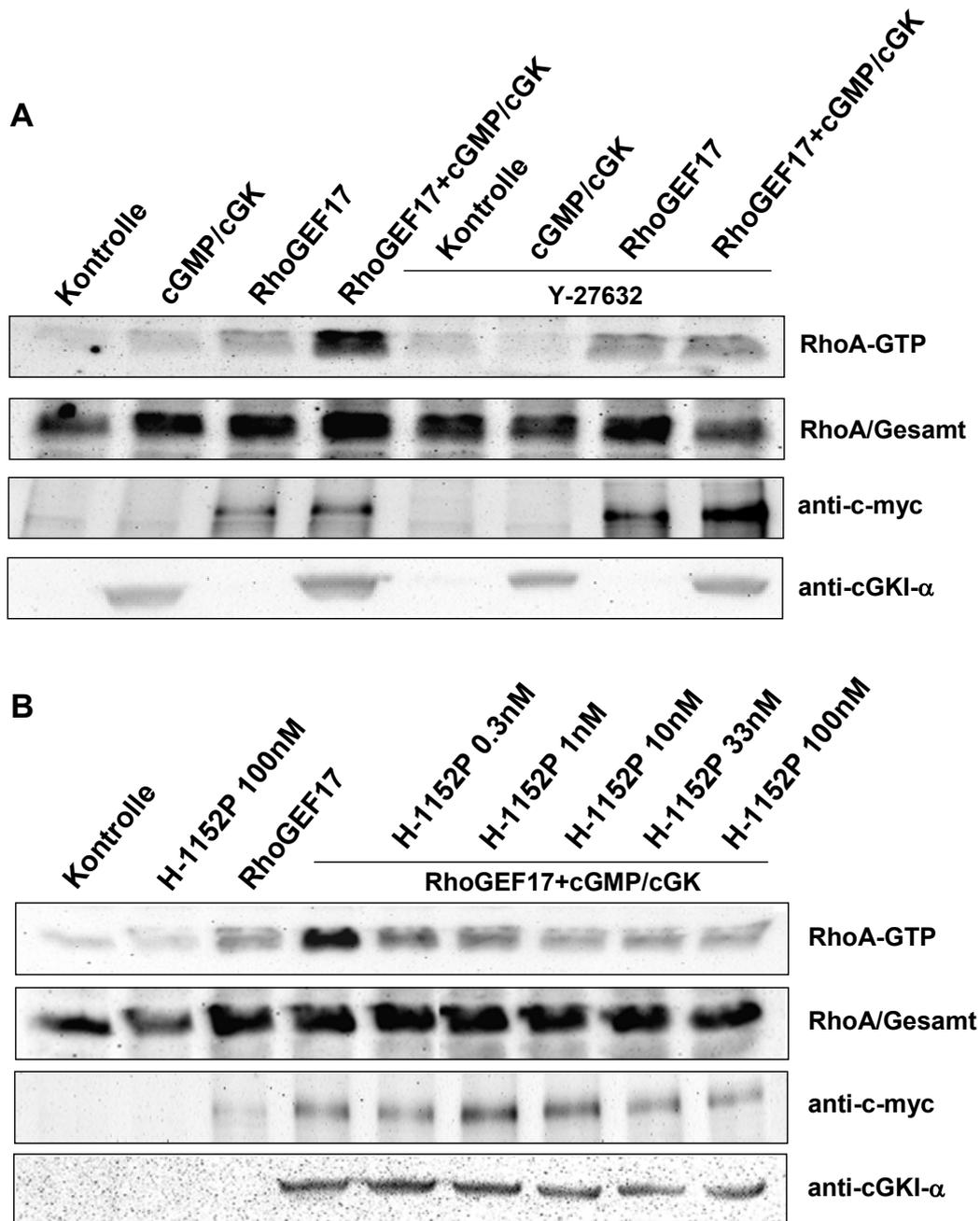
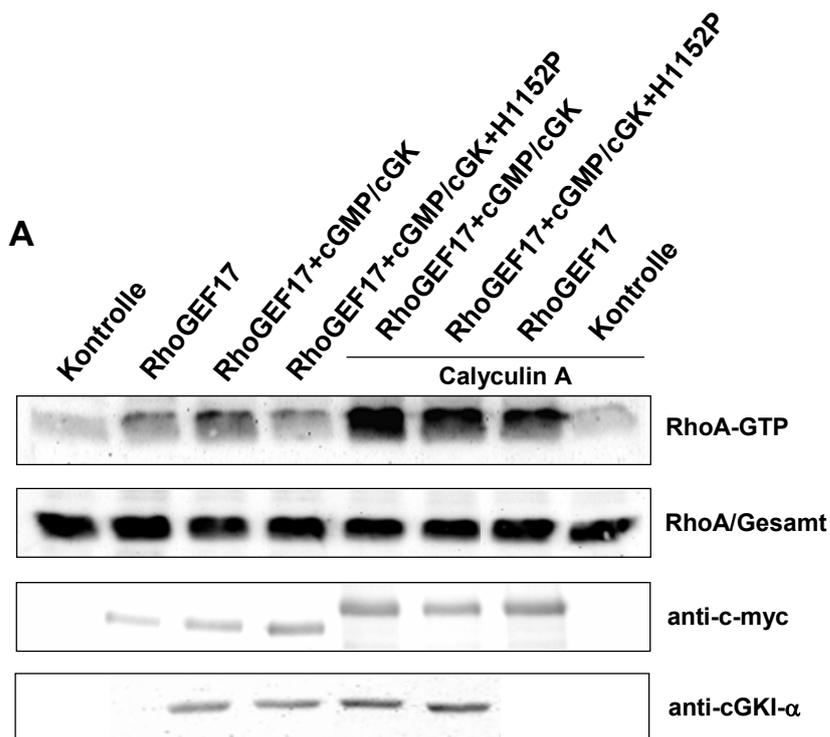


Abb. 29: Einfluss der ROCK-Inhibitoren Y-27632 und H-1152P auf die cGKI- α /RhoGEF17-vermittelte RhoA-Aktivierung. (A) HEK-Zellen wurden mit 750 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 sowie 750 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μg Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μM 8-pCPT-cGMP und nach 47 h für 1 h mit 10 μM Y-27632 behandelt. (B) Alternativ wurden die transfizierten Zellen nach 46 h für 2 h mit 100 μM 8-pCPT-cGMP und nach 47 h mit 0,3 nM, 1 nM, 10 nM, 33 nM bzw. 100 nM H-1152P für 1 h behandelt. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel je 40 μg der Zelllysate analysiert. Die Expression von RhoGEF17 und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft.

Die Beteiligung der ROCK an der cGKI- α /RhoGEF17-vermittelten RhoA-Aktivierung war zunächst überraschend. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass die ROCK direkt ihren stimulatorischen Einfluss auf den Aktivierungsmechanismus nimmt oder dies indirekt über die Aktivierung anderer Kinasen, bzw. über die Inhibition von Phosphatasen, bewerkstelligt. Da bekanntermaßen eine zentrale Rolle der ROCK darin besteht, die Myosin-bindende Untereinheit der leichten Myosinketten-Serin/Threonin-Phosphatase (MYPT1) zu inhibieren (Hartshorne, 1998; Kawano *et al.*, 1999), wurde zunächst untersucht, ob die Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitoren Okadainsäure und Calyculin A einen Einfluss auf die unterdrückte RhoGEF17- und cGMP/cGKI- α -abhängige RhoA-Aktivierung nehmen. Die Anwesenheit von Calyculin A alleine führte zu einer gesteigerten RhoGEF17-abhängigen RhoA-Aktivierung, welche durch cGMP/cGKI- α noch weiter erhöht werden konnte. Diese Zunahme war aber zum Teil noch sensitiv gegenüber H-1152P (Abb. 30 A). In Gegenwart beider Phosphatase-Inhibitoren, hatte H-1152P keinen Einfluss mehr auf die RhoGEF17 und cGMP/cGKI- α -abhängige RhoA-Aktivierung (Abb. 30 B).



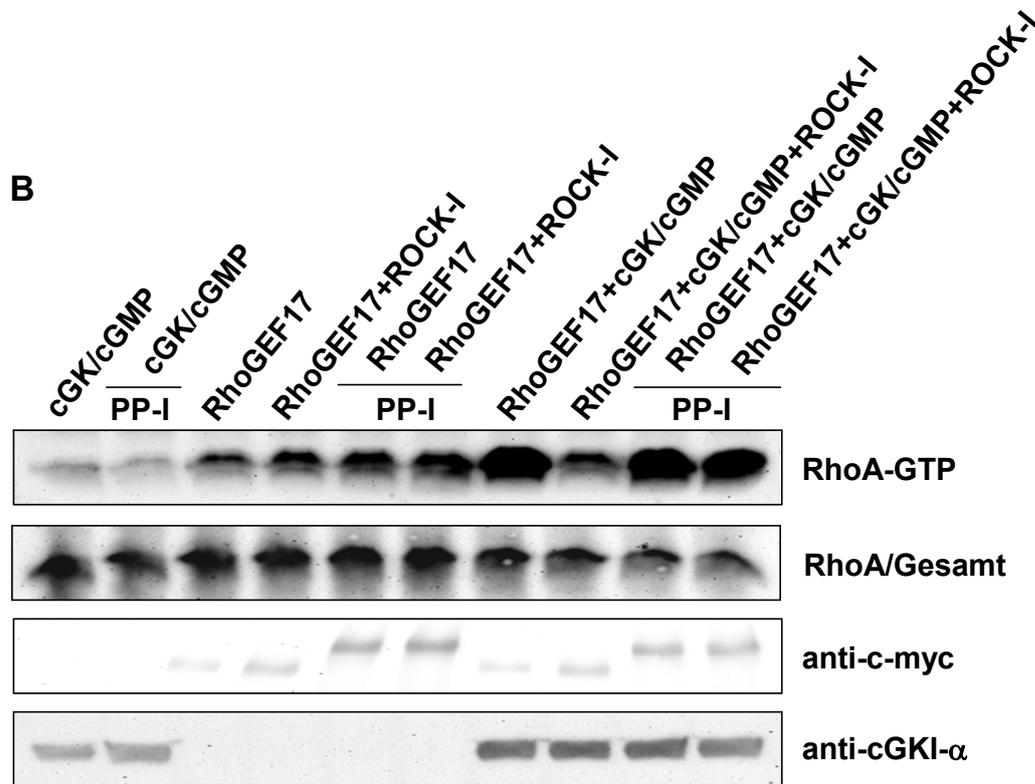


Abb. 30: Untersuchungen zur Beteiligung von Serin/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen an der ROCK-vermittelten Rückkopplung des RhoGEF17-Signalwegs. (A) HEK-Zellen wurden mit 750 ng Plasmid-DNA für RhoGEF17 sowie 750 ng Plasmid-DNA für cGKI- α bzw. bis zu 1,5 μ g Leervektor kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP sowie nach 47 h für 1 h entsprechend mit 10 nm H-1152P bzw. nach 47,5 h für 30 min mit 50 nM Calyculin A behandelt. (B) HEK-Zellen wurden äquivalent zu (A) kotransfiziert und nach 46 h für 2 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP stimuliert sowie nach 47 h entsprechend mit 10 nm H-1152P für 1 h bzw. nach 47,5 h mit 50 nM Calyculin A plus 100 nM Okadainsäure für 30 min behandelt. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert. Die Expression von RhoGEF17 und der cGKI- α wurde mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. Abkürzung: PP-I (Proteinphosphatase-Inhibitoren: Calyculin A und Okadainsäure)

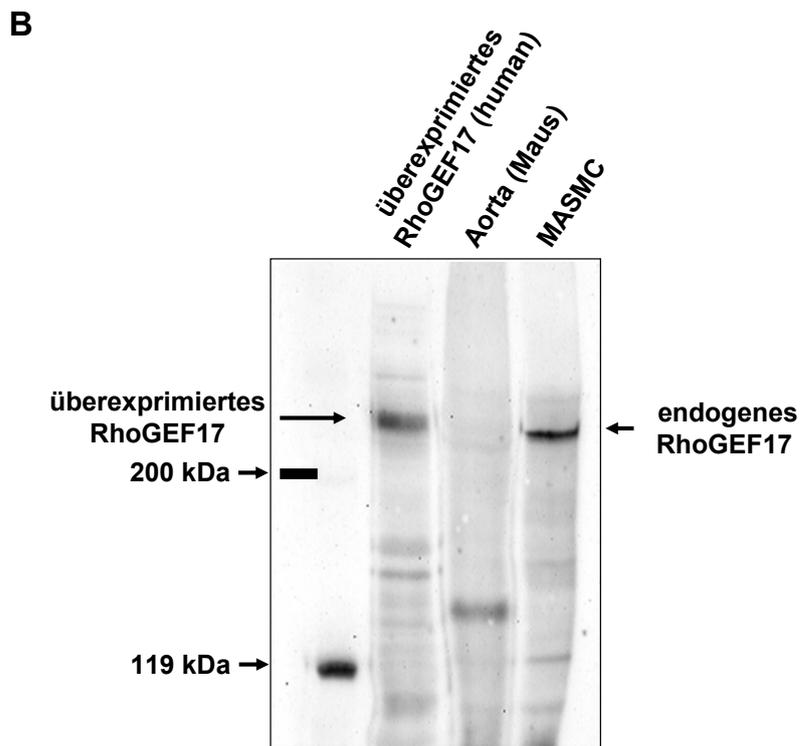
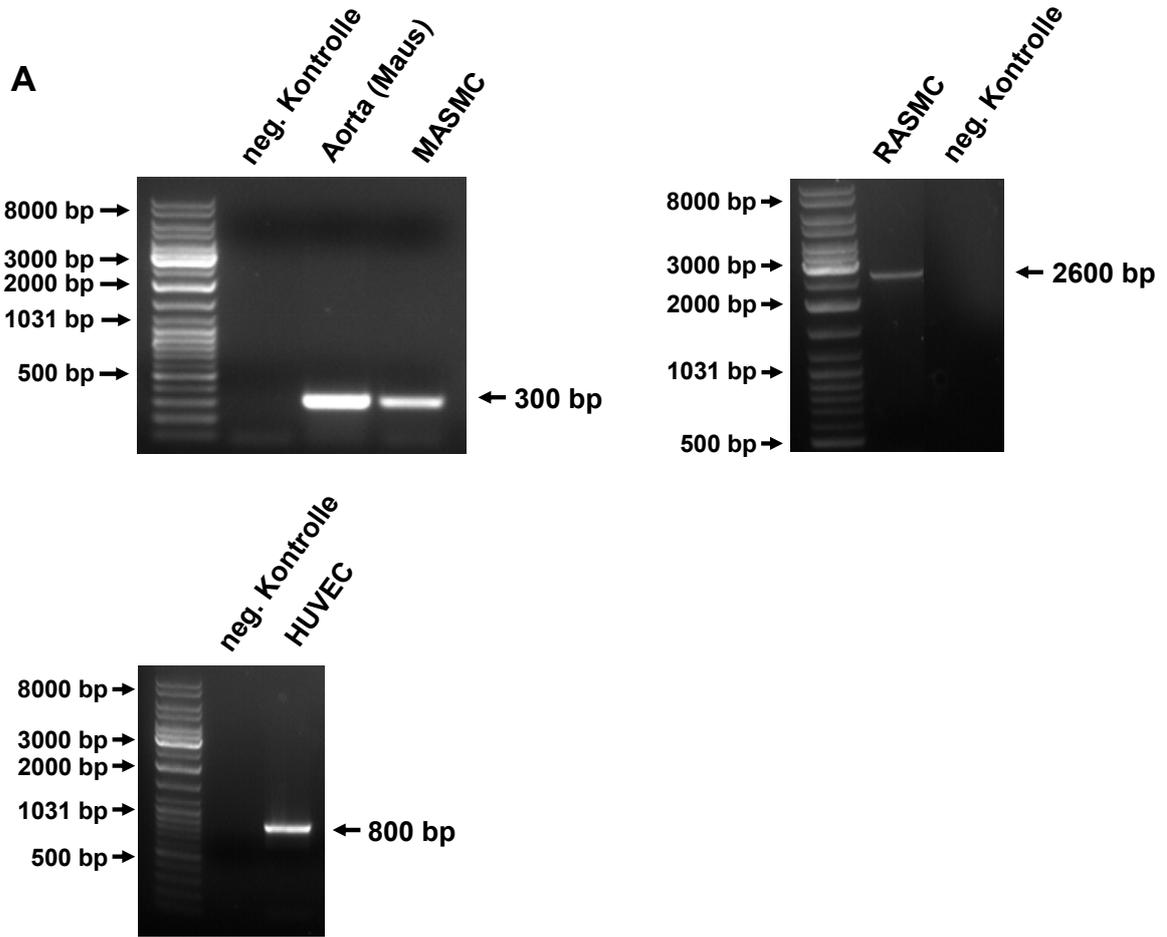
Die in diesem sowie im vorherigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass RhoGEF17 für einen „Schaltermechanismus“ verantwortlich ist, der die Inhibition der RhoA-Aktivierung durch den cGMP/cGKI- α -abhängigen Signalweg in eine Aktivierung von RhoA bzw. SRF umkehrt. Des Weiteren legen die Ergebnisse nahe, dass phosphoryliertes RhoA in Gegenwart von RhoGEF17 funktionell aktiv ist und für die RhoGEF17- und cGMP/cGKI- α -abhängige RhoA-Aktivierung erforderlich ist. Zusätzlich legen die hier gezeigten Daten nahe, dass die cGKI- α /RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung einem positiven Rückkopplungsmechanismus unterliegt, welcher von einer ROCK-vermittelten Inhibition einer Serin/Threonin-Proteinphosphatase getragen wird.

5.3 Vaskuläre RhoA-Aktivierung durch RhoGEF17

Die von Rumenapp und Mitarbeitern (Rumenapp *et al.*, 2002) durchgeführte Northern Blot-Analyse zur Transkription des RhoGEF17-Gens wies darauf hin, dass dieses RhoGEF anscheinend vorwiegend in gefäßreichen Geweben exprimiert wird. Deshalb sollte im Folgenden die Expression von RhoGEF17 mittels RT-PCR, Immunoblot und immunhistologischen Methoden speziell in Gefäßen und Primärzellen des Gefäßsystems untersucht werden.

5.3.1 Expression von RhoGEF17 in glattmuskulären Zellen der Aorta von Ratte und Maus

Mit Hilfe der RT-PCR konnte das Vorkommen der mRNA für RhoGEF17 in isolierten, glattmuskulären Zellen der thorakalen Aorten der Maus (MASMC), der Ratte (RASMC) sowie in humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) nachgewiesen werden (Abb. 31 A). Um die Expression der Translation und damit die Expression des Proteins zu verifizieren wurde ein Immunoblot mit einem anti-RhoGEF17-spezifischen Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 31 B zu erkennen ist, detektierte der anti-RhoGEF17-Antikörper sowohl in MASMC als auch in RASMC ein Protein dessen Molekulargewicht ca. 220 kDa betrug und das etwas kleiner war als das rekombinant-exprimierte, c-myc-getaggte menschliche RhoGEF17. Die cDNA, die für das RhoGEF17-Protein der Ratte kodiert, weist einen offenen Leserahmen von 6159 bp auf, welcher für ein putatives 2053 Aminosäure-großes Protein kodiert. Der offene Leserahmen der entsprechenden cDNA-Sequenz der Maus besteht aus 6171 bp und kodiert für ein putatives 2057 Aminosäure-großes Protein. Aus den beiden Sequenzen lässt sich jeweils ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 221 kDa berechnen. Wahrscheinlich aufgrund der geringen Expression war das Protein im Gesamtlysat der Mousaorta nicht mehr nachweisbar.



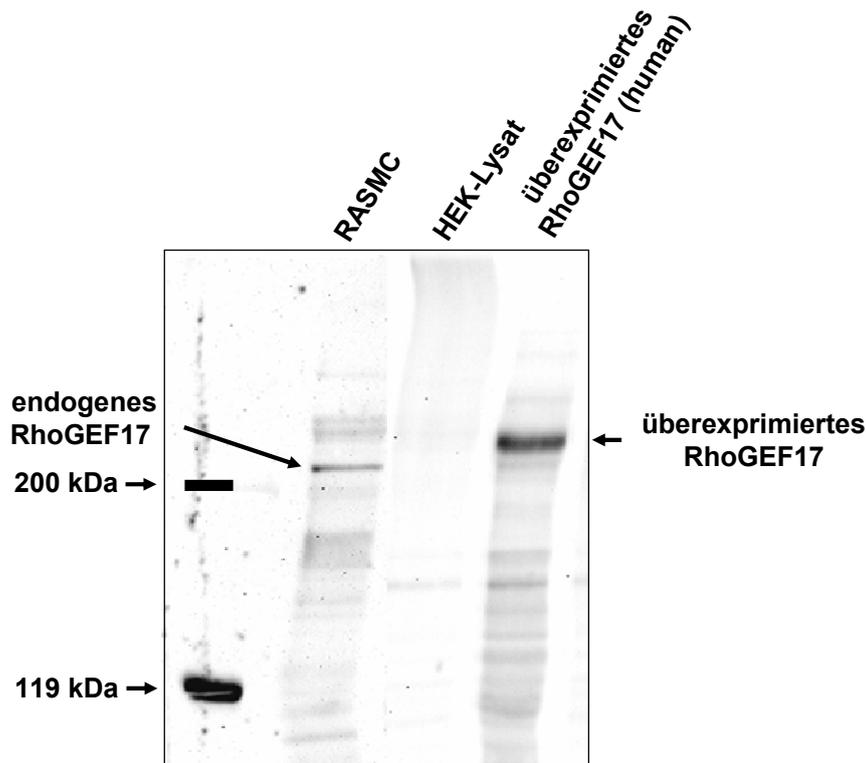


Abb. 31: Detektion von endogenem RhoGEF17 in isolierten, glattmuskulären thorakalen Zellen der Aorta von Ratte und Maus. (A) RT-PCR mit RNA aus isolierten, glattmuskulären thorakalen Zellen der murinen Aorta (MASMC), der Rattenaorta (RASMC) bzw. HUVEC. Für die RT-PCR wurden die in 4.1.7 aufgeführten Primer RhoGEF17-Maus-3151-for, RhoGEF17-Maus-3436-rev, RhoGEF17-Ratte-3636-for, RhoGEF17-Ratte-6200-rev, RhoGEF17-5302-for und RhoGEF17-6108-rev verwendet. (B) Nachweis von RhoGEF17 in MASMC bzw. RASMC mittels des anti-RhoGEF17-spezifischen Antikörpers im Immunoblot. Als Kontrolle diente in beiden Fällen das in HEK-Zellen überexprimierte, rekombinante, c-myc getaggte humane RhoGEF17.

Um die Expression von RhoGEF17 in Gewebe nachzuweisen, wurden histologische Schnitte der thorakalen Rattenaorta durchgeführt (Dr. Martin Thomas, persönliche Mitteilung) und das RhoGEF17-Protein mit Hilfe des spezifischen Antikörpers detektiert. Wie in Abbildung 32 zu erkennen ist, wird RhoGEF17 sowohl im glattmuskulären Gewebe als auch im Endothel exprimiert. Um eine eventuelle Kolo-kalisation mit der cGKI zu überprüfen, wurden entsprechende Schnitte mit einem anti-cGKI-Antikörper gefärbt. In Übereinstimmung mit der Literatur, konnte die cGKI überwiegend im glattmuskulären Gewebe und nur zu einem sehr geringen Teil im Endothel nachgewiesen werden (Abb. 32). Als Kontrolle diente in beiden Fällen eine Färbung mit dem Zweitantikörper alleine.

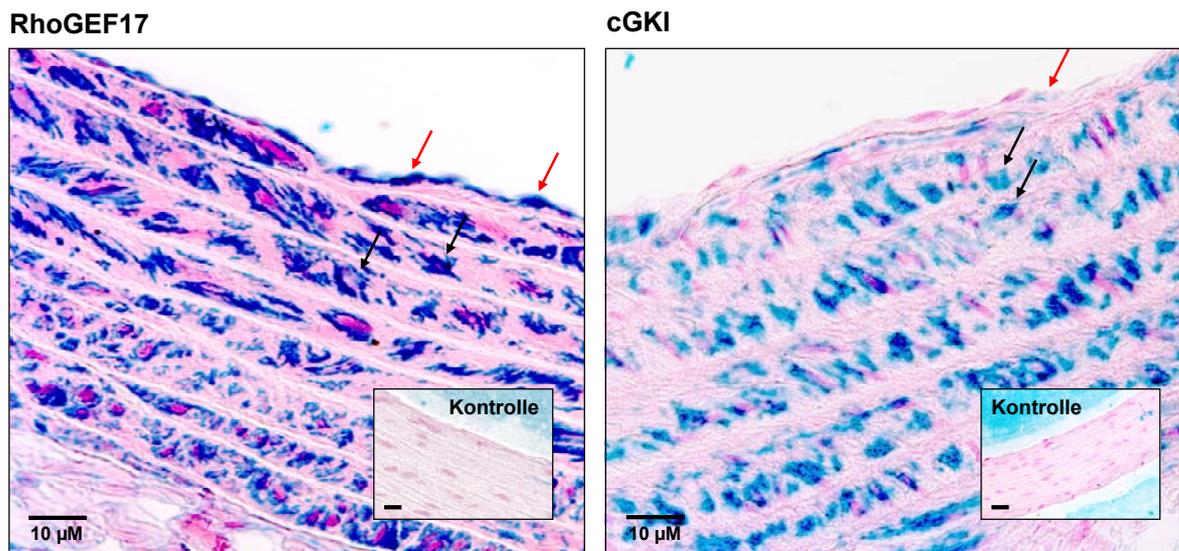


Abb. 32: Immunhistologische Färbungen von thorakalen Aorten-Paraffinschnitten der Ratte. Linkes Bild: 1. Antikörper: anti-RhoGEF17 (1:1000; 1 h Inkubation). Rechtes Bild: 1. Antikörper: anti-cGKI (1:50, 1 h Inkubation). Als Zweitantikörper wurde jeweils anti-Kaninchen verwendet (1:200; 30 min Inkubation). Schwarzer Pfeil: glattmuskuläres Gewebe; roter Pfeil: Endothel. Inset: Kontrollfärbungen nur mit dem Zweitantikörper. Maßstab: 10 µM

5.3.2 Einfluss der Überexpression von RhoGEF17-ΔN und der cGMP-Stimulation auf die RhoA-Aktivierung in RASMC

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Behandlung der primären RASMC mit 8-pCPT-cGMP bzw. 8-Bromo-cGMP auf die RhoA-Aktivierung auswirkt und ob eine mögliche Beteiligung von RhoGEF17 an einer cGMP-induzierten RhoA-Aktivierung nachweisbar ist. Zunächst wurden RASMC für unterschiedliche Zeiten mit beiden cGMP-Analoga inkubiert und die RhoA-Aktivierung mittels des Pulldown-Assays bestimmt. Wie in Abbildung 33 A dargestellt ist, induzierten beide cGMP-Analoga eine transiente RhoA-Aktivierung, die nach 30 min bereits ihr Maximum erreicht hatte und nach 3 h wieder deutlich abnahm.

Um zu überprüfen, ob RhoGEF17 auch in RASMC eine RhoA-Aktivierung induzieren kann, wurde die bereits beschriebene, konstitutiv aktive RhoGEF17-Mutante RhoGEF17-ΔN mit Hilfe eines rekombinanten Adenovirus überexprimiert (Abb. 33 B). In Übereinstimmung mit den in HEK-Zellen erhobenen Daten führte die Überexpression dieser Mutante zu einer deutlichen Aktivierung von RhoA, welche, ebenfalls in Übereinstimmung mit den Daten in HEK-Zellen (siehe Abb. 23 E und F, Seite 90), durch Inkubation mit 8-Bromo-cGMP beinahe vollständig aufgehoben wurde.

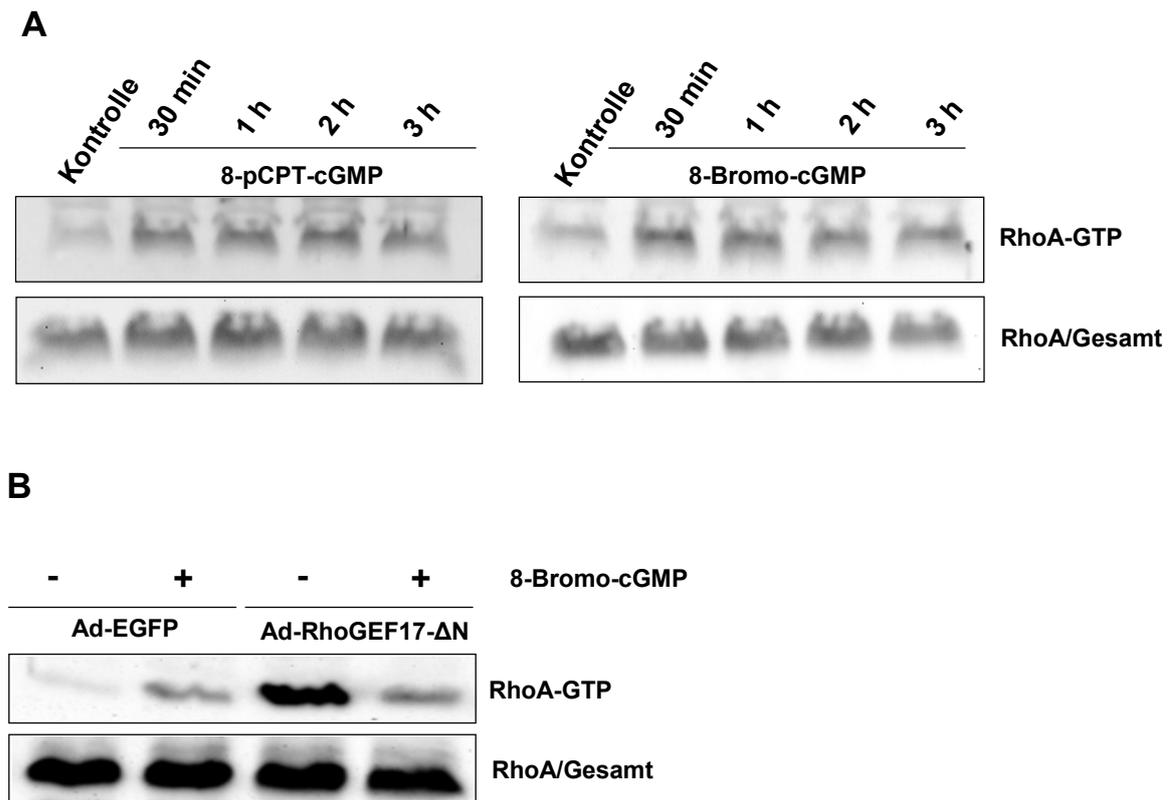


Abb. 33: cGMP- bzw. RhoGEF17- Δ N-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC. (A) RASMC wurden nach 45 h in serumreduziertem Medium (0,5 % FCS) für 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP bzw. mit 1 mM 8-Bromo-cGMP stimuliert. (B) RASMC wurden mit Adenoviren, die für EGFP bzw. RhoGEF17- Δ N kodieren, mit einer MOI von 150 infiziert (Infektionseffizienz etwa 80 %) und nach 46 h für 2 h mit 1 mM 8-Bromo-cGMP stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert.

5.3.3 RhoGEF17- Δ N induzierte Stressfaserbildung in RASMC und HUVEC

Da aktiviertes RhoA bekanntermaßen Stressfaserbildung in vaskulären Zellen induziert (Mack *et al.*, 2001; Fukata *et al.*, 2001), wurde der Einfluss von cGMP-Analoga und RhoGEF17- Δ N auf die Morphologie des Aktin-Zytoskeletts untersucht. Wie in Abbildung 34 A gezeigt, konnte in Kontroll (AdEGFP)-infizierten RASMC nach Stimulation mit 8-Bromo-cGMP eine deutliche Stressfaserbildung beobachtet werden. Ebenso führte die Expression von RhoGEF17- Δ N zu einer deutlichen Stressfaserbildung, die in Übereinstimmung mit den Daten zur RhoA-Aktivierung (siehe Abb. 23 E und F, Seite 90) bei Behandlung mit 8-Bromo-cGMP wieder abnahm (Abb. 34 A). Wie in Abbildung 34 B ersichtlich, führte die Infektion von HUVEC mit Ad-RhoGEF17- Δ N ebenfalls zu einer deutlichen Stressfaserbildung im Vergleich zu Ad-EGFP infizierten Zellen. Eine Behandlung mit 8-Bromo-cGMP in Ad-EGFP infizierten HUVEC hatte keinen Einfluss, wohingegen die Stressfaserbildung der mit Ad-RhoGEF17- Δ N infizierten HUVEC bei Applikation mit 8-Bromo-cGMP vergleichbar zu RASMC deutlich abnahm.

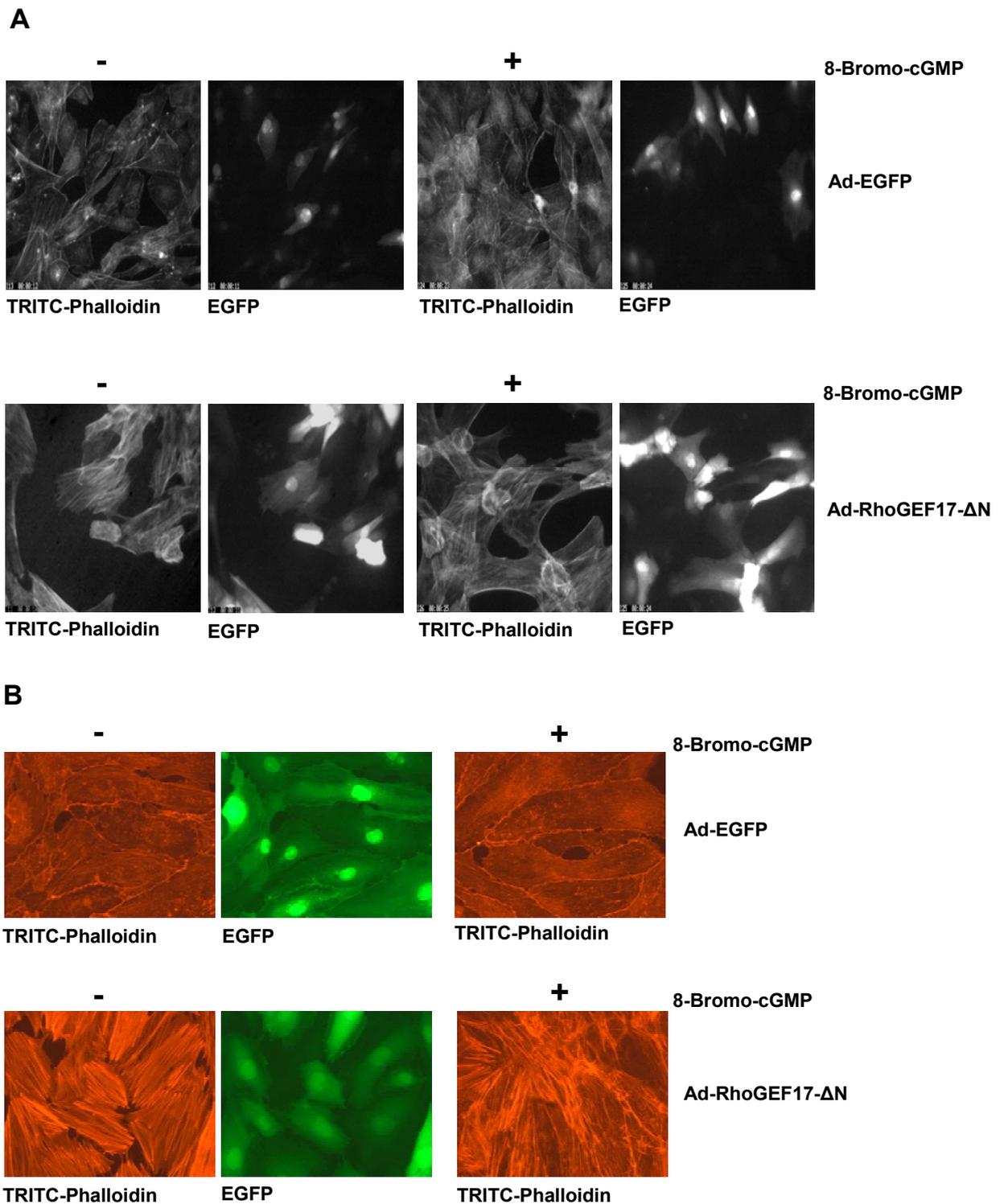
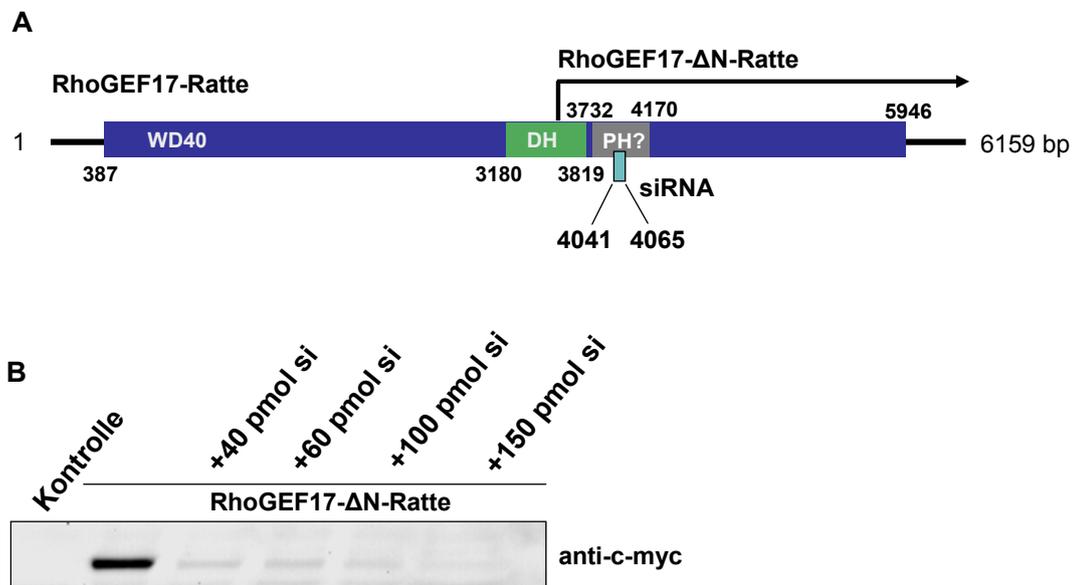


Abb. 34: Aktin-Zytoskelettfärbung in RASM C und HUVEC. (A) RASM C wurden mit Adenoviren, die für EGFP bzw. RhoGEF17-ΔN kodieren, mit einer MOI von 150 infiziert. Nach 46 h wurden die Zellen mit 1 mM 8-Bromo-cGMP für 2 h inkubiert. Die Färbung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte mit TRITC-Phalloidin (1 μg/μL). (B) HUVEC wurden mit Adenoviren, die für EGFP bzw. RhoGEF17-ΔN kodieren, mit einer MOI von 10 infiziert. Nach 46 h wurden die Zellen für 2 h mit 1 mM 8-Bromo-cGMP inkubiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-Phalloidin (1 μg/μL) gefärbt.

5.3.4 Einfluss der RhoGEF17-Depletion auf die cGMP-abhängige RhoA-Aktivierung in RASMC

Um zu untersuchen, ob die cGMP-induzierte RhoA-Aktivierung in RASMC durch endogenes RhoGEF17 hervorgerufen wird, wurde mittels eines siRNA-Design-Programms eine RhoGEF17-spezifische siRNA ermittelt (Abb. 35 A). Mit ihrer Hilfe sollte die endogene Expression von RhoGEF17 in RASMC supprimiert werden. Die Funktionalität der RhoGEF17-spezifischen siRNA wurde durch Kotransfektion von HEK-Zellen mit Plasmid-DNA für RhoGEF17- Δ N-Ratte bei steigenden Konzentrationen der siRNA im Immunoblot überprüft. Wie in Abbildung 35 B erkennbar, wurde die Expression des RhoGEF17- Δ N-Proteins der Ratte bereits bei einer siRNA-Menge von 40 pmol wirksam unterdrückt. Anschließend wurde basierend auf der siRNA-Sequenz ein Adenovirus hergestellt, der über die Produktion einer short-hairpin-RNA (shRNA) zur Generierung der entsprechenden siRNA in infizierten Zellen führte (Xia *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2003). Zur Kontrolle der Wirksamkeit der shRNA wurde vor der eigentlichen Generierung des Adenovirus der Einfluss des als Shuttle-Vektor dienenden Konstrukts pAdTrack-shRNA-RhoGEF17 auf die Expression von rekombinantem RhoGEF17- Δ N-Protein der Ratte in HEK-Zellen im Immunoblot überprüft. 72 h nach Transfektion war eine deutlich geringere Expression des RhoGEF17- Δ N-Proteins der Ratte in den Zellen zu beobachten, die mit pAdTrack-shRNA-RhoGEF17 kotransfiziert waren. Dieser Effekt war nach 96 h noch deutlich ausgeprägter (Abb. 35 C).



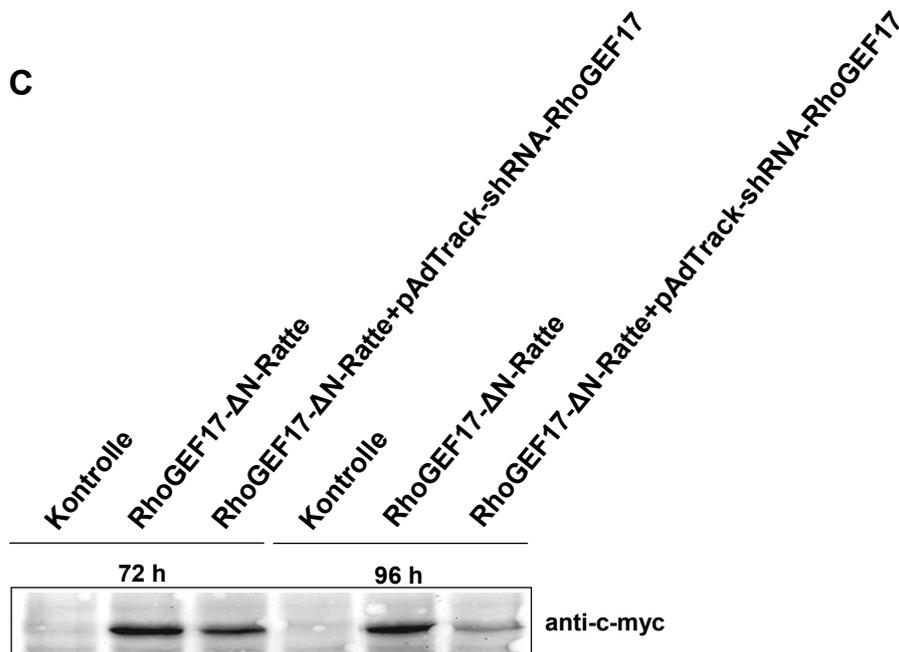


Abb. 35: Suppression der Expression von rekombinantem RhoGEF17-ΔN Ratte-Protein mittels RhoGEF17-spezifischer siRNA bzw. shRNA. (A) Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz (offener Leserahmen), die für das RhoGEF17-Protein der Ratte kodiert und Lokalisation der RhoGEF17-spezifischen siRNA-Sequenz (siRNA-Oligonukleotide sind in 4.1.8 aufgelistet). (B) Kotransfektion von HEK-Zellen mit 1 µg Plasmid-DNA für RhoGEF17-ΔN-Ratte sowie ansteigenden Mengen RhoGEF17-spezifischer siRNA (40 pmol, 60 pmol, 100 pmol und 150 pmol/750 µL). Nachweis von RhoGEF17-ΔN-Protein der Ratte nach 48 h im Immunoblot mit einem anti-c-myc-Antikörper. (C) Kotransfektion von HEK-Zellen entsprechend mit 0,4 µg Plasmid-DNA für RhoGEF17-ΔN-Ratte und 1,2 µg Plasmid-DNA für pAdTrackCMV-shRNA-RhoGEF17 bzw. mit 1,6 µg Kontrollvektor (shRNA-Oligonukleotide sind in 4.1.8 aufgelistet). Nach 72 h bzw. nach 96 h wurde im Immunoblot das RhoGEF17-ΔN-Protein der Ratte mit einem anti-c-myc-Antikörper nachgewiesen.

Im Folgenden wurde die Funktionalität des RhoGEF17-spezifischen shRNA-Adenovirus in RASMC mittels RT-PCR und Immunoblot überprüft. Wie in Abbildung 36 A und B erkennbar ist, war nach 96-stündiger Infektion die mRNA für RhoGEF17 nicht mehr nachweisbar und die Expression des Proteins stark vermindert. Im Gegensatz zum Gehalt an RhoGEF17-mRNA war der Gehalt an mRNA für Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) in Ad-shRNA-RhoGEF17 infizierten RASMC nicht verändert.

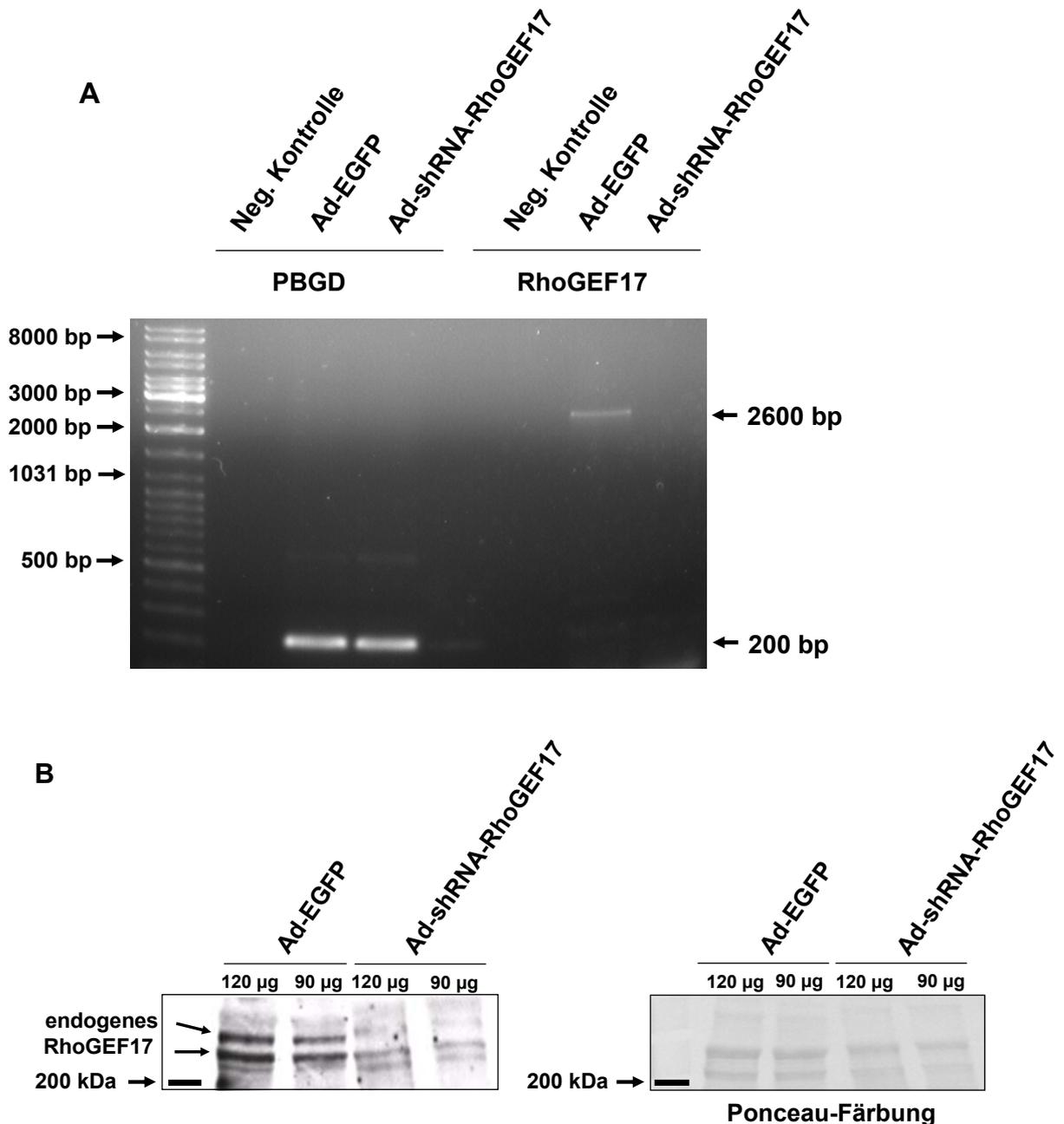


Abb. 36: Suppression der Expression von endogenem RhoGEF17-Protein in RASMC mittels eines shRNA-RhoGEF17-spezifischen Adenovirus. (A) RT-PCR mit RNA aus isolierten, glattmuskulären thorakalen Aortenzellen der Ratte (RASMC), die mit Adenoviren, die für EGFP bzw. shRNA-RhoGEF17 kodieren, mit einer MOI von 150 infiziert und für 96 h inkubiert wurden. Für die RT-PCR wurden die in 4.1.7 aufgeführten Primer PBGD-for, PBGD rev, RhoGEF17-Ratte-3636-for und RhoGEF17-Ratte-6200-rev verwendet. (B) RASMC wurden mit Adenoviren, die für EGFP und shRNA-RhoGEF17 kodieren, mit einer MOI von 150 infiziert und für 96 h inkubiert. Nachweis von endogenem RhoGEF17 in 120 µg bzw. 90 µg RASMC-Lysat mittels des anti-RhoGEF17-spezifischen Antikörpers im Immunoblot. Als Beladungskontrolle ist die entsprechende Ponceau-Färbung des Blots im rechten Bild gezeigt.

Als nächstes wurde der Einfluss des RhoGEF17-spezifischen shRNA-Adenovirus auf die cGMP-abhängige RhoA-Aktivierung in RASMC untersucht. Bei Infektion von RASMC mit Ad-EGFP und Stimulation mit cGMP war wiederum die bereits gezeigte RhoA-Aktivierung nachweisbar. Die Depletion des endogenen RhoGEF17s führte zwar zu einer gesteigerten basalen RhoA-Aktivierung im Vergleich zu Ad-EGFP infizierten Zellen, jedoch im Gegensatz zu Ad-EGFP infizierten RASMC konnte durch cGMP keine gesteigerte RhoA-Aktivierung mehr induziert werden (Abb. 37). Interessanterweise führte die cGMP-Behandlung von Ad-shRNA-RhoGEF17-infizierten RASMC-Zellen zu der in einer Vielzahl von Publikationen beschriebenen Inhibition der RhoA-Aktivierung durch die cGKI. Dieses Resultat legt nahe, dass RhoGEF17 für eine cGMP-vermittelte Aktivierung von RhoA in RASMC notwendig ist.

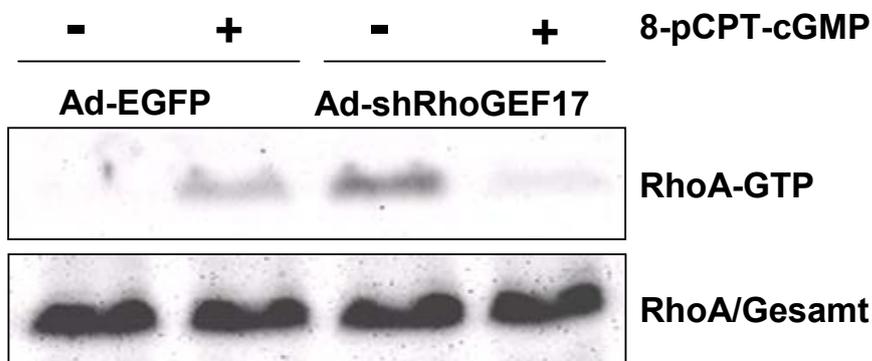


Abb. 37: Inhibition der cGMP-vermittelten RhoA-Aktivierung in RASMC durch Ad-shRNA-RhoGEF17. RASMC wurden mit Adenoviren, die für EGFP und shRNA-RhoGEF17 kodieren, mit einer MOI von 150 infiziert. Nach 94 h wurden die Zellen mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP für 2 h stimuliert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert.

5.3.5 Einfluss von SNP auf die cGMP-abhängige RhoA-Aktivierung in RASMC

Die Effekte von cGMP auf die RhoA-Aktivierung in RASMC ließen sich durch Inkubation mit Natrium-Nitroprussid (SNP), einem Aktivator der löslichen Guanylylzyklase (Katsuki *et al.*, 1977) imitieren. Wie in Abbildung 38 zu erkennen ist, induzierte SNP eine gesteigerte Aktivierung von RhoA in Kontroll (EGFP)-infizierten RASMC, während die gesteigerte RhoA-Aktivierung, die in RhoGEF17-depletierten RASMC beobachtet wurde, durch SNP, analog zur Behandlung mit cGMP, gehemmt wurde. Diese Daten legen nahe, dass die Stimulation der löslichen Guanylylzyklase zu einer cGMP-abhängigen Aktivierung von RhoGEF17 und damit auch zur Stimulation von RhoA-abhängigen Signalwegen in RASMC führen kann.

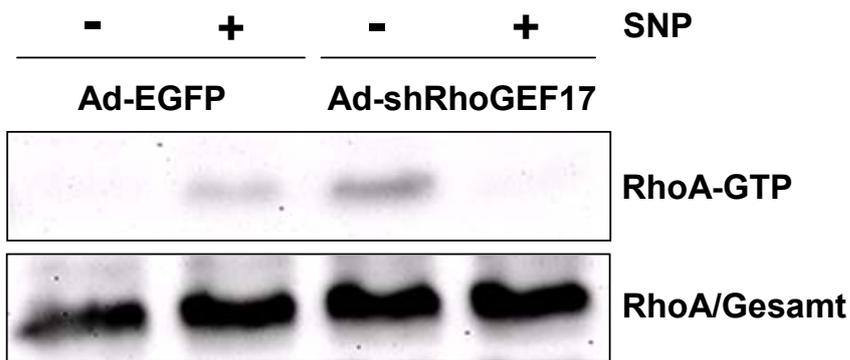


Abb. 38: Inhibition der SNP-vermittelten RhoA-Aktivierung in RASMC durch Ad-shRNA-RhoGEF17. RASMC wurden mit Adenoviren, die für EGFP und shRNA-RhoGEF17 kodieren, mit einer MOI von 150 infiziert. Nach 95 h wurden die Zellen mit 1 μ M SNP für 1 h inkubiert. Zur Bestimmung der Gesamt-RhoA-Menge in den Lysaten wurden parallel 40 μ g des Zelllysats analysiert.

6. Diskussion

Monomere GTPasen der Rho-Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation einer Vielzahl von verschiedenen zellulären Prozessen. Neben der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts sind diese unter anderem an der Koordination von vaskulären physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Rho-GTPasen kontrollieren hierbei als zentrale Mediatoren Prozesse wie Proliferation, Migration und Kontraktion von glattmuskulären als auch von endothelialen Zellen (Rolfe *et al.*, 2005; Pacaud *et al.*, 2005). Bis heute ist jedoch nur relativ wenig über die unmittelbar beteiligten akzessorischen Proteine und Signalübertragungswege bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, in diesem Kontext die Rolle der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren der mit GrinchGEF (Winkler *et al.*, 2005) verwandten GEFs, RhoGEF10 und RhoGEF17 sowie deren übergeordnete Regulation näher zu untersuchen.

6.1 RhoGEF10

6.1.1. Proteinsequenzanalyse

Bioinformatische Proteinsequenzanalysen von RhoGEF10 ergaben, ähnlich wie bei GrinchGEF, neben der Detektion einer typischen DH- und einer putativen WD40-ähnlichen Domäne, zwei C-terminale putative Transmembransegmente (Hirokawa *et al.*, 1998). Dagegen konnten die Programme TMHMM und PSORT aber weder eine Sequenz für eine transmembranäre Lokalisation, noch eine N-terminale Signalsequenz für einen Transport in das endoplasmatische Retikulum detektieren (Sonnhammer *et al.*, 1998; Nakai & Horton, 1999). Die experimentelle Analyse der subzellulären Lokalisation mittels Zellfraktionierung zeigte, dass das rekombinante RhoGEF10 kein integrales Membranprotein ist, sondern vorwiegend zytosolisch vorliegt. Ähnlich wie bei GrinchGEF (Winkler *et al.*, 2005), sind damit die putativen Transmembrandomänen von RhoGEF10 offensichtlich nicht funktionell. Es ist anzunehmen, dass RhoGEF10 analog zur Mehrheit der Mitglieder der Dbl-Familie, ein zytosolisches Protein ist, das nach bzw. durch eine spezifische Aktivierung mit der Plasmamembran assoziiert und dort zur Aktivierung von RhoGTPasen führt (Schmidt & Hall, 2002; Rossman *et al.*, 2005). Ob, wie für andere RhoGEFs gezeigt, eine direkt auf die DH-Domäne folgende PH-Domäne an der Translokation von RhoGEF10 an die Membran beteiligt ist, scheint zweifelhaft. Die Existenz einer solchen PH-Domäne ist, wie bei GrinchGEF und RhoGEF17, aus der Primärsequenz nicht ableitbar. Nur hoch stringente Modelling-Programme, wie z. B. Fugue, die die dreidimensionale Struktur bekannter PH-Domänen dem Modelling zu Grunde legen, können mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit die Existenz einer solchen PH-Domäne in der Struktur von RhoGEF10

berechnen. Wenn RhoGEF10, RhoGEF17 und GrinchGEF überhaupt PH-Domäne besitzen, dann sind diese strukturell mit bekannten RhoGEF-PH-Domänen nur wenig vergleichbar.

6.1.2. Expression von RhoGEF10 und alternatives Spleißen des Gens

Die Durchführung einer RT-PCR mit Oligonukleotiden, die das Exon 8 umfassen, ergab in allen überprüften Geweben zwei PCR-Amplifikate bei 420 und 537 bp. Eine anschließende Klonierung des kürzeren PCR-Fragments und Sequenzierung deckte ein alternatives Spleißen des Exons 8 auf. Diese alternative Spleißvariante stimmt überein mit einem von Verhoeven und Mitarbeitern beschriebenen alternativen Spleißen des Exons 4 des murinen RhoGEF10 Orthologs, welches dem Exon 8 der humanen genomischen RhoGEF10-Sequenz entspricht. In den genomischen Studien von Verhoeven und Mitarbeitern wurden darüber hinaus für das murine RhoGEF10-Gen zwei weitere Spleißvarianten beschrieben, welche möglicherweise gewebespezifisch exprimiert werden (Verhoeven *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu bestätigt die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse mittels RT-PCR die bereits von Yoshizawa und Mitarbeitern mittels Northern Blot-Analysen nachgewiesene Transkription des humanen RhoGEF10-Gens in allen untersuchten Geweben (Yoshizawa *et al.*, 2003). Die Spleißvariante RhoGEF10- Δ E8 wurde ebenfalls in allen untersuchten Geweben detektiert, so dass von einer verbreiteten Expression von RhoGEF10 im menschlichen Organismus ausgegangen werden kann. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte die Expression des RhoGEF10-Proteins im Endothel von Blutgefäßen sowie im ZNS nachgewiesen werden (Yoshizawa *et al.*, 2003). Dieses Expressionsmuster erklärt zum einen das Vorhandensein von RhoGEF10-mRNA in allen untersuchten Geweben, da diese alle Gefäßendothelzellen enthalten und zum anderen könnte dieses Expressionsmuster auch auf eine spezifische Aufgabe, z. B. in Gefäßendothelzellen hindeuten.

6.1.3. RhoB Spezifität von RhoGEF10

Eine Analyse zur Spezifität von RhoGEF10 für verschiedene Rho-GTPasen ergab, dass alle Varianten von RhoGEF10 in der Lage sind RhoA-C, nicht aber Rac1 und Cdc42 zu aktivieren. Im Gegensatz zu den beiden anderen Subfamilienmitgliedern RhoGEF17 und GrinchGEF (Winkler *et al.*, 2005) zeigte RhoGEF10 eine Präferenz für RhoB. RhoGEF10 stellt somit das erste RhoGEF der Dbl-Familie dar, welches bevorzugt RhoB aktiviert. Andere RhoGEFs jedoch wie z. B. XPLN und Scambio unterscheiden zwar ebenfalls zwischen den hoch homologen Rho-Proteinen, bevorzugen jedoch RhoA und RhoB bzw. RhoA und RhoC (Arthur *et al.*, 2002; Curtis *et al.*, 2004).

6.1.4 Physiologische Relevanz von RhoGEF10

Die deutliche Expression im Gefäßendothel, z. B. der Aorta und die Präferenz für die RhoB-Aktivierung könnte auf eine mögliche Bedeutung von RhoGEF10 beim Überleben endothelialer Zellen (Liu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004) und auf eine Beteiligung am zellulären Transport von EGF-Rezeptoren (Gampel *et al.*, 1999) hindeuten.

Des Weiteren wurde für RhoGEF10 eine putative Rolle bei der Myelinisierung von peripheren Nervenfasern beschrieben. In einer genetischen Studie wurde aufgrund einer Mutation im ARHGEF10-Gen eine geringere Isolationsschicht der Nervenfasern sowie eine verzögerte Nerven-Reizweiterleitungsgeschwindigkeit beobachtet (Verhoeven *et al.*, 2003). Insgesamt jedoch können beim gegenwärtigen Stand der Forschung noch keine definitiven Aussagen über die physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung gemacht werden, da bis dato weder der Aktivierungsmechanismus bekannt ist noch Signalwege und zelluläre Funktionen identifiziert sind, bei denen die Beteiligung von RhoGEF10 nachgewiesen ist.

6.2. RhoGEF17

6.2.1 Spezifität von RhoGEF17 für RhoGTPasen

Das in dieser Arbeit hergestellte Konstrukt, das für das 2063 Aminosäuren umfassende menschliche RhoGEF17-Protein kodiert, zeigte nach Expression in HEK-Zellen dieselbe Substratspezifität wie die vor einigen Jahren bereits charakterisierte, trunkierte Variante p164-RhoGEF (Rumenapp *et al.*, 2002). RhoGEF17 ist in der Lage die Rho-Proteine RhoA-C, nicht aber Rac1 oder Cdc42 zu aktivieren. Ebenso wie in RhoGEF10 und GrinchGEF (Winkler *et al.*, 2005) ist die Existenz der klassischen PH-Domäne des DH/PH-Motivs der Dbl-Familienmitglieder in RhoGEF17 fraglich, deshalb bildet es mit den strukturverwandten Proteinen RhoGEF10 und GrinchGEF eine neue Rho-spezifische Subfamilie von GEFs.

6.2.2 RhoGEF17 wird spezifisch durch cGKI- α phosphoryliert und aktiviert

Ähnlich wie eine Vielzahl anderer RhoGEFs (Schmidt & Hall, 2002; Rossman *et al.*, 2005) sind in RhoGEF17 autoinhibitorische Domänen vorhanden, die die GEF-Aktivität regulieren (Rumenapp *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung der RhoGEFs durch spezifische Proteinkinasen ist des Öfteren als Mechanismus beschrieben worden, durch den die Autoinhibition aufgehoben und damit die Aktivität eines RhoGEFs stimuliert werden kann. So konnte z. B. gezeigt werden, dass der N-Terminus von Vav eine α -Helix bildet, die die Bindungstasche für RhoGTPasen in der DH-Domäne von Vav verschließt und damit die GEF-Aktivität blockiert (Aghazadeh *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung des Tyrosins 174 durch Src-ähnliche, lösliche Tyrosinproteinkinasen induziert eine Umstrukturierung des N-terminalen, inhibitorischen Peptids, das daraufhin den Kontakt zur DH-Domäne verliert. Dies führt dann zur ungehemmten Aktivierung von RhoGTPasen durch Vav.

In der vorliegenden Arbeit konnten eine Vielzahl von Befunden erhoben werden, die belegen, dass die Autoinhibition in RhoGEF17 unter Kontrolle des cGMP/cGKI- α -Signalwegs steht. Erstens, wie durch Koimmunopräzipitations-Experimente belegt, interagiert RhoGEF17 mit cGMP-aktivierter cGKI- α . Zweitens, die cGMP-abhängige Phosphorylierung von RhoGEF17 konnte mit Hilfe eines für das phosphorylierte Konsensusmotiv spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Drittens, die Aktivierung von rekombinant exprimierter cGKI- α durch stabile cGMP-Analoga induzierte eine zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung von RhoA in Anwesenheit von RhoGEF17, aber nicht bei Anwesenheit der katalytisch inaktiven RhoGEF17- Δ DH-Mutante. Viertens, die Hemmung von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen verstärkte die cGMP/cGKI- α /RhoGEF17-induzierte RhoA-Aktivierung. Fünftens, die durch cGMP/cGKI- α /RhoGEF17-induzierte RhoA-Aktivierung stimulierte Rho-abhängige Effektorproteine, wie z. B. ROCK und aktivierte Rho-abhängige Signalwege, wie z. B. die SRF-vermittelte Gentranskription. Sechstens, in RASMC, die RhoGEF17 endogen exprimieren, konnte eine cGMP-abhängige Aktivierung von RhoA nachgewiesen werden, die nach Depletion von RhoGEF17 mittels siRNA verschwand. Diese Daten zeigen eindeutig, dass RhoGEF17 das erste bisher identifizierte RhoGEF ist, das unter direkter Kontrolle des cGMP/cGKI- α -Signalweges steht.

Die Primärsequenz von RhoGEF17 enthält neun putative Phosphorylierungsstellen, die dem Konsensusmotiv der cGK entsprechen. Durch Verwendung von phosphomimetischen bzw. Phosphorylierungsresistenten, sowie N-terminal trunkeerten Varianten von RhoGEF17, konnten Hinweise erarbeitet werden, dass eine koordinierte Phosphorylierung der Serine 43 und 1331 zur Aktivierung von RhoGEF17 durch cGKI- α benötigt wird. Obwohl die alleinige Phosphorylierung des Serins 1331 sowohl im Vollängenprotein als auch in der um 1003 AA trunkeerten, konstitutiv aktiven RhoGEF17-Mutante RhoGEF17- Δ N eine Inhibition der cGMP/cGKI- α abhängigen RhoA-Aktivierung bewirkte, war eine Aktivierung der phosphomimetischen Mutante S1331E durch cGKI- α weiterhin möglich. Die phosphorylierungsresistente Mutante SS1330/1331AA zeigte dagegen, wie durch den Wegfall der inhibitorischen Phosphorylierung zu erwarten, eine erhöhte Basalaktivität, die durch cGMP/cGKI- α aber nicht weiter stimuliert werden konnte. Weitere Untersuchungen unter Verwendung von Inhibitoren der cGK deuten daraufhin, dass sowohl RhoGEF17 als auch RhoGEF17- Δ N bereits im nicht stimulierten Zustand am Serin 1331 konstitutiv phosphoryliert sein könnte. Am wahrscheinlichsten erscheint deshalb folgendes Szenario der cGKI- α -abhängigen Aktivierung von RhoGEF17: Obwohl die Phosphorylierung von Serin 1331 per se inhibitorisch auf die RhoGEF17-Aktivität wirkt, ist die Phosphorylierung von Serin 1331 durch die cGKI- α zur Aktivierung notwendig. Aufgrund der Hinweise auf eine konstitutive Phosphorylierung, ist es vorstellbar, dass das Serin 1331 für die cGKI- α gut zugänglich ist. Erst die durch die Phosphorylierung von Serin 1331 induzierte Konformationsänderung ermöglicht dann der cGKI- α den Zugang zur zweiten, N-terminalen Phosphorylierungsstelle Serin 43. Die Phosphorylierung von Serin 43 löst anschließend die inhibitorische Interaktion des N-Terminus mit einer anderen Domäne von RhoGEF17, z. B. der

DH-Domäne, so dass das Protein letztendlich aktiviert wird. Dieser komplexe Reaktionsmechanismus steht erstens in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der hier erhobenen Befunde und deutet zweitens auf eine zentrale Bedeutung der cGKI- α -abhängigen Phosphorylierung für die Aktivierung von RhoGEF17 hin. Dieser Eindruck wird durch einen weiteren Befund noch verstärkt.

Trotz der Tatsache, dass die PKA und die cGK dasselbe Konsensusmotiv (RK-X-S/T bzw. RR-X-S/T) (Tegge *et al.*, 1995) erkennen und viele Proteine an derselben Stelle sowohl durch die PKA als auch durch die cGK phosphoryliert werden (Glass & Krebs, 1980), ist RhoGEF17 aufgrund der hier erhobenen Befunde kein Substrat für die PKA. Obwohl 8-Bromo-cAMP die endogene PKA in HEK-Zellen aktiviert und die Phosphorylierung von PKA-Substraten induziert (Beebe, 1994), konnte keine cAMP-abhängige Phosphorylierung von RhoGEF17 nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit, konnte 8-Bromo-cAMP auch keine Aktivierung von RhoA und auch keine Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen in RhoGEF17-exprimierenden Zellen induzieren. RhoGEF17 gehört deshalb zusammen mit IRAG (Schlossmann *et al.*, 2000) und RGS2 (Tang *et al.*, 2003) zu den spezifischen Substraten der cGKI und stellt deswegen ein neues Signalmolekül dar, das entweder durch lösliche, NO-abhängige (Palacios *et al.*, 1989; Koesling *et al.*, 2004) oder membranständige, durch natriuretische Peptide regulierte (Potter & Hunter, 2001; Garbers *et al.*, 2006) Guanylylzyklen aktiviert werden kann.

6.2.3 Der Einfluss von cGMP/cGKI- α auf die Aktivität von RhoA in An- und Abwesenheit von RhoGEF17

In der Literatur wird von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben, dass RhoA sowohl von der PKA als auch von der cGKI C-terminal am Serin 188 phosphoryliert werden kann (Lang *et al.*, 1996; Sawada *et al.*, 2001; Ellerbroek *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung geht mit einer Hemmung der Aktivität von RhoA einher, wie z. B. durch die Hemmung der SRF-abhängigen Genexpression nachgewiesen wurde (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Sawada *et al.*, 2001). Anscheinend weist das phosphorylierte RhoA eine erhöhte Affinität zu dem zytosolischen Inhibitor RhoGDI auf und wird deshalb vermehrt aus der Plasmamembran ins Zytosol transloziert (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005; Kwak & Uhlinger, 2000). Dies verringert die Interaktionsfähigkeit von RhoA mit RhoGEFs oder Effektoren (Lang *et al.*, 1996)

In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit die beschriebene Hemmung der Serum-induzierten Aktivierung von RhoA durch cGMP/cGKI- α (Gudi *et al.*, 2002) in HEK-Zellen, in denen kein RhoGEF17 exprimiert wurde, ebenfalls beobachtet werden (siehe Abb. 26, Seite 95). Interessanterweise wurde aber allein durch die Expression von RhoGEF17 der Effekt von cGMP/cGKI- α auf die Aktivität von RhoA von einer Hemmung in eine Stimulation umgekehrt. Da die Sequestrierung von phosphoryliertem RhoA durch RhoGDI als wesentlicher Mechanismus der cGMP/cGKI-induzierten Hemmung der RhoA-Aktivität gilt, legen diese Daten

nahe, dass erstens RhoGEF17 in der Lage ist mit RhoGDI um das phosphorylierte RhoA zu konkurrieren und zweitens phosphoryliertes RhoA zu aktivieren. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung der phosphorylierungsresistenten Mutante RhoA-S188A bzw. der phosphomimetischen Mutante RhoA-S188E (Ellerbroek *et al.*, 2003) gezeigt werden, dass RhoGEF17 RhoA sowohl in unphosphorylierter als auch in phosphorylierter Form aktivieren kann. Da die phosphomimetische Mutante zudem in gleicher Weise wie die phosphorylierungsrestistente Mutante und Wildtyp-RhoA in der Lage war RhoA-abhängige Signalwege, wie z. B. die SRF-abhängige Gentranskription (siehe Abb. 27 C, Seite 98) zu aktivieren, legen diese Daten nahe, dass die cGMP/cGKI- α induzierte Aktivierung von RhoGEF17 tatsächlich in der Lage ist dem inhibitorischen Effekt von cGMP/cGKI auf die zelluläre Aktivität von RhoA entgegen zu wirken und bei einem Überwiegen der RhoGEF17-vermittelten RhoA-Aktivierung sogar in der Lage ist den Effekt von cGMP auf die zelluläre RhoA-Aktivität in eine Stimulation umzuwandeln (siehe Abb. 26, Seite 95).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene cGMP/cGKI- α /RhoGEF17-abhängige Aktivierung von RhoA steht im Einklang mit einer Reihe von publizierten Studien, welche demonstrieren, dass die cGKI zellspezifisch und unter bestimmten physiologischen Bedingungen nicht zu einer Inhibition der RhoA-Aktivität führt. Beispielweise könnte dieser Mechanismus erklären, warum in einer Studie von Gratacap und Mitarbeitern die durch das Thromboxan-Analogon U 46619 gesteigerte RhoA-Aktivierung in humanen Thrombozyten nicht durch cGMP gehemmt wird, obwohl in Thrombozyten eine relativ große Menge an cGKI enthalten und deren Aktivität für die antithrombotischen Effekte des NO/cGMP-Systems von zentraler Bedeutung ist (Gratacap *et al.*, 2001).

6.2.4 Die ROCK-abhängige Verstärkung der cGMP/cGKI- α -induzierten RhoGEF17-Aktivierung

Die Serin/Threonin-Kinasen ROCKI und ROCKII sind die am besten charakterisierten Effektoren der monomeren GTPasen RhoA, RhoB und RhoC (Ishizaki *et al.*, 1996; Sahai & Marshall, 2002). ROCKs regulieren eine Vielzahl von fundamental wichtigen Zellfunktionen wie Kontraktion, Motilität, Proliferation und Apoptose (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Loirand *et al.*, 2006). Ebenso spielt eine gesteigerte Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalwegs bei der Pathogenese von bedeutenden kardiovaskulären Krankheiten, wie z. B. Arteriosklerose, kardialer Hypertrophie und Bluthochdruck eine große Rolle (Noma *et al.*, 2006; Loirand *et al.*, 2006).

Erstaunlicherweise führte die akute Hemmung der ROCK-Aktivität mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632, welcher *in vitro* sowohl die ROCKI als auch die ROCKII mit einer ähnlichen Inhibitionskonstante inhibiert ($K_i=220$ nM für ROCKI und 300 nM für ROCKII) (Ishizaki *et al.*, 2000), zu einer vollständigen Inhibition der cGMP/cGKI- α /RhoGEF17-abhängigen RhoA-Aktivierung. Da Y-27632 im mikromolaren Bereich andere Rho-Effektor-Kinasen wie die Citronkinase ($K_i=5,3$ μ M) und die Proteinkinase N (PKN) ($K_i=3,1$ μ M) und bei Konzentrationen im

hohen mikromolaren Bereich auch andere ATP-abhängige Proteinkinasen, wie die PKC α , PKA und MLCK inhibiert (Davies *et al.*, 2000), wurde zur Verifizierung der ROCK-abhängigen Inhibition der RhoGEF17- und cGMP/cGKI- α -abhängigen RhoA-Aktivierung der selektivere und potentere ROCK-Inhibitor H1152-P eingesetzt (Ki-Wert=1,6 nM für ROCK) (Sasaki *et al.*, 2002). Die Verwendung von H1152-P führte ebenso wie die Behandlung der Zellen mit dem unselektiveren ROCK-Inhibitor Y-27632 zum Verlust der RhoGEF17- und cGMP/cGKI- α -abhängigen RhoA-Aktivierung.

In VSMC z. B. führte die Aktivierung von ROCK zu einer Hemmung der Aktivität der Serin/Threonin-Proteinphosphatase MLCP (Hartshorne *et al.*, 1998; Riddick *et al.*, 2007). Deshalb wurde untersucht, ob Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitoren Einfluss auf die RhoGEF17- und cGMP/cGKI- α -abhängige Aktivierung von RhoA nehmen. Tatsächlich führte eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem ROCK-Inhibitor H-1152P sowie mit den Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitoren Okadainsäure und Calyculin A (Swingle *et al.*, 2007) zu einer kompletten Wiederherstellung der RhoGEF17- und cGMP/cGKI- α -abhängigen RhoA-Aktivierung. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass die MLCP neben der spezifischen Dephosphorylierung von Myosin (Hirano *et al.*, 2004) noch andere zelluläre Prozesse beeinflusst, wie z. B. die Regulation der Aktivität des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDAR) (Norenberg *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2001). Ebenso ist die MLCP möglicherweise an der Anordnung des kortikalen Zytoskeletts an der Plasmamembran (Hirano *et al.*, 2004) und an der Regulation von Transportprozessen beteiligt (Wenthold *et al.*, 2003a; Wenthold *et al.*, 2003b). Eine Beteiligung der MLCP an der Regulation von RhoGEF17 erscheint deshalb durchaus möglich. Da jedoch die verwendeten Phosphatase-Inhibitoren nicht spezifisch für die MLCP (PP1c) sind, sondern auch die Aktivität anderer Phosphatasen der Gruppe 1 sowie die Proteinphosphatase 2A hemmen, ist mit dem hier gewählten Ansatz die Identifikation der Phosphatase(n), die letztendlich für die Dephosphorylierung von RhoGEF17 unter ROCK-Kontrolle verantwortlich sind, nicht möglich. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen jedoch, dass sich die Aktivierung von RhoGEF17 durch cGMP/cGKI- α über eine RhoA/ROCK-vermittelte Hemmung einer oder mehrerer Serin/Threonin-Phosphatase(n) selbst verstärkt. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus trägt sicher ebenfalls dazu bei, dass die cGMP/cGKI- α -abhängige Inhibition der RhoA-Aktivierung in Abwesenheit von RhoGEF17 in eine cGMP/cGKI- α -abhängige Aktivierung von RhoA in Anwesenheit ausreichender Mengen von RhoGEF17 umgelenkt werden kann (siehe Abb. 26, Seite 95).

In Abbildung 39 ist der in dieser Arbeit vorgeschlagene RhoGEF17-Signalweg schematisch dargestellt.

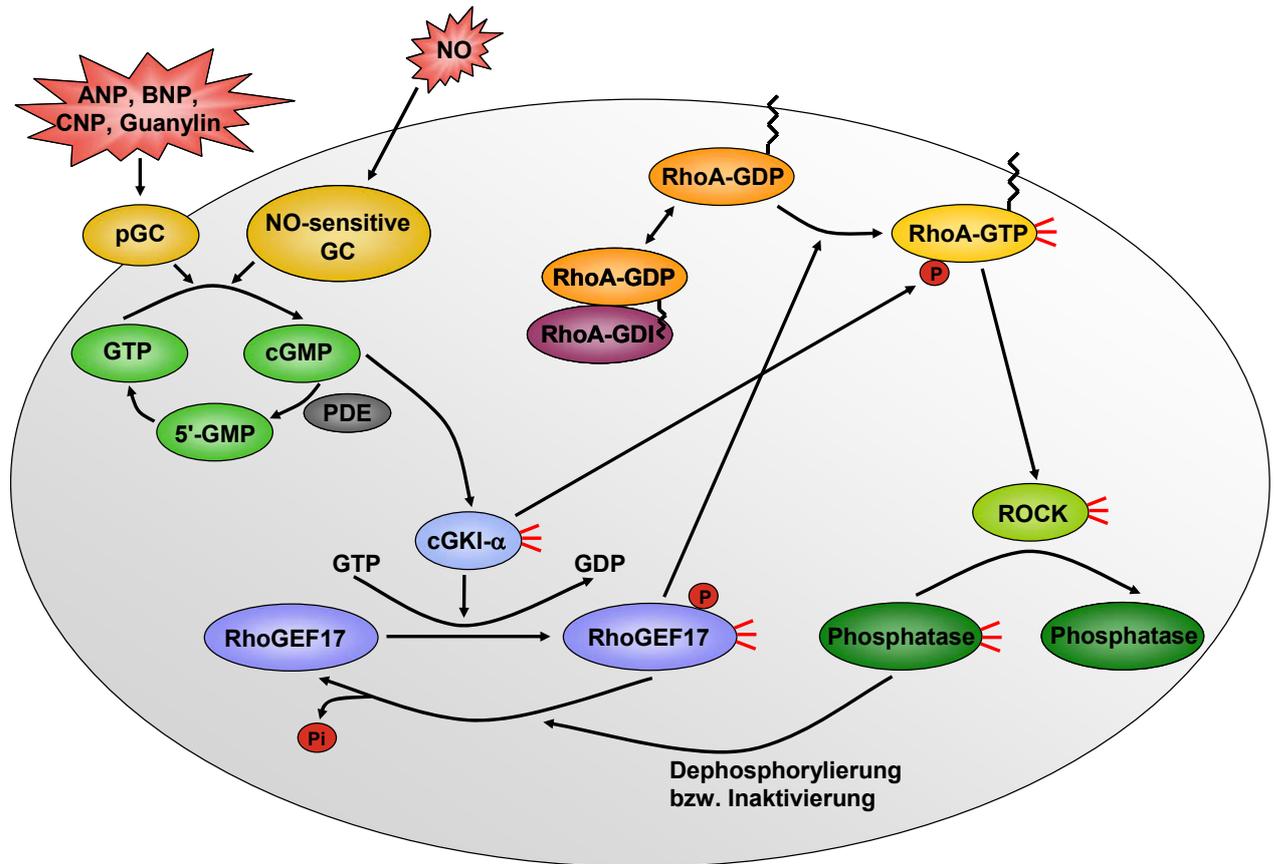


Abb. 39: Schematische Darstellung des RhoGEF17-Signalwegs. Das RhoA-C spezifische RhoGEF17 wird durch die cGKI- α spezifisch aktiviert. Diese Aktivierung setzt eine direkte Interaktion beider Proteine voraus und beinhaltet eine koordinierte Phosphorylierung von RhoGEF17 sowie möglicherweise von RhoA. Die cGKI- α /RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung unterliegt einem positiven Rückkopplungsmechanismus, welcher von einer ROCK-vermittelten Inhibition einer oder mehrerer Serin/Threonin-Proteinphosphatase(n) getragen wird. RhoGEF17 kann entweder durch lösliche, NO-abhängige oder membranständige, durch natriuretische Peptide regulierte Guanylylzyklen aktiviert werden. Weitere Erläuterungen im Text. Abkürzungen: ANP („atrial natriuretic peptide“), BNP („brain natriuretic peptide“), CNP („C-type natriuretic peptide“), NO (Stickstoffmonoxid), GC (Guanylylzyklase), pGC (partikuläre GC), GTP (Guanosintriphosphat), GDP (Guanosindiphosphat), cGMP (Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat), PDE (Phosphodiesterase), cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), GEF („guanine nucleotide exchange factor“), ROCK (Rho-Kinase), Pi (anorganisches Phosphat), P (Phosphat), Rho („Ras-homologous“).

6.2.5 Physiologische Relevanz von RhoGEF17

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine endogene Expression von RhoGEF17 in isolierten glattmuskulären Aortenzellen der Maus bzw. der Ratte nachgewiesen werden. In immunhistologischen Färbungen der Rattenaorta konnte die Expression von RhoGEF17 in allen Schichten der glatten Gefäßmuskulatur sowie zu einem geringeren Anteil im Endothel gezeigt werden. Übereinstimmend mit der Literatur wurde ein kongruentes Expressionsmuster der cGKI detektiert, wobei die Expression im Endothel deutlich schwächer war als in der glatten Muskulatur (Keilbach *et al.*, 1992; Draijer *et al.*, 1995). Interessanterweise führte eine Stimulation von kultivierten RASMC mit verschiedenen cGMP-Analoga bzw. eines NO-Donors zu einer

gesteigerten RhoA-Aktivierung, welche durch Inhibition der endogenen RhoGEF17-Expression mit Hilfe des RhoGEF17-spezifischen shRNA-Adenovirus vollständig unterdrückt werden konnte. Diese Daten deuten auf eine physiologische Bedeutung von RhoGEF17 in VSMC unter bestimmten Bedingungen hin. Eine Reihe von RhoA/ROCK-abhängigen Prozessen in VSMC, wie z. B. Migration, Proliferation und Kontraktion sind in der Literatur beschrieben worden (Rolfe *et al.*, 2005). Der RhoA/ROCK-Signalweg ist zudem als ein entscheidender Mechanismus beschrieben worden, der in die Differenzierung der SMC durch die Regulation der SRF-abhängigen Transkription eingreift (Owens, 1995; Mack *et al.*, 2001; Miano, 2003; Liu *et al.*, 2003; Owens *et al.*, 2004). Die cGMP/cGKI- α und RhoGEF17-abhängige RhoA-Aktivierung in VSMC, könnte deshalb beim Wechsel vom kontraktilen zum proliferativen Phänotyp der VSMC von zentraler Bedeutung sein.

Aktuelle Studien zeigen, dass die Aktivierung der cGKI, im Gegensatz zur generellen Situation, unter bestimmten Bedingungen nur zu einer geringfügigen Relaxation der Gefäße führt. So zeigt die cGKI nur einen kleinen inhibitorischen Effekt auf die Ca^{2+} -Sensibilisierung in permeabilisierten murinen Aorten (Worner *et al.*, 2007). Auch in pulmonalen, hypoxischen Gefäßen spielt die cGMP/cGKI-abhängige Relaxation nur eine geringe Rolle (Gao *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2007). Diese verminderte cGMP/cGKI-abhängige Relaxation geht mit einer erhöhten RhoA- bzw. ROCK-Aktivität einher (Gao *et al.*, 2007; Nagaoka *et al.*, 2006; Guilluy *et al.*, 2005). Es ist davon auszugehen, dass die gesteigerte ROCK-Aktivität zu einer verstärkten Phosphorylierung spezifischer Threonine (T 696, T 853) von MYPT1 und damit verbunden, durch Aktivierung des MLCP inhibitorischen Proteins CIP-17, zu einer deutlichen Hemmung der MLCP-Aktivität führt (Abb. 40) (Feng *et al.*, 1999; Somlyo & Somlyo, 2003; Wooldridge *et al.*, 2004, Muranyi *et al.*, 2005; Dimopoulos *et al.*, 2007). Wooldridge und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine ROCK-abhängige Phosphorylierung von MYPT1 an den Threoninen 696 und 853 eine cGKI-abhängige Phosphorylierung an den benachbarten Serinen 695 und 852 unterdrückt und dies mit einer Hemmung der MLCP-Enzymaktivität bzw. einer Abschwächung der relaxierenden Wirkung der cGKI einhergeht (Wooldridge *et al.*, 2004) (Abb. 40). Eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Relaxation, wie z. B. unter Hypoxie, wäre deshalb, dass eine verstärkte Expression von RhoGEF17 über eine gesteigerte cGMP/cGKI-abhängige RhoA/ROCK-Aktivierung die MLCP-Aktivität hemmt und damit der cGMP/cGKI-induzierten Relaxation entgegenwirkt (siehe Abb. 26, Seite 95). Der cGMP/cGKI/RhoGEF17-Signalweg könnte deshalb zudem eine wichtige Rolle im Ausbalancieren der NO/cGMP-induzierten Relaxation der Gefäße spielen und deshalb an der Pathogenese einer primären Hypertonie beteiligt sein.

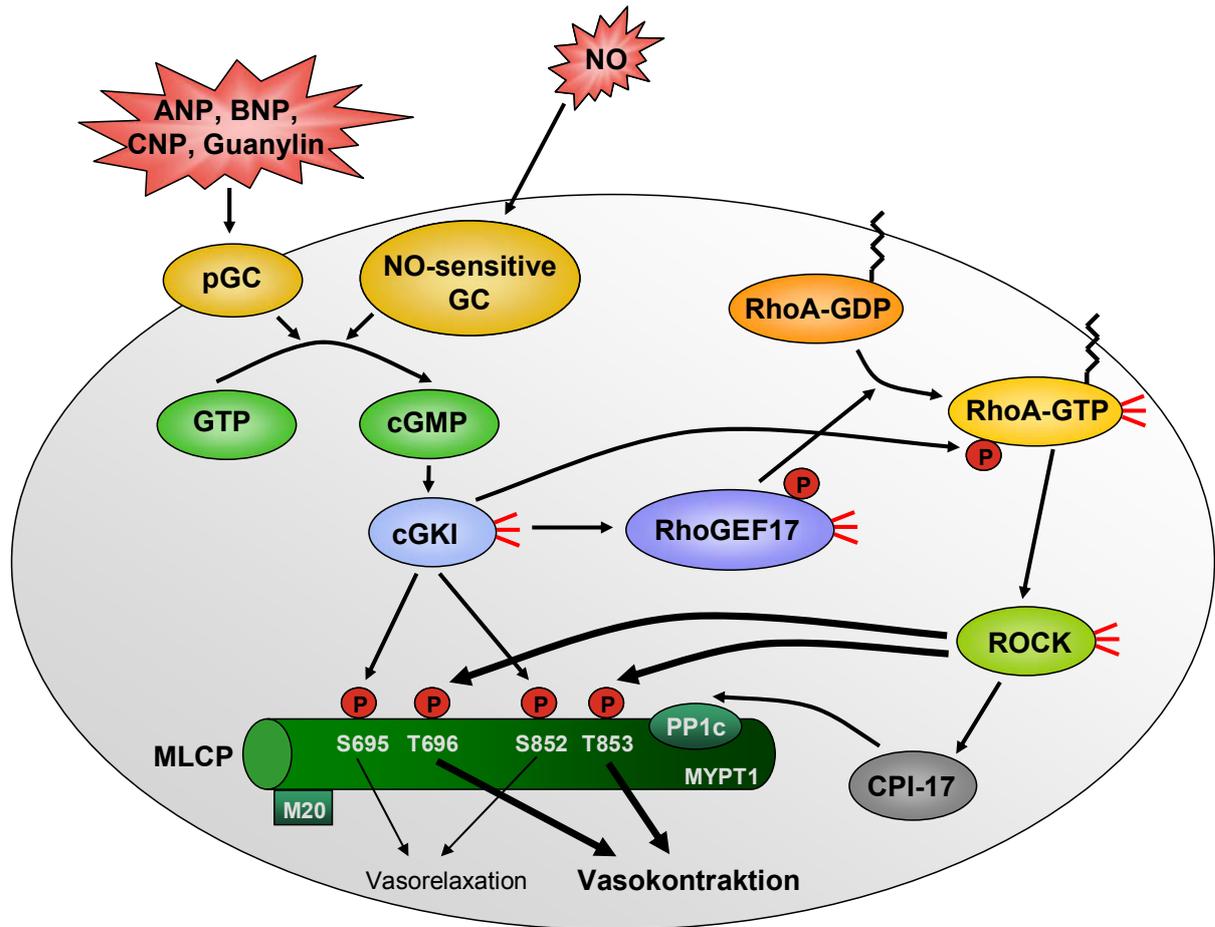


Abb. 40: Putativer Einfluss von cGKI und ROCK auf die MYPT1 Untereinheit der MLCP bzw. auf den Gefäßtonus der glatten Muskulatur in Gegenwart von RhoGEF17. Eine gesteigerte ROCK-Aktivität führt zu einer verstärkten Phosphorylierung spezifischer Threonine (T 696, T 853) der MYPT1-Untereinheit der MLCP und unterdrückt dadurch eine cGKI-abhängige Phosphorylierung an den benachbarten Serinen 695 und 852. Die relaxierende Wirkung der cGKI wird damit abgeschwächt. Weitere Erläuterungen im Text. Abkürzungen: ANP („atrial natriuretic peptide“), BNP („brain natriuretic peptide“), CNP („C-type natriuretic peptide“), NO (Stickstoffmonoxid), GC (Guanylylzyklase), pGC (partikuläre GC), GTP (Guanosintriphosphat), GDP (Guanosindiphosphat), cGMP (Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat), cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), GEF („guanine nucleotide exchange factor“), ROCK (Rho-Kinase), MLCP (leichte Myosinketten-Phosphatase), MYPT1 (Myosin-bindende Untereinheit der leichten Myosinketten-Phosphatase), PP1C (Proteinphosphatase 1C), M20 (Untereinheit von MLCP die an MYPT1 bindet, ohne bekannte Funktion), CPI-17 (Proteinkinase C stimuliertes Myosin-Phosphatase Inhibitorprotein), P (Phosphat), S (Serin), T (Threonin).

In isolierten Gefäßendothelzellen haben verschiedene Arbeiten eine VEGF-vermittelte cGMP-Erhöpfung nachgewiesen (Kroll & Waltenberger, 1998), die mit einer Aktivierung von RhoA einhergeht (Zeng *et al.*, 2002b) und zudem wurde RhoGEF17 als ein Tumor-Endothelial-Markerprotein (TEM-4) beschrieben (Carson-Walter *et al.*, 2001). Eine Beteiligung des endothelialen RhoGEF17 bei der Migration (Zeng *et al.*, 2002b), Proliferation (Zeng *et al.*, 2002a) bzw. Kontraktion (Bogatcheva *et al.*, 2002) von Endothelzellen erscheint deshalb möglich. Daraus ergeben sich putative Bedeutungen von RhoGEF17 für die Wundheilung (Aepfelbacher *et al.*, 1997), die Regulation der endothelialen Permeabilität oder die Angiogenese (Carbajal & Schaeffer, 1999; Wojciak-Stothard & Ridley, 2002; Van Nieuw Amerongen *et al.*, 2003). Demnach könnte RhoGEF17 ein wichtiger Mediator in VSMC und Gefäßendothelzellen sein.

6.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren RhoGEF10 und RhoGEF17 charakterisiert, sowie deren übergeordnete Regulation untersucht. Besonders die hier identifizierte Aktivierung von RhoGEF17 über den cGMP/cGKI-Signalweg in VSMC und Endothelzellen könnte von physiologischer bzw. pathophysiologischer Bedeutung sein. Um dies zu klären sind zum einen Expressions- und zum anderen Funktionsstudien an Gefäßen von Tiermodellen für eine endotheliale Dysfunktion bzw. primäre Hypertonie angezeigt. Eine weitere jedoch aufwendigere Möglichkeit die physiologische Relevanz dieser Guaninnukleotid-Austauschfaktoren näher zu untersuchen ist die Generierung von konventionellen und konditionellen RhoGEF17 bzw. RhoGEF10 Knockout-Mäusen. Ein konditioneller Knockout z. B. in VSMC bzw. Endothelzellen würde beispielsweise im Bezug auf den Gefäßtonus sowie auf die Aufrechterhaltung des kontraktiven Phänotyps der glatten Muskulatur, der Hypertrophie, der Angiogenese oder der Arteriosklerose Aufschluss über die Bedeutung dieser beiden Guaninnukleotid-Austauschfaktoren geben können. Da solche Untersuchungen aber weit über das Ziel der vorliegenden Arbeit hinausgehen, müssen sie zukünftigen Studien vorbehalten bleiben.

7. Literaturverzeichnis

- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A. und Tilbrook, P.A. (1992) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*, 267: 20033-20038.
- Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M. und Weber, P.C. (1997) Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1623-1629.
- Aghazadeh, B., Lowry, W.E., Huang, X.Y. und Rosen, M.K. (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell*, 102: 625-633.
- Aghazadeh, B., Zhu, K., Kubiseski, T.J., Liu, G.A., Pawson, T., Zheng, Y. und Rosen, M.K. (1998) Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain. *Nat Struct Biol*, 5: 1098-1107.
- Ahmed, I., Calle, Y., Sayed, M.A., Kamal, J.M., Rengaswamy, P., Manser, E., Meiners, S. und Nur, E.K.A. (2004) Cdc42-dependent nuclear translocation of non-receptor tyrosine kinase, ACK. *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 571-579.
- Akiyama, S.K. (1996) Integrins in cell adhesion and signaling. *Hum Cell*, 9: 181-186.
- Aktories, K., Braun, U., Rosener, S., Just, I. und Hall, A. (1989) The rho gene product expressed in *E. coli* is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *Biochem Biophys Res Commun*, 158: 209-213.
- Aktories, K., Mohr, C. und Koch, G. (1992) Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 175: 115-131.
- Aktories, K., Schmidt, G. und Just, I. (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem*, 381: 421-426.
- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. und Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, 273: 32950-32956.
- Anborgh, P.H., Qian, X., Papageorge, A.G., Vass, W.C., Declue, J.E. und Lowy, D.R. (1999) Ras-specific exchange factor GRF: oligomerization through its Dbl homology domain and calcium-dependent activation of Raf. *Mol Cell Biol*, 19: 4611-4622.
- Arber, W. (1978) Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 17: 73-79.
- Armstrong, S.A., Hannah, V.C., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1995) CAAX geranylgeranyl transferase transfers farnesyl as efficiently as geranylgeranyl to RhoB. *J Biol Chem*, 270: 7864-7868.
- Arthur, W.T., Ellerbroek, S.M., Der, C.J., Burrige, K. und Wennerberg, K. (2002) XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J Biol Chem*, 277: 42964-42972.
- Ashcroft, S.J. (1997) Intracellular second messengers. *Adv Exp Med Biol*, 426: 73-80.
- Aspenstrom, P., Fransson, A. und Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*, 377: 327-337.

- Ayala, J., Olofsson, B., Touchot, N., Zahraoui, A., Tavitian, A. und Prochiantz, A. (1989) Developmental and regional expression of three new members of the ras-gene family in the mouse brain. *J Neurosci Res*, 22: 384-389.
- Bar-Sagi, D. und Feramisco, J.R. (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*, 233: 1061-1068.
- Beebe, S.J. (1994) The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin Cancer Biol*, 5: 285-294.
- Benard, V. und Bokoch, G.M. (2002) Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol*, 345: 349-359.
- Bernards, A. und Settleman, J. (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol*, 14: 377-385.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. und Lipp, P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395: 645-648.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. und Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 517-529.
- Bhattacharyya, R. und Wedegaertner, P.B. (2000) Galpha 13 requires palmitoylation for plasma membrane localization, Rho-dependent signaling, and promotion of p115-RhoGEF membrane binding. *J Biol Chem*, 275: 14992-14999.
- Bi, F., Debreceni, B., Zhu, K., Salani, B., Eva, A. und Zheng, Y. (2001) Autoinhibition mechanism of proto-Dbl. *Mol Cell Biol*, 21: 1463-1474.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. und Hofmann, F. (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 135: 151-171.
- Bishop, A.L. und Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 348 Pt 2: 241-255.
- Bogatcheva, N.V., Garcia, J.G. und Verin, A.D. (2002) Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)*, 67: 75-84.
- Bonnevier, J. und Arner, A. (2004) Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2+) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem*, 279: 28998-29003.
- Bonnevier, J., Fassler, R., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. und Arner, A. (2004) Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice. *J Biol Chem*, 279: 5146-5151.
- Booden, M.A., Siderovski, D.P. und Der, C.J. (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol*, 22: 4053-4061.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. und Roderick, H.L. (2002) Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 7320-7322.
- Borodovsky, M. und Mcininch, J. (1993) Recognition of genes in DNA sequence with ambiguities. *Biosystems*, 30: 161-171.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349: 117-127.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brasier, A.R. (2006) The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol*, 6: 111-130.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M. und Snyder, S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347: 768-770.
- Bruckdorfer, R. (2005) The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*, 26: 3-31.
- Buday, L. und Downward, J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 73: 611-620.
- Bustelo, X.R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol*, 20: 1461-1477.
- Bustelo, X.R., Crespo, P., Lopez-Barahona, M., Gutkind, J.S. und Barbacid, M. (1997) Cbl-b, a member of the Shc-1/c-Cbl protein family, inhibits Vav-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *Oncogene*, 15: 2511-2520.
- Byers, H.R. und Fujiwara, K. (1982) Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J Cell Biol*, 93: 804-811.
- Carbajal, J.M. und Schaeffer, R.C., Jr. (1999) RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am J Physiol*, 277: C955-964.
- Carson-Walter, E.B., Watkins, D.N., Nanda, A., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. und St Croix, B. (2001) Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res*, 61: 6649-6655.
- Chai, J. und Tarnawski, A.S. (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol*, 53: 147-157.
- Chardin, P. (1988) The ras superfamily proteins. *Biochimie*, 70: 865-868.
- Charest, P.G. und Firtel, R.A. (2007) Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J*, 401: 377-390.
- Chen, F.C., Ogut, O., Rhee, A.Y., Hoit, B.D. und Brozovich, F.V. (2006) Captopril prevents myosin light chain phosphatase isoform switching to preserve normal cGMP-mediated vasodilatation. *J Mol Cell Cardiol*, 41: 488-495.
- Chen, R.H., Corbalan-Garcia, S. und Bar-Sagi, D. (1997) The role of the PH domain in the signal-dependent membrane targeting of Sos. *Embo J*, 16: 1351-1359.
- Cheng, L., Rossman, K.L., Mahon, G.M., Worthylake, D.K., Korus, M., Sondek, J. und Whitehead, I.P. (2002) RhoGEF specificity mutants implicate RhoA as a target for Dbs transforming activity. *Mol Cell Biol*, 22: 6895-6905.
- Choudhury, N., Khromov, A.S., Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (2004) Telokin mediates Ca²⁺-desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 25: 657-665.
- Chrisman, T.D., Garbers, D.L., Parks, M.A. und Hardman, J.G. (1975) Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem*, 250: 374-381.
- Christensen, L.F., Meyer, R.B., Jr., Miller, J.P., Simon, L.N. und Robins, R.K. (1975) Synthesis and enzymic activity of 8-acyl and 8-alkyl derivatives of guanosine 3', 5'-cyclic phosphate. *Biochemistry*, 14: 1490-1496.

- Chrzanowska-Wodnicka, M. und Burridge, K. (1992) Rho, rac and the actin cytoskeleton. *Bioessays*, 14: 777-778.
- Cicha, I., Schneiderhan-Marra, N., Yilmaz, A., Garlichs, C.D. und Goppelt-Struebe, M. (2004) Monitoring the cellular effects of HMG-CoA reductase inhibitors in vitro and ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 2046-2050.
- Coleman, M.L. und Olson, M.F. (2002) Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ*, 9: 493-504.
- Colicelli, J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004: RE13.
- Cornwell, T.L., Arnold, E., Boerth, N.J. und Lincoln, T.M. (1994) Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*, 267: C1405-1413.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M. und Greenberg, S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med*, 186: 1487-1494.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S. und Bustelo, X.R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*, 385: 169-172.
- Cryer, D.R., Eccleshall, R. und Marmur, J. (1975) Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol*, 12: 39-44.
- Curtis, C., Hemmerlyckx, B., Haataja, L., Senadheera, D., Groffen, J. und Heisterkamp, N. (2004) Scambio, a novel guanine nucleotide exchange factor for Rho. *Mol Cancer*, 3: 10.
- Das, B., Shu, X., Day, G.J., Han, J., Krishna, U.M., Falck, J.R. und Broek, D. (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem*, 275: 15074-15081.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. und Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351: 95-105.
- De Hoog, C.L., Koehler, J.A., Goldstein, M.D., Taylor, P., Figeys, D. und Moran, M.F. (2001) Ras binding triggers ubiquitination of the Ras exchange factor Ras-GRF2. *Mol Cell Biol*, 21: 2107-2117.
- De Sepulveda, P., Ilangumaran, S. und Rottapel, R. (2000) Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *J Biol Chem*, 275: 14005-14008.
- Deng, J.T., Van Lierop, J.E., Sutherland, C. und Walsh, M.P. (2001) Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem*, 276: 16365-16373.
- Dillon, S.T., Rubin, E.J., Yakubovich, M., Pothoulakis, C., Lamont, J.T., Feig, L.A. und Gilbert, R.J. (1995) Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of Clostridium difficile toxin A and toxin B. *Infect Immun*, 63: 1421-1426.
- Dimopoulos, G.J., Semba, S., Kitazawa, K., Eto, M. und Kitazawa, T. (2007) Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ Res*, 100: 121-129.
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K. und Scita, G. (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci*, 62: 955-970.
- Diviani, D., Abuin, L., Cotecchia, S. und Pansier, L. (2004) Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *Embo J*, 23: 2811-2820.

- Dong, J.M., Leung, T., Manser, E. und Lim, L. (1998) cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J Biol Chem*, 273: 22554-22562.
- Dovas, A. und Couchman, J.R. (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J*, 390: 1-9.
- Draijer, R., Vaandrager, A.B., Nolte, C., De Jonge, H.R., Walter, U. und Van Hinsbergh, V.W. (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res*, 77: 897-905.
- Dransart, E., Olofsson, B. und Cherfils, J. (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic*, 6: 957-966.
- Eckert, L.B., Repasky, G.A., Ulku, A.S., Mcfall, A., Zhou, H., Sartor, C.I. und Der, C.J. (2004) Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res*, 64: 4585-4592.
- Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K. und Burridge, K. (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem*, 278: 19023-19031.
- Elliot-Smith, A.E., Mott, H.R., Lowe, P.N., Laue, E.D. und Owen, D. (2005) Specificity determinants on Cdc42 for binding its effector protein ACK. *Biochemistry*, 44: 12373-12383.
- Ellis, S. und Mellor, H. (2000) Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol*, 10: 85-88.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629-635.
- Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. und Morita, F. (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)*, 118: 1104-1107.
- Eva, A. und Aaronson, S.A. (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature*, 316: 273-275.
- Feil, R., Lohmann, S.M., De Jonge, H., Walter, U. und Hofmann, F. (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, 93: 907-916.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J. und Nakano, T. (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 274: 37385-37390.
- Feramisco, J.R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M. und Sweet, R.W. (1984) Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell*, 38: 109-117.
- Ferguson, K.M., Lemmon, M.A., Sigler, P.B. und Schlessinger, J. (1995) Scratching the surface with the PH domain. *Nat Struct Biol*, 2: 715-718.
- Fernandez-Sarabia, M.J. und Bischoff, J.R. (1993) Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature*, 366: 274-275.
- Filtz, T.M. und Niibori, Y. (2004) Desensitization of angiotensin-stimulated inositol phosphate accumulation in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 502: 11-19.

- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Gingras, D. und Beliveau, R. (2002) Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J*, 361: 243-254.
- Francis, S.H. und Corbin, J.D. (1999) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36: 275-328.
- Francis, S.H., Woodford, T.A., Wolfe, L. und Corbin, J.D. (1988) Types I alpha and I beta isozymes of cGMP-dependent protein kinase: alternative mRNA splicing may produce different inhibitory domains. *Second Messengers Phosphoproteins*, 12: 301-310.
- Fransson, A., Ruusala, A. und Aspenstrom, P. (2003) Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 6495-6502.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. und Keef, K.D. (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, 274: 10927-10935.
- Fukata, Y., Amano, M. und Kaibuchi, K. (2001) Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 32-39.
- Fukuhara, S., Chikumi, H. und Gutkind, J.S. (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett*, 485: 183-188.
- Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T. und Gutkind, J.S. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem*, 274: 5868-5879.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. und Takai, Y. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*, 5: 1321-1328.
- Furchgott, R.F. und Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.
- Gale, N.W., Kaplan, S., Lowenstein, E.J., Schlessinger, J. und Bar-Sagi, D. (1993) Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature*, 363: 88-92.
- Galisteo, M.L., Yang, Y., Urena, J. und Schlessinger, J. (2006) Activation of the nonreceptor protein tyrosine kinase Ack by multiple extracellular stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 9796-9801.
- Gampel, A., Parker, P.J. und Mellor, H. (1999) Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol*, 9: 955-958.
- Gao, Y., Portugal, A.D., Negash, S., Zhou, W., Longo, L.D. und Usha Raj, J. (2007) Role of Rho kinases in PKG-mediated relaxation of pulmonary arteries of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292: L678-684.
- Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegand, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B., Redfield, M.M. und Burnett, J.C., Jr. (2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab*, 17: 251-258.
- Garcia-Mata, R. und Burridge, K. (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*, 17: 36-43.
- Gardner, A.M., Vaillancourt, R.R. und Johnson, G.L. (1993) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase by G protein and tyrosine kinase oncoproteins. *J Biol Chem*, 268: 17896-17901.

- Garg, U.C. und Hassid, A. (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 83: 1774-1777.
- Geiselhoring, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. und Schlossmann, J. (2004) IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *Embo J*, 23: 4222-4231.
- Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder, S.H. und Billiar, T.R. (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 3491-3495.
- Geneste, O., Copeland, J.W. und Treisman, R. (2002) LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol*, 157: 831- 838.
- Germani, A., Romero, F., Houlard, M., Camonis, J., Gisselbrecht, S., Fischer, S. und Varin-Blank, N. (1999) hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol Cell Biol*, 19: 3798-3807.
- Ghomashchi, F., Zhang, X., Liu, L. und Gelb, M.H. (1995) Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochemistry*, 34: 11910-11918.
- Gill, G.N., Holdy, K.E., Walton, G.M. und Kanstein, C.B. (1976) Purification and characterization of 3':5'-cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 3918-3922.
- Glass, D.B. und Krebs, E.G. (1979) Comparison of the substrate specificity of adenosine 3':5'-monophosphate- and guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases. Kinetic studies using synthetic peptides corresponding to phosphorylation sites in histone H2B. *J Biol Chem*, 254: 9728-9738.
- Glass, D.B. und Krebs, E.G. (1980) Protein phosphorylation catalyzed by cyclic AMP-dependent and cyclic GMP-dependent protein kinases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 20: 363-388.
- Gohla, A., Schultz, G. und Offermanns, S. (2000) Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res*, 87: 221-227.
- Golombek, D.A., Agostino, P.V., Plano, S.A. und Ferreyra, G.A. (2004) Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem Int*, 45: 929-936.
- Gomes, E.R., Jani, S. und Gundersen, G.G. (2005) Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*, 121: 451-463.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36: 59-74.
- Gratacap, M.P., Payrastra, B., Nieswandt, B. und Offermanns, S. (2001) Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 276: 47906-47913.
- Gross, S.S., Stuehr, D.J., Aisaka, K., Jaffe, E.A., Levi, R. und Griffith, O.W. (1990) Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun*, 170: 96-103.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D. und Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11821-11827.

- Gudi, T., Chen, J.C., Casteel, D.E., Seasholtz, T.M., Boss, G.R. und Pilz, R.B. (2002) cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions. *J Biol Chem*, 277: 37382-37393.
- Guilluy, C., Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Guerin, P., Sagan, C., Pacaud, P. und Loirand, G. (2005) Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*, 146: 1010-1018.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Schreiber, A., Zhang, W. und Grinstein, S. (1997) Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J Exp Med*, 186: 955-966.
- Hakoshima, T., Shimizu, T. und Maesaki, R. (2003) Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem (Tokyo)*, 134: 327-331.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279: 509-514.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A. und Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, 279: 558-560.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S. und Murad, F. (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 7: 801-819.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166: 557-580.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. und Marshall, C.J. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, 57: 1167-1177.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. und Fesik, S.W. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, 371: 168-170.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C. und Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Gα13. *Science*, 280: 2112-2114.
- Hartshorne, D.J. (1998) Myosin phosphatase: subunits and interactions. *Acta Physiol Scand*, 164: 483-493.
- Hartshorne, D.J., Ito, M. und Erdodi, F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, 19: 325-341.
- Haslam, R.J., Koide, H.B. und Hemmings, B.A. (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature*, 363: 309-310.
- He, T.C., Zhou, S., Da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 2509-2514.
- Hecker, M., Walsh, D.T. und Vane, J.R. (1991) On the substrate specificity of nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, 294: 221-224.
- Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*, 20: 376-382.
- Hill, C.S., Wynne, J. und Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81: 1159-1170.
- Hirano, K., Hirano, M. und Kanaide, H. (2004) Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res*, 40: 219-236.

- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. und Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14: 378-379.
- Hisatsune, C., Nakamura, K., Kuroda, Y., Nakamura, T. und Mikoshiba, K. (2005) Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem*, 280: 11723-11730.
- Hofmann, F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 280: 1-4.
- Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10): 1671-1676.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. und Schlossmann, J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, 86: 1-23.
- Hofmann, F., Gensheimer, H.P. und Gobel, C. (1985) cGMP-dependent protein kinase. Autophosphorylation changes the characteristics of binding site 1. *Eur J Biochem*, 147: 361-365.
- Hofmann, F. und Sold, G. (1972) A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3':5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 49: 1100-1107.
- Hori, Y., Kikuchi, A., Isomura, M., Katayama, M., Miura, Y., Fujioka, H., Kaibuchi, K. und Takai, Y. (1991) Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene*, 6: 515-522.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. und Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 9265- 9269.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. und Narumiya, S. (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*, 15: 1885-1893.
- Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M. und Narumiya, S. (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*, 57: 976-983.
- Isomura, M., Kaibuchi, K., Yamamoto, T., Kawamura, S., Katayama, M. und Takai, Y. (1990) Partial purification and characterization of GDP dissociation stimulator (GDS) for the rho proteins from bovine brain cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 169: 652-659.
- Ito, M., Dabrowska, R., Guerriero, V., Jr. und Hartshorne, D.J. (1989) Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, 264: 13971- 13974.
- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. und Hartshorne, D.J. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*, 259: 197-209.
- Jacinto, A. und Wolpert, L. (2001) Filopodia. *Curr Biol*, 11: R634.
- Jaffe, A.B. und Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21: 247-269.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H.R., Lohmann, S.M. und Walter, U. (1994) Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 9426-9430.

- Jiang, K., Delarue, F.L. und Sebti, S.M. (2004) EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene*, 23: 1136-1145.
- Jimenez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sanchez, R., Ramon Y Cajal, S., Wyllie, A. und Lacal, J.C. (1995) Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene*, 10: 811-816.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. und Macara, I.G. (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*, 2: 531-539.
- Jones, G.E., Allen, W.E. und Ridley, A.J. (1998) The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. *Cell Adhes Commun*, 6: 237-245.
- Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M.R., Boquet, P., Hegenbarth, S. und Von Eichel-Streiber, C. (1994) Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem*, 269: 10706-10712.
- Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., Von Eichel-Streiber, C., Mann, M. und Aktories, K. (1995) The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem*, 270: 13932-13936.
- Kadowaki, T., Goldfarb, D., Spitz, L.M., Tartakoff, A.M. und Ohno, M. (1993) Regulation of RNA processing and transport by a nuclear guanine nucleotide release protein and members of the Ras superfamily. *Embo J*, 12: 2929-2937.
- Kahn, R.A., Goddard, C. und Newkirk, M. (1988) Chemical and immunological characterization of the 21-kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 263: 8282- 8287.
- Karnoub, A.E., WorthyLake, D.K., Rossman, K.L., Pruitt, W.M., Campbell, S.L., Sondek, J. und Der, C.J. (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol*, 8: 1037-1041.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. und Murad, F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, 3: 23-35.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. und Kaibuchi, K. (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol*, 147: 1023-1038.
- Keilbach, A., Ruth, P. und Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, 208: 467-473.
- Khosravi-Far, R., Lutz, R.J., Cox, A.D., Conroy, L., Bourne, J.R., Sinensky, M., Balch, W.E., Buss, J.E. und Der, C.J. (1991) Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 6264-6268.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273: 245-248.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P. und Brautigan, D.L. (2000) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, 275: 9897-9900.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P. und Khalequzzaman, M. (2003) Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, 546: 879-889.

- Kitazawa, T., Polzin, A.N. und Eto, M. (2004) CPI-17-deficient smooth muscle of chicken. *J Physiol*, 557: 515-528.
- Kobialka, M. und Gorczyca, W.A. (2000) Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation. *Acta Biochim Pol*, 47: 517-528.
- Koesling, D., Russwurm, M., Mergia, E., Mullershausen, F. und Friebe, A. (2004) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int*, 45: 813-819.
- Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J. und Nakano, T. (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*, 475: 197-200.
- Kozasa, T. (2001) Regulation of G protein-mediated signal transduction by RGS proteins. *Life Sci*, 68: 2309-2317.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G. und Sternweis, P.C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α 12 and G α 13. *Science*, 280: 2109-2111.
- Kroll, J. und Waltenberger, J. (1998) VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun*, 252: 743-746.
- Kumar, R., Joyner, R.W., Komalavilas, P. und Lincoln, T.M. (1999) Analysis of expression of cGMP-dependent protein kinase in rabbit heart cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 291: 967-975.
- Kwak, J.Y. und Uhlinger, D.J. (2000) Downregulation of phospholipase D by protein kinase A in a cell-free system of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 267: 305-310.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lancaster, C.A., Taylor-Harris, P.M., Self, A.J., Brill, S., Van Erp, H.E. und Hall, A. (1994) Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem*, 269: 1137-1142.
- Landgraf, W., Hofmann, F., Pelton, J.T. und Huggins, J.P. (1990) Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism. *Biochemistry*, 29: 9921-9928.
- Lane, K.T. und Beese, L.S. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res*, 47: 681-699.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. und Bertoglio, J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *Embo J*, 15: 510-519.
- Laudanna, C., Campbell, J.J. und Butcher, E.C. (1997) Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem*, 272: 24141-24144.
- Lee, M.R., Li, L. und Kitazawa, T. (1997) Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 272: 5063-5068.
- Lei, S., Czerwinska, E., Czerwinski, W., Walsh, M.P. und Macdonald, J.F. (2001) Regulation of NMDA receptor activity by F-actin and myosin light chain kinase. *J Neurosci*, 21: 8464- 8472.
- Lemmon, M.A. (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*, 32: 707-711.

- Li, R., Zhang, B. und Zheng, Y. (1997) Structural determinants required for the interaction between Rho GTPase and the GTPase-activating domain of p190. *J Biol Chem*, 272: 32830-32835.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P. und Prendergast, G.C. (2001) RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol*, 21: 6906-6912.
- Liu, H.W., Halayko, A.J., Fernandes, D.J., Harmon, G.S., Mccauley, J.A., Kocieniewski, P., Mcconville, J., Fu, Y., Forsythe, S.M., Kogut, P., Bellam, S., Dowell, M., Churchill, J., Lesso, H., Kassiri, K., Mitchell, R.W., Hershenson, M.B., Camoretti-Mercado, B. und Solway, J. (2003) The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29: 39-47.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Schkeryantz, J.M., Janowick, D.A., Harlan, J.E., Harris, E.A., Staunton, D.E. und Fesik, S.W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell*, 95: 269-277.
- Loirand, G., Guerin, P. und Pacaud, P. (2006) Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*, 98: 322-334.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rumenapp, U., Jakobs, K.H., Schmidt, M. und Wieland, T. (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem*, 280: 11134-11139.
- Macdonald, J.A., Eto, M., Borman, M.A., Brautigan, D.L. und Haystead, T.A. (2001) Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett*, 493: 91-94.
- Machesky, L.M. und Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8: 1347-1356.
- Mack, C.P., Somlyo, A.V., Hautmann, M., Somlyo, A.P. und Owens, G.K. (2001) Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem*, 276: 341-347.
- Mackay, D.J. und Hall, A. (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem*, 273: 20685-20688.
- Mallavarapu, A. und Mitchison, T. (1999) Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol*, 146: 1097-1106.
- Manser, E., Huang, H.Y., Loo, T.H., Chen, X.Q., Dong, J.M., Leung, T. und Lim, L. (1997) Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol*, 17: 1129-1143.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S. und Lim, L. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, 367: 40-46.
- Marmur, J. und Doty, P. (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol*, 3: 585-594.
- Marui, N., Offermann, M.K., Swerlick, R., Kunsch, C., Rosen, C.A., Ahmad, M., Alexander, R.W. und Medford, R.M. (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 92: 1866-1874.
- Mcdaniel, S.S., Platoshyn, O., Wang, J., Yu, Y., Sweeney, M., Krick, S., Rubin, L.J. und Yuan, J.X. (2001) Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: L870-880.

- Mcdonell, M.W., Simon, M.N. und Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, 110: 119-146.
- Miano, J.M. (2003) Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol*, 35: 577-593.
- Miki, H., Suetsugu, S. und Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*, 17: 6932-6941.
- Moon, S.Y. und Zheng, Y. (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, 13: 13-22.
- Moore, M.S. und Blobel, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365: 661-663.
- Munzel, T., Feil, R., Mulsch, A., Lohmann, S.M., Hofmann, F. und Walter, U. (2003) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, 108: 2172-2183.
- Muranyi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M. und Hartshorne, D.J. (2005) Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett*, 579: 6611-6615.
- Nacak, T.G., Alajati, A., Leptien, K., Fulda, C., Weber, H., Miki, T., Czepluch, F.S., Waltenberger, J., Wieland, T., Augustin, H.G. und Kroll, J. (2007) The BTB-Kelch protein KLEIP controls endothelial migration and sprouting angiogenesis. *Circ Res*, 100: 1155-1163.
- Nagaoka, T., Gebb, S.A., Karoor, V., Homma, N., Morris, K.G., Mcmurtry, I.F. und Oka, M. (2006) Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in pulmonary hypertension of the fawn-hooded rat. *J Appl Physiol*, 100: 996-1002.
- Nakai, K. und Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, 24: 34-36.
- Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S. und Nakano, T. (1999) Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal*, 11: 671-676.
- Newmark, P. (1977) Membranes and receptors. *Nature*, 267: 107-109.
- Nie, Z. und Randazzo, P.A. (2006) Arf GAPs and membrane traffic. *J Cell Sci*, 119: 1203-1211.
- Nobes, C.D. und Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81: 53-62.
- Nobes, C.D. und Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, 144: 1235-1244.
- Noma, K., Oyama, N. und Liao, J.K. (2006) Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290: C661-668.
- Norenberg, W., Hofmann, F., Illes, P., Aktories, K. und Meyer, D.K. (1999) Rundown of somatodendritic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels in rat hippocampal neurones: evidence for a role of the small GTPase RhoA. *Br J Pharmacol*, 127: 1060-1063.
- Nusser, N., Gosmanova, E., Makarova, N., Fujiwara, Y., Yang, L., Guo, F., Luo, Y., Zheng, Y. und Tigyi, G. (2006) Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cell Signal*, 18: 704-714.

- Ohashi, K., Hosoya, T., Takahashi, K., Hing, H. und Mizuno, K. (2000) A Drosophila homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 1178-1185.
- Ohga, N., Kikuchi, A., Ueda, T., Yamamoto, J. und Takai, Y. (1989) Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 163: 1523-1533.
- Oka, M., Homma, N., Taraseviciene-Stewart, L., Morris, K.G., Kraskauskas, D., Burns, N., Voelkel, N.F. und Mcmurtry, I.F. (2007) Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res*, 100: 923-929.
- Olofsson, B. (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 11: 545-554.
- Olson, M.F., Ashworth, A. und Hall, A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, 269: 1270-1272.
- Olson, M.F., Sterpetti, P., Nagata, K., Toksoz, D. und Hall, A. (1997) Distinct roles for DH and PH domains in the Lbc oncogene. *Oncogene*, 15: 2827-2831.
- Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K. und Sugimura, H. (2001) Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4385-4390.
- Owens, G.K. (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 75: 487-517.
- Owens, G.K., Kumar, M.S. und Wamhoff, B.R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84: 767-801.
- Pacaud, P., Sauzeau, V. und Loirand, G. (2005) Rho proteins and vascular diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 98: 249-254.
- Palacios, M., Knowles, R.G., Palmer, R.M. und Moncada, S. (1989) Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun*, 165: 802-809.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. und Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
- Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S. und Moncada, S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, 153: 1251-1256.
- Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K. und Hall, A. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*, 111: 1001-1007.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. und Lacal, J.C. (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*, 11: 463-475.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. und Fassler, R. (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, 274: 2082-2086.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 135: 105-149.

- Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C.A., De Hoog, C.L., Moran, M.F. und Rotin, D. (2000) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol*, 10: 555-558.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. und Mullins, R.D. (2001) Actin dynamics. *J Cell Sci*, 114: 3-4.
- Popoff, M.R., Chaves-Olarte, E., Lemichez, E., Von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., Chardin, P., Cussac, D., Antonny, B., Chavrier, P., Flatau, G., Giry, M., De Gunzburg, J. und Boquet, P. (1996) Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for Clostridium sordellii lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem*, 271: 10217-10224.
- Potter, L.R. und Hunter, T. (2001) Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem*, 276: 6057-6060.
- Poulos, T.L. (2006) Soluble guanylate cyclase. *Curr Opin Struct Biol*, 16: 736-743.
- Prokopenko, S.N., Brumby, A., O'keefe, L., Prior, L., He, Y., Saint, R. und Bellen, H.J. (1999) A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila. *Genes Dev*, 13: 2301-2314.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21: 267-271.
- Ren, X.D. und Schwartz, M.A. (2000) Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol*, 325: 264-272.
- Reymond, C.D., Gomer, R.H., Mehdy, M.C. und Firtel, R.A. (1984) Developmental regulation of a Dictyostelium gene encoding a protein homologous to mammalian ras protein. *Cell*, 39: 141-148.
- Riddick, N., Ohtani, K.I. und Surks, H.K. (2007) Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase. *J Cell Biochem*,
- Ridley, A.J. und Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70: 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. und Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70: 401-410.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. und Horwitz, A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302: 1704-1709.
- Rivero, F., Dislich, H., Glockner, G. und Noegel, A.A. (2001) The Dictyostelium discoideum family of Rho-related proteins. *Nucleic Acids Res*, 29: 1068-1079.
- Rolfe, B.E., Worth, N.F., World, C.J., Campbell, J.H. und Campbell, G.R. (2005) Rho and vascular disease. *Atherosclerosis*, 183: 1-16.
- Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G. und Pacaud, P. (2005) Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 96: 1152-1160.
- Ron, D., Graziani, G., Aaronson, S.A. und Eva, A. (1989) The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity. *Oncogene*, 4: 1067-1072.
- Ron, D., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. und Eva, A. (1988) Molecular cloning and characterization of the human dbl proto-oncogene: evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells. *Embo J*, 7: 2465-2473.

- Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R.B., Hunt, L.T., Graziani, G., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. und Eva, A. (1991) A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol*, 3: 372-379.
- Rossman, K.L., Der, C.J. und Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 167-180.
- Rossman, K.L. und Sondek, J. (2005) Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation. *Trends Biochem Sci*, 30: 163-165.
- Rudic, R.D., Shesely, E.G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S.S. und Sessa, W.C. (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*, 101: 731-736.
- Rumenapp, U., Freichel-Blomquist, A., Wittinghofer, B., Jakobs, K.H. und Wieland, T. (2002) A mammalian Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor (p164-RhoGEF) without a pleckstrin homology domain. *Biochem J*, 366: 721-728.
- Rush, M.G., Drivas, G. und D'eustachio, P. (1996) The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *Bioessays*, 18: 103-112.
- Russo, C., Gao, Y., Mancini, P., Vanni, C., Porotto, M., Falasca, M., Torrissi, M.R., Zheng, Y. und Eva, A. (2001) Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*, 276: 19524-19531.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. und Hofmann, F. (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 2623-2627.
- Sahai, E. und Marshall, C.J. (2002) ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol*, 4: 408-415.
- Salojin, K.V., Zhang, J. und Delovitch, T.L. (1999) TCR and CD28 are coupled via ZAP-70 to the activation of the Vav/Rac-1/PAK-1/p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol*, 163: 844-853.
- Sasaki, Y., Suzuki, M. und Hidaka, H. (2002) The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacol Ther*, 93: 225-232.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. und Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, 275: 21722-21729.
- Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G. und Pacaud, P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem*, 278: 9472-9480.
- Sawada, N., Itoh, H., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Fukunaga, Y., Sakaguchi, S., Sone, M., Yamahara, K., Yurugi, T. und Nakao, K. (2001) cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 798-805.
- Scheffzek, K. und Ahmadian, M.R. (2005) GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci*, 62: 3014-3038.
- Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O.N., Illenberger, D. und Gierschik, P. (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol*, 7: 122-126.

- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. und Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, 404: 197-201.
- Schlossmann, J., Feil, R. und Hofmann, F. (2003) Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, 35: 21-27.
- Schlossmann, J., Feil, R. und Hofmann, F. (2005) Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci*, 10: 1279-1289.
- Schmidt, A. und Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, 16: 1587-1609.
- Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B. und Van Aelst, L. (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*, 261: 1-12.
- Seasholtz, T.M., Majumdar, M., Kaplan, D.D. und Brown, J.H. (1999) Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res*, 84: 1186-1193.
- Sekine, A., Fujiwara, M. und Narumiya, S. (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, 264: 8602-8605.
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M. und Chernoff, J. (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol*, 7: 202-210.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A. und Rothman, J.E. (1991) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 67: 239-253.
- Shen, C., Buck, A.K., Liu, X., Winkler, M. und Reske, S.N. (2003) Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*, 539: 111-114.
- Shen, F., Lin, Q., Gu, Y., Childress, C. und Yang, W. (2007) Activated Cdc42-associated kinase 1 is a component of EGF receptor signaling complex and regulates EGF receptor degradation. *Mol Biol Cell*, 18: 732-742.
- Shi, J., Blundell, T.L. und Mizuguchi, K. (2001) FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J Mol Biol*, 310: 243-257.
- Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S. und Yamamoto, K. (1990) Involvement of a NF- κ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol*, 10: 561-568.
- Silvius, J.R. und L'heureux, F. (1994) Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry*, 33: 3014-3022.
- Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C.H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B. und Schlessinger, J. (1993) The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*, 260: 1953-1955.
- Snyder, J.T., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Betts, L., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J. und Sondek, J. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol*, 9: 468-475.
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (1998) From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand*, 164: 437-448.

- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 522 Pt 2: 177-185.
- Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83: 1325-1358.
- Sonnenburg, W.K. und Beavo, J.A. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, 26: 87-114.
- Sonnhammer, E.L., Von Heijne, G. und Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 6: 175-182.
- Surks, H.K. und Mendelsohn, M.E. (2003) Dimerization of cGMP-dependent protein kinase 1alpha and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cell Signal*, 15: 937-944.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. und Mendelsohn, M.E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*, 286: 1583-1587.
- Swingle, M., Ni, L. und Honkanen, R.E. (2007) Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol*, 365: 23-38.
- Takaishi, K., Kikuchi, A., Kuroda, S., Kotani, K., Sasaki, T. und Takai, Y. (1993) Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. *Mol Cell Biol*, 13: 72-79.
- Tanabe, S., Kreutz, B., Suzuki, N. und Kozasa, T. (2004) Regulation of RGS-RhoGEFs by Galpha12 and Galpha13 proteins. *Methods Enzymol*, 390: 285-294.
- Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. und Mendelsohn, M.E. (2003) Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, 9: 1506-1512.
- Taniguchi, J., Furukawa, K.I. und Shigekawa, M. (1993) Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 423: 167-172.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. und Miki, T. (1999) Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol*, 147: 921-928.
- Tegge, W., Frank, R., Hofmann, F. und Dostmann, W.R. (1995) Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry*, 34: 10569-10577.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G. und Lefkowitz, R.J. (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, 269: 10217-10220.
- Tzima, E., Kiosses, W.B., Del Pozo, M.A. und Schwartz, M.A. (2003) Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *J Biol Chem*, 278: 31020-31023.
- Ushio-Fukai, M., Griendling, K.K., Akers, M., Lyons, P.R. und Alexander, R.W. (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alpha11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*, 273: 19772-19777.
- Vaandrager, A.B. und De Jonge, H.R. (1996) Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem*, 157: 23-30.

- Vaandrager, A.B., Tilly, B.C., Smolenski, A., Schneider-Rasp, S., Bot, A.G., Edixhoven, M., Scholte, B.J., Jarchau, T., Walter, U., Lohmann, S.M., Poller, W.C. und De Jonge, H.R. (1997) cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I β . *J Biol Chem*, 272: 4195-4200.
- Van Nieuw Amerongen, G.P., Koolwijk, P., Versteilen, A. und Van Hinsbergh, V.W. (2003) Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 211-217.
- Verhoeven, K., De Jonghe, P., Van De Putte, T., Nelis, E., Zwijsen, A., Verpoorten, N., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Francis, A., Ceuterick, C., Huylebroeck, D. und Timmerman, V. (2003) Slowed conduction and thin myelination of peripheral nerves associated with mutant rho Guanine-nucleotide exchange factor 10. *Am J Hum Genet*, 73: 926-932.
- Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294: 1299-1304.
- Vogt, A., Lutz, S., Rumenapp, U., Han, L., Jakobs, K.H., Schmidt, M. und Wieland, T. (2007) Regulator of G-protein signalling 3 redirects prototypical G(i)-coupled receptors from Rac1 to RhoA activation. *Cell Signal*, 19: 1229-1237
- Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G. und Offermanns, S. (2003) Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J Biol Chem*, 278: 28743-28749.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. und Kurtz, A. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*, 102: 1576-1582.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K.H. und Walter, U. (1986) Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem*, 158: 203-210.
- Walsh, K. und Takahashi, A. (2001) Transcriptional regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *Z Kardiol*, 90 Suppl 3: 12-16.
- Wang, X., Huang, G., Luo, X., Penninger, J.M. und Muallem, S. (2004) Role of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in Ca²⁺ oscillations and adaptation of Ca²⁺ signaling to reduce excitability of RGS2^{-/-} cells. *J Biol Chem*, 279: 41642-41649.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. und Narumiya, S. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1: 136-143.
- Webb, R.C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, 27: 201-206.
- Weiss, B., Thompson, A. und Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem*, 243: 4556-4563.
- Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T. und Stephens, L.R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, 108: 809-821.
- Wells, C.D., Liu, M.Y., Jackson, M., Gutowski, S., Sternweis, P.M., Rothstein, J.D., Kozasa, T. und Sternweis, P.C. (2002) Mechanisms for reversible regulation between G13 and Rho exchange factors. *J Biol Chem*, 277: 1174-1181.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. und Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118: 843-846.

- Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. und Petralia, R.S. (2003a) Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43: 335-358.
- Wenthold, R.J., Sans, N., Standley, S., Prybylowski, K. und Petralia, R.S. (2003b) Early events in the trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans*, 31: 885-888.
- Whitehead, I.P., Lambert, Q.T., Glaven, J.A., Abe, K., Rossman, K.L., Mahon, G.M., Trzaskos, J.M., Kay, R., Campbell, S.L. und Der, C.J. (1999) Dependence of Dbl and Dbs transformation on MEK and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 19: 7759-7770.
- Winkler, S., Mohl, M., Wieland, T. und Lutz, S. (2005) GrinchGEF--a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 1280-1286.
- Wojciak-Stothard, B. und Ridley, A.J. (2002) Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 39: 187-199.
- Wolfe, L., Francis, S.H. und Corbin, J.D. (1989) Properties of a cGMP-dependent monomeric protein kinase from bovine aorta. *J Biol Chem*, 264: 4157-4162.
- Wooldridge, A.A., Macdonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hartshorne, D.J. und Haystead, T.A. (2004) 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*, 279: 34496-34504.
- Worner, R., Lukowski, R., Hofmann, F. und Wegener, J.W. (2007) cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H237-244.
- Worth, N.F., Campbell, G.R. und Rolfe, B.E. (2001) A role for rho in smooth muscle phenotypic regulation. *Ann N Y Acad Sci*, 947: 316-322.
- Worthylake, D.K., Rossman, K.L. und Sondek, J. (2000) Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, 408: 682-688.
- Wright, L.P. und Philips, M.R. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res*, 47: 883-891.
- Wu, X., Haystead, T.A., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V. und Somlyo, A.P. (1998) Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem*, 273: 11362-11369.
- Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M. und Liu, M. (2001) Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 276: 19770-19777.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L. und Davidson, B.L. (2002) siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*, 20: 1006-1010.
- Xiao, D., Longo, L.D. und Zhang, L. (2005) Alpha1-adrenoceptor-mediated phosphorylation of MYPT-1 and CPI-17 in the uterine artery: role of ERK/PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H2828-2835.
- Yang, W. und Cerione, R.A. (1997) Cloning and characterization of a novel Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK-2, from bovine brain. *J Biol Chem*, 272: 24819-24824.
- Yang, W., Lin, Q., Zhao, J., Guan, J.L. und Cerione, R.A. (2001) The nonreceptor tyrosine kinase ACK2, a specific target for Cdc42 and a negative regulator of cell growth and focal adhesion complexes. *J Biol Chem*, 276: 43987-43993.

- Yokosawa, H., Kawakita, M., Arai, K., Inoue-Yokosawa, N. und Kaziro, Y. (1975) Binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes promoted by elongation factor Tu. Studies on the role of GTP hydrolysis. *J Biochem (Tokyo)*, 77: 719-728.
- Yokoyama, N. und Miller, W.T. (2003) Biochemical properties of the Cdc42-associated tyrosine kinase ACK1. Substrate specificity, autophosphorylation, and interaction with Hck. *J Biol Chem*, 278: 47713-47723.
- Yoshizawa, M., Sone, M., Matsuo, N., Nagase, T., Ohara, O., Nabeshima, Y. und Hoshino, M. (2003) Dynamic and coordinated expression profile of dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain. *Gene Expr Patterns*, 3: 375-381.
- Yu, L., Gaitatzes, C., Neer, E. und Smith, T.F. (2000) Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein Sci*, 9: 2470-2476.
- Zeng, H., Zhao, D. und Mukhopadhyay, D. (2002a) Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins, beta gamma subunits, small GTPase CDC42, and partly by Rac-1. *J Biol Chem*, 277: 4003-4009.
- Zeng, H., Zhao, D. und Mukhopadhyay, D. (2002b) KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA. *J Biol Chem*, 277: 46791-46798.
- Zhang, H., Wang, L., Kao, S., Whitehead, I.P., Hart, M.J., Liu, B., Duus, K., Burridge, K., Der, C.J. und Su, L. (1999) Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. *Curr Biol*, 9: 1271-1274.
- Zhao, J., Trewhella, J., Corbin, J., Francis, S., Mitchell, R., Brushia, R. und Walsh, D. (1997) Progressive cyclic nucleotide-induced conformational changes in the cGMP-dependent protein kinase studied by small angle X-ray scattering in solution. *J Biol Chem*, 272: 31929-31936.
- Zheng, Y., Hart, M.J. und Cerione, R.A. (1995) Guanine nucleotide exchange catalyzed by dbl oncogene product. *Methods Enzymol*, 256: 77-84.
- Zheng, Y., Zangrilli, D., Cerione, R.A. und Eva, A. (1996) The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic dbl through specific intracellular targeting. *J Biol Chem*, 271: 19017-19020.
- Zhu, K., Debreceni, B., Bi, F. und Zheng, Y. (2001) Oligomerization of DH domain is essential for Dbl-induced transformation. *Mol Cell Biol*, 21: 425-437.
- Zhuang, S., Nguyen, G.T., Chen, Y., Gudi, T., Eigenthaler, M., Jarchau, T., Walter, U., Boss, G.R. und Pilz, R.B. (2004) Vasodilator-stimulated phosphoprotein activation of serum-response element-dependent transcription occurs downstream of RhoA and is inhibited by cGMP-dependent protein kinase phosphorylation. *J Biol Chem*, 279: 10397-10407.
- Zong, H., Kaibuchi, K. und Quilliam, L.A. (2001) The insert region of RhoA is essential for Rho kinase activation and cellular transformation. *Mol Cell Biol*, 21: 5287- 5298.

8. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland für die Vergabe des Themas und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Hilgenfeldt für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg zu vertreten.

Frau Dr. rer. nat. Susanne Lutz für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, ihrer fachlichen Unterstützung, für die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen neuen Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. rer. nat. Andreas Vogt, Christiane Vettel und Javier Carbajo für die kollegiale Zusammenarbeit und die gegenseitige moralische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei den folgenden Arbeitskollegen für ihre Hilfe, Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima während meiner Dissertation herzlich danken: Stefania Alexa, Anna Hahn, Doris Baltus, Zenon Baraniak, Heinz Scheffel, Rita Weber und Irene Ruprecht.

Ein Extra-Dankeschön an Tina Schummer für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. phil. nat. Martin Thomas danke ich für die Durchführung der immunhistologischen Färbungen.

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann danke ich für das großzügige Abtreten des cGKI Antikörpers.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, auf deren Unterstützung ich während Studium und Promotion immer zählen konnte und an meinen Freund Roger Kilchenmann, der mich jederzeit mental unterstützte und sein seelischer Beistand wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

