

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

Proteomanalyse phänotypisch modulierter glatter Gefäßmuskelzellen

Patricia Elaine Zimmermann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. F. Hofmann
2. Univ.- Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 22.8.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.11.2005 angenommen.

1	Einleitung	3
1.1	Phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen.....	3
1.2	Funktion der cGKI in glatten Gefäßmuskelzellen	4
1.3	Proteom- und Phosphoproteomanalyse mittels 2D Gelelektrophorese	8
1.4	Zielsetzung der Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Kultivierung von VSMCs.....	11
2.2	Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen.....	12
2.2.1	Herstellung des Proteinextraktes	12
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	13
2.2.3	Western Blot Analyse	13
2.2.4	2D Gelelektrophorese	17
2.2.5	Detektion von Proteinen mittels Silber- und Coomassiefärbung	19
2.3	Semiquantitative RT-PCR	20
2.4	Methoden zur Trennung und Detektion von Phosphoproteinen	22
2.4.1	In vivo Phosphorylierung von VSMCs mit ³³ P	22
2.4.2	Herstellung des Proteinextraktes	22
2.4.3	2D Gelelektrophorese	22
2.4.4	Detektion radioaktiver Proteine mittels Phosphoimager und Auto- radiographie	22
2.4.5	MS-kompatible Silberfärbung	23
2.5	Massenspektrometrie	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Vergleichende Proteomanalyse von Aorten und primären VSMC-Kulturen	25
3.1.1	Experimenteller Ansatz	25
3.1.2	Unterschiede im Proteom von Aorten und primären VSMC-Kulturen.....	25
3.1.3	Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine mittels MS.....	29
3.1.4	Validierung der differentiell exprimierten Proteine auf RNA- und Proteinebene.....	32
3.2	Phosphoproteomanalyse.....	33
3.2.1	Experimenteller Ansatz	33

3.2.2	Unterschiede im Phosphoproteom von unstimulierten und cGMP-stimulierten VSMCs	35
3.2.3	Auswertung per Auge.....	35
3.2.4	Identifizierung der Substratproteine der cGKI mittels MS.....	36
4	Diskussion	38
4.1	Einfluß des Probenmaterials auf die Ergebnisse der Proteomanalyse.....	38
4.2	Kritische Betrachtung der Ergebnisse der Phosphoproteomanalyse	39
4.3	Rolle der differentiell exprimierten Proteine in VSMCs.....	40
4.4	Zukunftsperspektive: Rolle der differentiell exprimierten Proteine in der Pathogenese von kardiovaskulären Krankheiten und bei der proatherogenen Wirkung von cGKI	45
5	Zusammenfassung	46
6	Abkürzungen	48
7	Anhang.....	50
7.1	Für die Western Blot Analyse verwendete primäre Antikörper	50
8	Literaturverzeichnis	51
9	Eigene Veröffentlichungen.....	56

1 Einleitung

1.1 Phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen

Die adulte differenzierte glatte Gefäßmuskelzelle („vascular smooth muscle cell“, VSMC) ist eine hochspezialisierte Zelle. Ihre Hauptaufgabe ist die Kontraktion. Hierzu exprimiert sie ein einzigartiges Spektrum kontraktiler Proteine. Während Skelett- und Herzmuskelzellen irreversibel differenzieren, weisen glatte Muskelzellen eine funktionelle Plastizität auf. Die kontraktile VSMC kann bei Veränderungen der Umgebung und der funktionellen Anforderungen in eine weniger differenzierte synthetische VSMC mit einer erhöhten Motilität und einer erhöhten Proteinsynthese dedifferenzieren (Owens, 1995). Die Umwandlung des kontraktiven Phänotyps in einen synthetischen Phänotyp bezeichnet man als phänotypische Modulation (Abb.1). Während der phänotypischen Modulation verändert die VSMC ihre Morphologie, Zellfunktion und biochemischen Charakteristika.

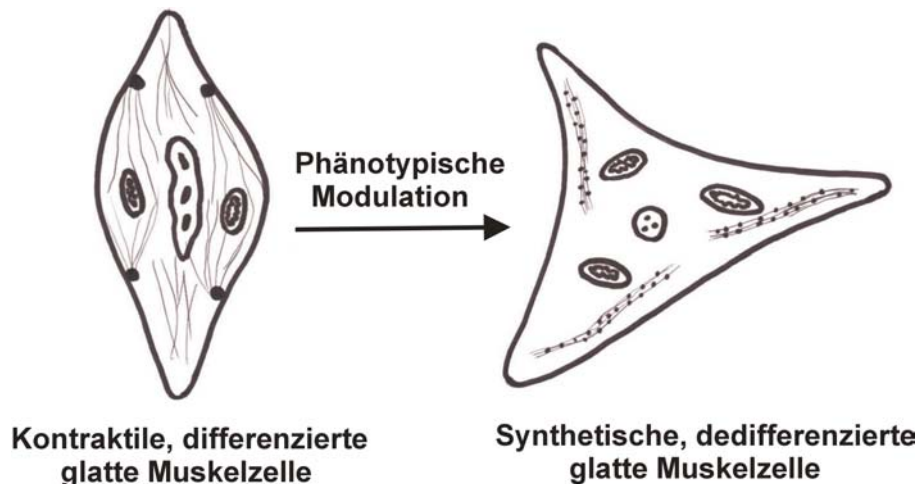


Abb. 1: Phänotypische Modulation

Schematische Darstellung der phänotypischen Modulation: auf der linken Seite ist eine differenzierte spindelförmige VSMC mit ihrem kontraktilen Apparat (Aktin/Myosin/dense bodies) abgebildet. In Abhängigkeit von einer Vielzahl von Interaktionen, Faktoren und der Umgebung findet eine phänotypische Modulation zu einer dedifferenzierten, synthetischen VSMC (auf der rechten Seite dargestellt) statt. Die synthetische VSMC exprimiert weniger kontraktile Proteine und mehr Zytoskelettproteine, da ihre Hauptaufgabe die Migration, Proliferation und Proteinsynthese ist.

Die molekularen Mechanismen und die auslösenden Faktoren dieser phänotypischen Modulation sind noch weitgehend unklar. Bekannt ist, dass die synthetische VSMC eine erhöhte Motilität, Proliferationsrate und Proteinsynthese aufweist (Worth et al., 2001). Die Veränderungen in der Expression von kontraktilen Proteinen und

Zytoskelettproteinen wurden von Owens und Campbell untersucht (Owens, 1995, Campbell and Campbell, 1997). Man findet den synthetischen Phänotyp in Gefäßen mit atherosklerotischen Plaques und nach Gefäßverletzungen (Lincoln et al., 2001, Manderson et al., 1989). Im frühen Stadium der Atherosklerose wandelt sich die differenzierte VMSC in eine proliferierende synthetische VSMC um und wandert in die Intima ein. Diese dadurch entstehende Intimaverdickung kennzeichnet eine atherosklerotische Läsion. Die phänotypische Modulation ist demzufolge ein integraler Bestandteil in der Pathogenese der Atherosklerose. Den synthetischen „atherogenen“ Phänotyp findet man auch bei in vitro Kulturen von VSMCs (Chamley-Campbell et al., 1979, Thyberg et al., 1985). Zur Untersuchung der phänotypischen Modulation könnten daher kultivierte VSMCs ein gutes Modell darstellen. Die Identifizierung neuer Markerproteine synthetischer VSMCs in diesem Modell könnte zur Charakterisierung des Phänotyps beitragen.

1.2 Funktion der cGKI in glatten Gefäßmuskelzellen

Die NO/cGMP/cGKI Signalkaskade

Seit mehr als 100 Jahren werden organische Nitrate wie Nitroglycerin zur Behandlung von Angina pectoris eingesetzt. Die molekularen Mechanismen, die für die Wirkung der Nitrate verantwortlich sind, wurden erst in den 70er Jahren aufgeklärt. Murad und seine Mitarbeiter identifizierten Stickstoffmonoxid (NO) als therapeutisch wirksames Agens, das von Nitroglycerin freigesetzt wird (Katsuki et al., 1977). In den 80er Jahren wurde in der Endothelschicht von Blutgefäßen ein gefäßerweiternder Stoff, der „endothelium-derived relaxing factor“, kurz EDRF, entdeckt, der mit dem biologisch freigesetzten NO identisch ist (Ignarro et al., 1987, Furchgott et al., 1980). Die Pionierarbeiten von Ferid Murad, Louis J. Ignarro und Robert F. Furchgott zur Bedeutung des gasförmigen Moleküls NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System wurden 1998 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Im Organismus ist NO an vielen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Relaxation der glatten Muskulatur, der Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Regulation des Blutdrucks und des kardialen und vaskulären Remodeling beteiligt.

Der Botenstoff NO wird in vielen verschiedenen Geweben und Zellen von NO-Synthasen (neuronal NOS I, induzierbare NOS II, endotheliale NOS III) aus der

Aminosäure L-Arginin gebildet. Das freigesetzte NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase (sGC) (Katsuki et al., 1977), welche die Bildung des intrazellulären sekundären Botenstoffes zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) katalysiert. Der Botenstoff cGMP kann auch NO unabhängig von membrangebundenen partikulären Guanylylzyklasen (pGC) gebildet werden, welche durch extrazelluläres Binden von natriuretischen Peptiden (ANP „atrial natriuretic peptide“, BNP „brain natriuretic peptide“, CNP „C-type natriuretic peptide“) und Guanylin stimuliert werden (Garbers et al., 1994). Die erstmals in Arthropoden (Kuo und Greengard, 1970) und wenig später auch in Säugetieren (Hofmann und Sold, 1972) nachgewiesene cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) ist einer der Hauptrezeptoren für cGMP (Abb.2). Weitere bekannte Rezeptorproteine sind die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (PDEs) (Sonnenburg und Beavo, 1994) und die cGMP-modulierten Ionenkanäle (CNG „cyclic nucleotide gated cation channel“) (Biel et al., 1999).

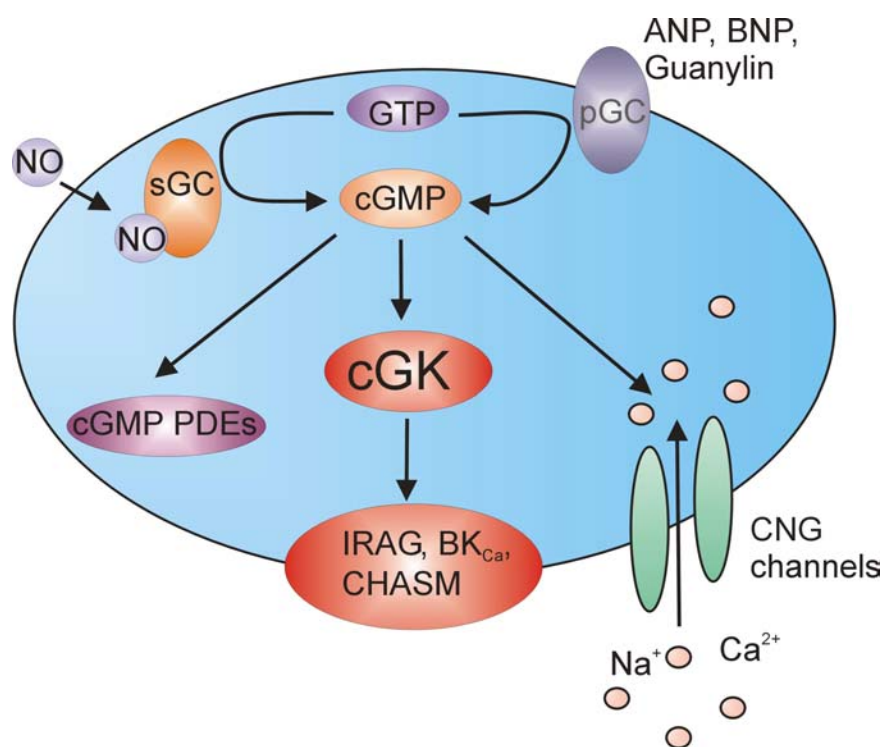


Abb 2: Der cGMP Signalweg

ANP, „atrial natriuretic peptide“; BNP, „brain natriuretic peptide“; cGK, cGMP-abhängige Proteinkinase; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat; BK_{Ca}, kalziumabhängiger Kaliumkanal; CHASM, „calponin homology-associated smooth muscle“; „CNG channels“, „cyclic nucleotide gated cation channels“; GTP, Guanosin-5'-triphosphat; IRAG, Ins (1,4,5) P₃-Rezeptor-assoziiertes cGKIß Substrat; Phosphodiesterase, PDE; pGC, partikuläre Guanylylzyklase; NO, Stickstoffmonoxid; sGC lösliche Guanylylzyklase

Struktur der cGK

Die cGK ist eine Serin/Threoninkinase, welche die Aminosäuren Serin und Threonin eines Substrates spezifisch phosphoryliert. Im Vertebraten gibt es zwei als Homodimere vorliegenden Formen, die lösliche cGKI (77 kDa/Monomer) und die membrangebundene cGKII (87 kDa/Monomer). Durch die Verwendung von zwei alternativen Exons entstehen zwei Isoformen der cGKI, die cGKI α und die cGKI β . Diese beiden Varianten unterscheiden sich in ihrem Aminoterminus (ca. 100 Aminosäuren) und in ihrer Aktivierbarkeit durch cGMP. Die cGKI ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut: dem Aminoterminus, der regulatorischen und der katalytischen Domäne. Die regulatorische Domäne enthält zwei cGMP-Bindungsstellen und die katalytische Domäne besitzt eine MgATP-Bindungsstelle und eine Peptidbindungstasche für die Interaktion mit dem Substrat. Nach Aktivierung durch cGMP wird der γ -Phosphatrest des ATPs auf ein spezifisch gebundenes Substrat übertragen. In Abwesenheit von cGMP dient der Aminoterminus der Autoinhibierung der katalytischen Domäne. Des Weiteren ist er für die Dimerisierung, die Affinität und Kooperativität der cGMP-Bindungsstellen und für die intrazelluläre Lokalisation verantwortlich. Das Binden von cGMP an der regulatorischen Domäne führt zur Konformationsänderung, wodurch die Autoinhibierung aufgehoben wird, das Substrat mit der katalytischen Domäne interagieren kann und phosphoryliert wird (Pfeifer et al., 1999, Hofmann et al., 2000).

Funktion der cGKI in glatten Muskelzellen

Eine gut untersuchte und anerkannt wichtige Aufgabe der aktivierten cGKI ist die Relaxation von glatten Muskelzellen. Die cGKI spielt somit eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus (Hofmann et al., 2000, Hofmann, 2005, Lincoln et al., 2001, Pfeifer et al., 1999). Bei der Relaxation über den cGMP/cGKI Signalweg können kalziumabhängige (Hofmann et al., 2000) und kalziumunabhängige (Somlyo und Somlyo, 2000) Mechanismen beeinflusst werden. Bis jetzt sind einige potenzielle in vivo Substratproteine der cGKI in glatten Gefäßmuskelzellen identifiziert worden. So trägt z.B. die Phosphorylierung von Ins (1,4,5) P₃-Rezeptor-assoziiertes cGKI β Substrat (IRAG) und von kalziumabhängigen Kaliumkanälen (BK_{Ca}) durch die cGKI über eine Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Relaxation glatter Gefäßmuskeln bei (Schlossmann et al., 2000, Alioua et al., 1998). Die Relaxation glatter Muskelzellen ohne eine Veränderung der intrazellulären

Kalziumkonzentration (kalziumunabhängig) nennt man Kalziumdesensibilisierung. Die molekularen Mechanismen, die zur Kalziumdesensibilisierung über den cGMP/cGKI Signalweg führen, sind weitgehend unbekannt. Diskutiert wird eine Beteiligung der regulatorischen Myosin-bindenden Untereinheit der Myosin Phosphatase 1 (Surks et al., 1999) und von „calponin homology-associated smooth muscle“ (CHASM), ein neues Mitglied der smoothelin Proteinfamilie (Borman et al., 2004). Die Identifizierung neuer cGKI-Substratproteine bei der Relaxation könnte zu einem besseren Verständnis und damit zu neuen Therapieansätzen von Bluthochdruck führen.

Die Rolle von cGMP und der cGKI bei der Regulation des Phänotyps und der Genexpression kultivierter VSMCs wurde von Boerth et al. und Lincoln et al. beschrieben (Boerth et al., 1997, Lincoln et al., 1998). Die phänotypische Modulation, Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sind wichtige Ereignisse bei der Entstehung von Atherosklerose und von Restenosen. Inwieweit die cGKI an der Regulation der Genexpression, der Proliferation und der phänotypischen Modulation beteiligt ist, bleibt unklar (Eigenthaler et al., 1999, Lincoln et al., 2001). Während bei der funktionellen Analyse des NO/cGMP/cGKI Signalweges in kultivierten VSMCs manche Studien eine NO/cGMP induzierte Proliferation von VSMCs beschreiben, findet man in anderen Studien eine Inhibierung des Wachstums von VSMCs durch NO und cGMP. Um die pathophysiologische Rolle der cGKI in vivo zu untersuchen, wurden gewebespezifische und zeitspezifische cGKI-Knockout Mäuse generiert (Wolfsgruber et al., 2003). Glattmuskel-spezifische cGKI-defiziente Mäuse (cGKI^{smko}) mit ApoE-defizientem Hintergrund zeigten in vivo eine verminderte atherosklerotische Plaquefläche und eine beeinträchtigte Entwicklung glattmuskel-artiger Plaquezellen (Wolfsgruber et al., 2003). Dies bedeutet, dass die cGKI in vivo die Atherosklerose und die mit ihr verbundene phänotypische Modulation von kontraktile VSMCs zu dedifferenzierten „atherogenen“, synthetischen Zellen fördert. In vitro Experimente konnten zeigen, dass cGMP, welches die endogene cGKI in primären VSMC-Kulturen aktiviert, das Wachstum und die morphologischen Veränderungen von Wildtyp VSMCs stimuliert, während man in cGKI-defizienten Zellen eine leichte Verminderung des Wachstums ohne eine Beeinflussung der Morphologie findet (Wolfsgruber et al., 2003). Der cGMP/cGKI Signalweg scheint demzufolge an der Förderung der Proliferation beteiligt zu sein. Die cGKI Aktivierung in VSMCs führt zu einer erhöhten Expression von Markerproteinen der phänotypischen Modulation wie

VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1“), PPAR- γ („peroxisome proliferator-activated receptor γ “) und zur Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges („phosphatidylinositol 3 kinase“/Akt Kinase) (Wolfsgruber et al., 2003). Diese Studien legen nahe, dass der NO/cGMP/cGKI Signalweg über die Genexpression das Proteinexpressionsmuster von VSMCs beeinflusst und eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von „atherogenen“ VSMCs in vitro und in vivo spielt. Die molekularen Mechanismen, die bei der cGKI-vermittelten phänotypischen Modulation mitwirken, sind bislang unbekannt. Eine Aufklärung dieser Mechanismen und Identifizierung neuer Substratproteine der cGKI könnte daher zu einem besseren Verständnis der Entstehung von Gefäßkrankheiten führen.

1.3 Proteom- und Phosphoproteomanalyse mittels 2D Gelelektrophorese

Der Begriff „proteome“ (dt. Proteom) wurde erstmals auf der ersten 2D Elektrophorese-Tagung 1994 in Siena von dem Australier Marc Wilkins geprägt und steht für „PROTEins expressed by the genOME“ (Wilkins et al., 1996). Das Proteom ist als Momentaufnahme der Proteinexpression einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu verstehen und so existiert für jeden zellulären Zustand ein Proteom. Auf diese Weise kann man die Dynamik einer lebenden Zelle beschreiben (Kellner, 2000). Leichte Veränderungen der Bedingungen wie z.B. Stress, Krankheitsauslöser oder Medikamenteneffekte können zu einer Veränderung des Proteinexpressionsprofils führen, und vice versa können durch den Vergleich der Proteinprofiländerungen Informationen über Krankheiten und Therapien gewonnen werden. Das Ziel der entdeckungsorientierten Proteomforschung (Proteomik) ist es, biologische Vorgänge wie z.B. das Entstehen von Atherosklerose zu verstehen, indem die subzelluläre Verteilung, die Quantität, die Struktur, die posttranslationale Modifikation von Proteinen und die Interaktion mit anderen Proteinen untersucht wird (Patterson et al., 2003). Ein Hauptmechanismus der Signalweiterverarbeitung auf molekularer Ebene stellt die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten von Proteinen dar. Um Signaltransduktionsmechanismen besser zu verstehen, ist es auch notwendig, alle phosphorylierten Proteine unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren. Verglichen zu den RNA-Analysen, den sogenannten Transkriptomstudien, kann man mit der Phosphoproteomanalyse phosphorylierte

Proteine erkennen, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Hierzu dient die Phosphoproteomanalyse (Mann et al., 2002).

Zentraler Bestandteil des Methodenarsenals der Proteomik ist die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese, die derzeit die empfindlichste Methode zur Auftrennung komplexer Proteingemische ist (Görg et al., 2000). Die Technik der 2D Gelelektrophorese wurde bereits 1975 durch O'Farrell und Klose eingeführt (Klose, 1975, O'Farrell, 1975) und beinhaltet eine Trennung eines Proteingemisches in bis zu 1000 Proteinspots in zwei Schritten (Pandey and Mann, 2000). In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine in einem pH-Gradienten entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte separiert. In der zweiten Dimension, der SDS-PAGE (SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese), erfolgt die Trennung dieser separierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MG) in einer zur IEF senkrechten Ebene. Danach kann das Proteinexpressionsmuster mittels bestimmter Färbetechniken sichtbar gemacht und die interessanten Spots mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert werden. Den wahren Durchbruch erlebte die 2D Gelelektrophorese erst Ende der 80er Jahre durch die Einführung von MALDI („matrix-assisted laser-desorption ionization“) und ESI („electrospray ionization“), zwei die Proteine schonenden Ionisationsmethoden für die MS. Die MALDI-TOF („MALDI-time of flight“) MS ist derzeit die Methode der Wahl zur Identifizierung von Proteinen, die mittels der 2D Gelelektrophorese separiert worden sind (Patterson, 2003). Die 2D Gelelektrophorese ist eine ausgezeichnete Methode zur Analyse der differentiellen Proteinexpression und der posttranslationalen Modifikationen.

Da sich Krankheiten und Wirkungen von beispielsweise toxischen Medikamenten häufig auf Proteinebene manifestieren, ist die Proteomanalyse wichtig für die Entdeckung von Krankheitsmarkern, von toxischen Medikamentenmarkern und für das Verständnis der Pathophysiologie bestimmter Krankheiten.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die phänotypische Modulation kontraktiver VSMCs in dedifferenzierte synthetische Zellen spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose und bei der Bildung von Restenosen nach Gefäßverletzungen. Um die Pathogenese dieser Gefäßkrankheiten besser zu verstehen, ist es deshalb wichtig, die molekularen Mechanismen der phänotypischen Modulation aufzudecken.

Den synthetischen Phänotyp nach Gefäßverletzungen und in atherosklerotischen Plaques findet man auch in aus der Aorta isolierten primär kultivierten VSMCs. Daher stellt die Kultivierung primärer VSMC ein Modell zur Untersuchung der phänotypischen Modulation dar und kann Rückschlüsse auf die in vivo Situation zulassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Proteine zu identifizieren, die in „gesunden“ (kontraktilen) und „kranken“ (phänotypisch modulierten) synthetischen VSMCs differentiell exprimiert werden. Hierzu wurde das Proteinexpressionsmuster von nativen, kontraktilen VSMCs aus der Mauseorta mittels 2D Gelelektrophorese mit dem von synthetischen Zellen aus der Primärkultur von VSMCs verglichen. Anschließend wurden die Proteine, die im Verlauf der phänotypischen Modulation differentiell exprimiert wurden, mittels MS identifiziert. Mit Hilfe dieses entdeckungsorientierten Ansatzes sollten synthetische Muskelzellen genauer charakterisiert werden und neue Markerproteine des synthetischen Phänotyps gefunden werden.

Die Wirkungsweise des cGMP/cGKI Signalweges auf die phänotypische Modulation von VSMCs ist noch weitgehend unbekannt. Bis jetzt sind nur wenige potenzielle Substrate der cGKI bekannt. Die Schwierigkeit hierbei ist es, Substrate zu finden, die in vivo selektiv von der cGKI phosphoryliert werden und nicht über die cGMP-vermittelte Kreuzaktivierung der Proteinkinase A phosphoryliert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, spezifische in vivo Substrate der cGKI in VSMCs mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese zu identifizieren. Dazu sollte das Phosphoproteom nach cGMP-Stimulation in Wildtyp und cGKI-defizienten VSMCs verglichen werden. Insgesamt sollte die Identifizierung neuer Substratproteine der cGKI und neuer Markerproteine phänotypisch modulierter VSMCs zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Gefäßkrankheiten beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung von VSMCs

Um Primärkulturen von VSMCs anzulegen, wurden Mäuseaorten präpariert, enzymatisch verdaut und die gewonnenen Zellen in 10 cm Kulturschalen kultiviert. Für den Proteomansatz zur Untersuchung differentiell exprimierter Proteine wurden 6-7 Wochen alte cGKI +/L1 (Wegener et al., 2002) und cGKI +/- Mäuse mit dem genetischen Hintergrund SV129 oder C57/BL6 verwendet. Hierbei wurden Tiere aus Würfen verwendet, die bezüglich Alter und Geschlecht vergleichbar waren. Die Experimente wurden mit dem Buchstaben Z und einer aufsteigenden Zahl beschriftet. Je Experiment wurden 10 halbe Aorten zusammengefaßt. Für den experimentellen Phosphoproteomansatz zur Identifizierung der Substratproteine der cGKI wurde eine Gruppe von cGKI +/- Mäusen im Alter von 4 Wochen mit der von cGKI L1/L1 (cGKI-defizienten) Mäusen aus dem gleichen Wurf verglichen. Die Zellen wurden in DMEM („Dulbecco’s modified Eagle medium“, Gibco) mit 10% FCS („fetal calf serum“) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Herstellung der VSMC Primärkultur

Die Mäuse wurden mit Diethylether getötet und ihre Aorta herauspräpariert. Danach erfolgte eine Entfernung des umgebenden Fettgewebes in PBS („phosphate buffered saline“). Für den Proteomansatz wurde die eine Hälfte der Aorta für die Kultur verwendet und die andere Hälfte für die Gewinnung von Aortenprotein in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die zerkleinerten Aorten (n=10 halbe Aorten) für die Kultur wurden in 1 ml steril filtrierter Enzymlösung A bei 37°C für 40-45 min angedaut. Nach Zentrifugieren mit 150xg wurde der Überstand verworfen und die Aorten in Enzymlösung B bei 37°C für 20 min inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme mit 10 ml DMEM Medium mit 10% FCS musste zum richtigen Zeitpunkt erfolgen, d.h. sobald sich die Zellen in Lösung B aus dem Zellverband gelöst haben. Die einzelnen, in 10 ml Medium gelösten Zellen wurden für 10 min bei 950 rpm zentrifugiert (Zellkultur Zentrifuge: Hettich Rotanta/AP). Der Überstand wurde verworfen. Dann erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 2 ml Medium mit 10% FCS und die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Hierzu wurde zur Vitalitätsbeurteilung 45 µl Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau versetzt. Die Ausbeute je Aorta lag bei etwa 240.000 Zellen mit einer Vitalität von 96%. Je Kulturschale (d=10 cm) wurden 600.000 Zellen in 10 ml Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesäht. Für den Proteomansatz wurden die Zellen am 7. Tag bei 80-100% Konfluenz geerntet. Für den Phosphoproteomansatz erfolgte die Kultivierung der Zellen für 5 Tage und danach die Überführung in serumfreies DMEM Medium für 2 Tage. Nach 2 Tagen in SRF (serumfreies DMEM Medium) wurde die in vivo Phosphorylierung mit 1 mM 8-Br-cGMP gestartet (2.4.1).

Substanzen zur Herstellung der VSMC-Primärkultur:

(Enzym)-Stammlösungen:

gelöst in Ca-freiem Medium

Papain (Sigma, T-3260)	7 mg/ml
Kollagenase (Sigma, C-7926)	10 mg/ml
Hyaluronidase (Sigma, H-3506)	10 mg/ml
BSA (Roth)	100 mg/ml
DTT (Roth)	100 mg/ml

Ca-freies Medium:

	M (g/mol)	Konz. (mM)	Menge (g)
Na-glutamat (Roth)	169,1	85	14,37
NaCl (Roth)	58,44	60	3,5
HEPES (Roth)	238,3	10	2,38
KCl (Roth)	74,56	5,6	0,42
MgCl ₂ • 6H ₂ O	203,3	1	0,2
ad 1 l H ₂ O bidest	pH 7,4	Autoklavieren	

Enzymlösung A:

	Vol (µl)	Endkonz. (mg/ml)
Papain	100	0,7
BSA	10	1
DTT	10	1
ad 1 ml Ca-freies Medium		

Enzymlösung B:

	Vol (µl)	Endkonz. (mg/ml)
Hyaluronidase	100	1
Kollagenase	100	1
BSA	10	1
ad 1 ml Ca-freies Medium		

2.2 Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen

2.2.1 Herstellung des Proteinextraktes

Proteinextrakt aus VSMC-Primärkulturen

Das Medium in der Kulturschale der konfluenten VSMC-Primärkulturen wurde abgesaugt und die Zellen dreimalig mit je 10 ml PBS gewaschen. Um eine Proteinkonzentration von etwa 1,2 µg/µl pro Kulturschale zu erhalten, wurden die Zellen in einem Volumen von 500 µl SDS-Lysepuffer lysiert. Es wurde ein SDS-Lysepuffer verwendet, da dieser Puffer mehr Proteine löst als ein CHAPS-Harnstoff Lysepuffer (Weinmeister, 2003). Danach wurden die Proteine bei 95°C für 10 min denaturiert und bei 18.000xg für 10 min zentrifugiert und der Überstand (= Proteinextrakt) bei -80°C gelagert.

Proteinextrakt aus Aorten

Der Proteinextrakt von etwa 8-10 halben Aorten wurde mit dem UltraTurrax in 1 ml SDS-Lysepuffer homogenisiert. Danach wurden die Schritte wie bei der Herstellung des Proteinextraktes aus der VSMC Primärkultur durchgeführt.

SDS-Lysepuffer:

	Menge (μ l)	Stammlösung	Endkonzentration
TrisHCl pH 8,3 (ICN)	210	1 M	21 mM
SDS (Roth)	670	10%	0,7%
β -Mercaptoethanol (Sigma)	170	100%	1,7%
ad 10 ml H ₂ O			

Zugabe von 2 μ l 100 mM PMSF (in Ethanol gelöst; Serin-/Threoninproteinaseinhibitor, Roth) je 10 ml SDS-Lysepuffer kurz vor Lyse der VSMC-Kultur

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry erfolgte mit dem Sigma Diagnostics Protein Assay Kit P 5656. Das Protokoll wurde gemäß Herstellerangabe durchgeführt. Das Prinzip der Lowry Prozedur basiert auf der Bildung eines blauen Komplexes aus Cu²⁺-Ionen der Biuret Reaktion und dem Folin-Ciocalteu Reagenz. Dieser Komplex dient als Maß der Proteinkonzentration. Für jede Proteinbestimmung wurde eine neue Eichkurve mit bovinen Serumalbumin (BSA) ermittelt. Für die Proteinproben wurden je 5-20 μ l Lysat eingesetzt und mit 1 ml bidest. Wasser aufgefüllt. Für den Leerwert wurde die entsprechende Menge SDS-Lysepuffer in 1 ml bidest. Wasser aufgefüllt. Danach wurde nach dem Protein Assay Kit Protokoll vorgegangen. Nach der Überführung der blaugefärbten Probe in eine Plastikküvette wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Mit Hilfe der Eichgerade aus den BSA-Proben wurde die Proteinkonzentration der Proben mit dem PRISM Programm berechnet.

2.2.3 Western Blot Analyse

Mit Hilfe des Western Blotes können Proteine in Zell- und Gewebeextrakten nachgewiesen werden (Sambrook et al., 1989). Hierbei werden die Proteine durch die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das SDS Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die denaturierten Proteine im Sammelgel fokussiert und im Trenngel separiert werden. Das Proteinlysate mit Probenpuffer wurde bei 95°C für 5 min denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene negativ geladene Sodiumdodecylsulfat (SDS) zerstört die nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen und bindet die Proteine zu einem SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis. Im elektrischen Feld von 160 mV werden die SDS-Proteinkomplexe durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylmatrix nach ihrem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt. Für Proteine mit einem MG von 17-70 kDa wurden 12%ige Trenngele verwendet. Bei einem MG von 40-100 kDa wurden 8%ige Trenngele hergestellt. Ein Größenstandard (See Blue[®] Plus2 Pre Stained Standard, Invitrogen) diente als Vergleichmaßstab. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine aus dem SDS-PAGE Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) (Immobilon-P Transfer Membrane, IPV HO0010, Millipore) in eine Blotkammer (Semi-Dry-Blot, T 788.1, Roth) mit 50 mA pro Gel transferiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine durch spezifische Bindung primärer Antikörper mittels enzymgekoppelter

Sekundärantikörper und anschließender Enzymsubstratvermittelter Farbreaktion (alkalische Phosphatase-Technik) bzw. mit der Chemilumineszenzmethode (ECL-Reaktion, Amersham). Als Ladungskontrolle diente der Akt-Antikörper (Akt Kinase). Eine Aufstellung der verwendeten Antikörper ist im Anhang (7.1) zu finden. Der Western Blot wurde nach dem laborüblichen Protokoll durchgeführt.

Western Blot Protokoll:

- Die Proteinproben wurden mit 6x Probenpuffer (10 µl/60 µl Probenlösung) und H₂O verdünnt, sodass eine Konzentration von 1-2 µg/µl entstand. Danach wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und zentrifugiert (5 min, 12.000xg).
- Trenn- und Sammelgel wurden gegossen.
- Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 mV durchgeführt und kurz vor Herauslaufen des Markers (Lauffront) beendet.
- Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in dem Gel auf eine zuvor mit 100% Methanol benetzte PVDF-Membran geblottet. Dafür wurden mit Puffer getränkte Filterpapiere, die Membran und das Gel in folgender Reihenfolge zwischen Anoden- und Kathodenplatte luftblasenfrei aufeinandergelegt.

Oben Kathodenplatte
 9 Filterpapiere/Kathodenpuffer
 Trenngel
 PVDF-Membran (Immobilon-P)
 3 Filterpapiere/Anodenpuffer II
 6 Filterpapiere/Anodenpuffer I

Unten Anodenplatte

- Es wurde 60 min bei 50 mA/Gel geblottet und danach wurde die PVDF-Membran bei Raumtemperatur (RT) für 60 min in Blockierungs-Lösung und danach 10 min in TBST gewaschen.
- Die Inkubation mit primären Antikörper wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt.
- Die Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers erfolgte durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit Milchpulver-TBST bei RT.
- Die Inkubation mit sekundären Antikörper erfolgte bei RT für 60 min.
- Für die Entfernung des nichtgebundenen sekundären Antikörpers wurde mit Milchpulver-TBST für 5 min und zweimal mit TBST für 5 min gewaschen.
- Zum Entwickeln wurde die Membran in AP-Puffer Mix gelegt und so lange geschüttelt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Erfolgte der Nachweis mit der Chemilumineszenzmethode (ECL Reaktion) wurde nach dem Protokoll des ECLTM Western blotting analysis system (Amersham) vorgegangen.

Reagenzien:

6x Probenpuffer (6x PP):	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8	7 ml
	Glycerol	3,6 ml
	10% SDS	1 g
	DTT	0,93 g

Material und Methoden

	12% Bromphenolblau	1,2 g
	H ₂ O	ad 10 ml
30% APS:	30% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Roth)	30 g
	H ₂ O	ad 100 ml
Sammelgel 4%:	Rotiphorese Gel 30 ^a	0,65 ml
	4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8	1,25 ml
	H ₂ O	3,05 ml
	30% APS	12,5 µl
	TEMED (Roth)	5 µl
	^a 30% Acrylamid, 0,8% N, N'-Methylenbisacrylamid	
Trenngel 8%:	Rotiphorese Gel 30 ^a	4,5 ml
	4x Tris-Cl/SDS, pH 8,8	3,75 ml
	H ₂ O	6,75 ml
	30% APS	25 µl
	TEMED	10 µl
4x Tris-Cl/SDS, pH 8,8	1,5 M Tris-Base	91 g
	H ₂ O	300 ml
	Mit 1N HCl auf pH 8,8 einstellen	
	H ₂ O	ad 500 ml
	0,4% SDS	2 g
4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris-Base	6,05 g
	H ₂ O	40 ml
	Mit 1N HCl auf pH 6,8 einstellen	
	H ₂ O	ad 100 ml
	0,4% SDS	0,4 g
10x SDS-Laufpuffer	Tris-Base	15,1 g
	Glycin (Roth)	72 g
	SDS	5,0 g
	H ₂ O	ad 500 ml
Anodenlösung I, pH 10,4	0,3 M Tris-Base	36,3 g
	20% Methanol, techn.	200 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	mit 1N HCl auf pH 10,4 einstellen	

Material und Methoden

Anodenlösung II, pH 10,4	20 mM Tris-Base	3,03 g
	20% Methanol, techn.	200 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	mit 1N HCl auf pH 10,4 einstellen	
Kathodenlösung, pH 7,6	40 mM γ -Aminohexansäure (Roth)	5,2 g
	20 mM Tris-Base	3,03 g
	20% Methanol, techn.	200 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	mit 1N HCl auf pH 7,6 einstellen	
10xTBS	10 mM Tris-Base	6,05 g
	150 mM NaCl	43,8 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
	mit 1N HCl auf pH 8,2 einstellen	
Blockierungs-Lösung	BSA (Roth)	2,5 g
	10x TBS	5 ml
	Tween 20 (ICN)	1 ml
	H ₂ O	ad 250 ml
TBST	10x TBS	25 ml
	Tween 20 (Roth)	0,5 ml
	H ₂ O	ad 250 ml
Milchpulver-TBST	Milchpulver (Reformhaus)	5,0 g
	10x TBS	50 ml
	Tween 20	1 ml
	H ₂ O	ad 500 ml
10% Natriumazid	NaN ₃ (Sigma)	10 g
	H ₂ O	ad 100 ml
Lösung mit primärem Antikörper		
	1x TBS, sterilfiltriert	15 ml
	BSA (1:200 in H ₂ O)	75 μ l
	NaN ₃ (10%)	75 μ l
	primärer Antikörper (Stammlösung)	
Lösung mit sekundärem Antikörper		
	Milchpulver-TBST	15 ml

sekundärer Antikörper

AP-Puffer, pH 9,5	100 mM Tris Base	2,4 g
	100 mM NaCl	1,17 g
	5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,203 g
	H ₂ O	ad 200 ml
	mit 1N HCl auf pH 9,5 einstellen	
AP-Puffer Mix	AP-Puffer, pH 9,5	20 ml
	NBT (Sigma) 50mg/ml in 70% DMSF	80 µl
	BCIP (Sigma) 50mg/ml in 50% DMSF	80 µl

2.2.4 2D Gelelektrophorese

Die von O`Farrel und Klose 1975 eingeführte 2D Gelelektrophorese trennt Proteine aus Gewebe- und Zellextrakten in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrem MG. Die von Görg et al. entwickelten immobilisierten pH-Gradienten verbesserten die Reproduzierbarkeit und Auflösung der 2D Gele (Görg et al., 2000).

Die experimentellen Schritte der 2D Gelelektrophorese sind:

- Probenvorbereitung
- IPG-Strip Rehydratisierung
- IEF (isoelektrische Fokussierung, 1. Dimension)
- IPG-Strip Equilibrierung
- SDS-PAGE (2. Dimension)
- Visualisierung (Coomassie-, Silberfärbung)

Anschließend erfolgt die Analyse der Proteine mittels Massenspektrometrie.

Probenvorbereitung und IPG-Strip Rehydratisierung :

Da für die 2D Gelelektrophorese die SDS-Konzentration <0,7% und die Salzkonzentration <10 mM sein sollte, wurden die Proben bei einer Proteinkonzentration von <2 µg/µl mit der Methanol-Chloroform Fällung nach Wessel und Flugge gefällt (Wessel und Flugge, 1984). Hierbei wurden 150 µl Probe nach Zugabe von vier Volumina Methanol (600 µl) und Zugabe von einem Volumen (150 µl) Chloroform gevortext. Nach anschließender Zugabe von drei Volumina (450 µl) bidestilliertem Wasser, gefolgt von Vortexen, wurde die Probe 1 min bei 18.000xg in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde abgezogen und verworfen und drei Volumina (450 µl) Methanol zugegeben. Nach gründlichem Schütteln und Zentrifugation (1 min, 18.000xg) erfolgte das Abziehen des luftgetrockneten Pellets, Resuspendierung in Rehydratisierungspuffer (350 µl) und Belassen für 30 min bei RT.

Material und Methoden

Vor der IEF wurde der IPG-Strip (Amersham Biosciences, 18cm) mit einem bestimmten pH-Ausschnitt (z.B pH 5-6) in dem Immobiline DryStrip Reswelling Tray (Amersham) rehydratisiert. Hierfür ging die Verteilung der resuspendierten Probe entsprechend der Länge des IPG-Strips in einer Rinne des Reswelling Trays vonstatten und der IPG-Strip wurde in diese Rinne gelegt. Um eine Evaporation zu vermeiden, wurden die IPG-Strips mit DryStrip Cover Fluid (Amersham) überschichtet. Die Rehydratisierungszeit betrug etwa 24 Stunden.

Rehydratisierungspuffer (pro ml):

Harnstofflösung (~9,5 M; gelöst in bidest H ₂ O)	1 ml
CHAPS (2% w/v, Roth)	20 mg
DTT (1% w/v, Roth)	10 mg
IPG-Puffer (2% v/v) des entsprechenden pH-Bereichs (Amersham)	20 µl

Isoelektrische Fokussierung:

Die über Nacht rehydratisierten IPG-Strips wurden in dem Immobiline DryStrip Aligner (Amersham) positioniert und die Elektrodenstrips mit den Elektroden angebracht. Danach erfolgte die Fokussierung.

Programm für die Fokussierung:

1 h 15 min	300 V	1 mA	3 W
1 h 15 min	600 V	1 mA	3 W
~14 h	3500 V	1 mA	3 W

IPG-Strip Equilibrierung:

In diesem Schritt erfolgte die Umpufferung des IPG-Strips, sowie die Reduktion und Alkylierung, damit die Proteine die richtigen Eigenschaften für die zweite Dimension erhielten.

Die erste Equilibrierung wurde in DTT-Equilibrierungspuffer und die zweite in Iodacetamid-Equilibrierungspuffer durchgeführt.

15 min: 100 mg DTT (Roth) in 10 ml Equilibrierungspuffer

15 min: 400 mg Iodacetamid (Sigma) in 10ml Equilibrierungspuffer

Equilibrierungspuffer:

Harnstoff (Roth)	6 M	3,6 g
SDS (Roth)	2% (w/v)	200 mg
Glycerin (Roth)	30% (w/v)	3 g
Resolving Puffer pH 6,8 ad 10 ml H ₂ O		333µl

Resolving Puffer pH 6,8

Tris (Roth)	50 mM	1,82 g
SDS (Roth)		40 mg
Bromphenolblau (Roth) ad 10 ml H ₂ O		50 µl

SDS-PAGE - 2. Dimension:

Für die Trennung der Proteine nach ihrem MG wurden ExcelGel SDS Homogenous 12,5 2D Gele (Amersham) auf die 15°C kalten Kühlplatten des Multiphor II Flachbett Systems positioniert und die Kathoden und Anoden ExcelGel Buffer Strips (Amersham) entsprechend der Laufrichtung auf das Gel gelegt. Danach wurde ein IPG-Strip an der Kathode plaziert, 1 µl „low molecular weight marker“ (Amersham) aufgetragen und der Vorlauf (10 mA je Gel, 40 W, 100 V) mit anschließendem Hauptlauf (40 mA je Gel, 100 W, 600 V) gestartet.

Programm für den Lauf der zweiten Dimension:

50 min	10 mA je Gel	40 W	100 V
1 h 25 min	40 mA je Gel	100 W	600 V

2.2.5 Detektion von Proteinen mittels Silber- und Coomassiefärbung

Silberfärbung für analytische Gele:

Die analytische Auswertung geschah unter Verwendung einer sensitiven Silberfärbung. Reproduzierbare Ergebnisse lieferte der PlusOne Silver Staining Kit (Amersham).

Protokoll der Silberfärbung:

Fixieren	Ethanol (Roth, ≥95% per analysis)	100 ml	30 min
	Eisessig (Roth)	25 ml	
	auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.		
„Sensitizing“	Ethanol (Roth)	75 ml	30 min
	Glutardialdehyd (25% w/v)	1,25 ml	
	Natriumthiosulfat (5% w/v)	10 ml	
	Natriumacetat (17 g)	1 Päckchen	
	auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.		
Waschen	H ₂ O bidest.		3 x 5min
Silberreaktion	Silbernitrat (2,5% w/v)	25 ml	20 min
	Formaldehyd (37% w/v)	0,1 ml	
	auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.		
Waschen	H ₂ O bidest.		2 x 1 min
Entwickeln	Natriumcarbonat	6,25 g	2-5 min
	Formaldehyd (37% w/v)	0,05 ml	
	auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.		

Material und Methoden

Stoppen	EDTA-Na•2 H ₂ O auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	3,65 g	10 min
Waschen	H ₂ O bidest.		3 x 5 min
„Preserving“	Glycerin (87% w/v) (Roth) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	25 ml	20 min

Coomassie Blue G-250 Färbung für präparative Gele:

Für präparative Gele fiel die Wahl auf die Coomassie Färbung, da es schwierig ist, silbergefärbte Gele mit dem Massenspektrometer zu analysieren.

Protokoll der kolloidalen Coomassie Färbung

Fixieren	30% (v/v) Ethanol (Apotheke) 2% (v/v) Phosphorsäure (85%) (Roth)	3 x 30 min
Waschen	2% (v/v) Phosphorsäure (Roth)	3 x 20 min
Equilibrieren	2% (v/v) Phosphorsäure 18% (v/v) Ethanol (Apotheke)	30 min
Färben	Zugabe 1% (v/v) 20g Brilliant Blue G/l (Amersham)	24-72 h
Entfärben (optional)	H ₂ O	

2.3 Semiquantitative RT-PCR

Mittels der semiquantitativen RT-PCR, die von R. Ferstl im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt wurde, wurde die relative RNA Menge von Stathmin in Aorten und VSMCs bestimmt.

Bei dem Arbeiten mit RNA muss eine Kontamination mit RNAsen verhindert werden. RNAsen sind sehr stabile Enzyme, die mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) inaktiviert werden. Aus diesem Grund wurden sämtliche Lösungen zur Isolierung von RNA bzw. zur Synthese von cDNA mit DEPC behandeltem Wasser angefertigt.

Für die semiquantitative RNA Bestimmung wurde RNA aus den halbierten Aorten und aus den 7 Tage lang in serumhaltigem Medium kultivierten VSMCs isoliert. Nach dem DNase Verdau mittels DNase

(Roche) erfolgte die reverse Transkription. Hierzu wurde die RNA mittels der MMLV-RT („moloney murine leukemia virus reverse transcriptase“, Invitrogen), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben. Durch Zugabe der Taq-Polymerase (Promega) wurde die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR), die ein in vitro Verfahren zur selektiven Amplifikation definierter Nucleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nucleinsäuremolekülen (Mullis et al., 1987, Saiki et al., 1988) darstellt, gestartet. In einem zyklischen Prozess (35 Zyklen) wurden folgende Reaktionsschritte pro Zyklus durchlaufen:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. Denaturierung: | Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges |
| 2. Primeranlagerung (Annealing): | spezifische Bindung zweier gegenläufiger Oligonucleotid-Primer an den kodierenden (forward Primer) bzw. den nicht-kodierenden Strang (reverse Primer) |
| 3. Polymerisation (Elongation): | Synthese des fehlenden, komplementären Einzelstranges durch eine hitzestabile DNA-Polymerase |

Für eine semiquantitative Bestimmung der RNA von Stathmin wurde für jede RT-PCR ein interner Standard verwendet. Als interner Standard wurden Primer für das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) gewählt. Dieses Enzym des Purin-Stoffwechsels wird ubiquitär in allen Zellen exprimiert. In einem Ansatz befanden sich die Primer für Stathmin und die Primer für den internen Standard, sodass bei jeder RT-PCR Stathmin und HPRT coamplifiziert wurden. Um eine Mitsynthesierung genomischer DNA auszuschliessen wurden intronflankierende Primer gewählt.

Primer	Gen	Sequenz in 5´-3´Richtung
Statfor	Stathmin	AGG TGA AAG AGC TGG AGA AGC
Statrev	Stathmin	TAG TCA GCC TCA GTC TCA TCC
HPRTfor	HPRT	GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC
HPRTrev	HPRT	CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CAA

Nach der Amplifikation wurde die cDNA nach 23, 26, 29, 32, 35 Zyklen pro Ansatz entnommen und auf das Agarosegel (Seakem® LE Agarose, Cambrex) geladen.

Auftrennung der cDNA-Fragmente:

Da Nucleinsäuren negativ geladen sind und ihr Ladungs- zu Masseverhältnis konstant ist, können sie in einem elektrischen Feld in einem Gel nach Masse aufgetrennt werden. Zur Auftrennung der DNA wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sambrook et al., 1989). Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten DNA-Fragmente im UV-Licht (λ 302nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Für den Größenvergleich der Nucleotidfragmente diente ein DNA-Standard.

Densitometrie:

Für die semiquantitative Bestimmung der RNA Menge von Stathmin wurde der densitometrisch ermittelte Wert der jeweiligen HPRT Bande als 100% definiert und der Wert der Stathmin Bande darauf bezogen (Programm AIDA, Version 2.11). Anhand des Quotienten konnte eine Hoch- bzw. Herunterregulation ermittelt werden.

2.4 Methoden zur Trennung und Detektion von Phosphoproteinen

2.4.1 In vivo Phosphorylierung von VSMCs mit ^{33}P

Da die cGKI nach Aktivierung durch cGMP die Übertragung der endständigen γ -Phosphatgruppe von ATP auf Substratproteine katalysiert, können Substrate über den cGMP-abhängigen Einbau radioaktiven Phosphates (^{33}P) identifiziert werden.

Für die Identifizierung der Substratproteine der cGKI wurden über 2 Tage serumfreigestellte primäre WT und cGKI-KO VSMC-Kulturen, welche vorher 5 Tage in serumhaltigem Medium kultiviert worden waren (siehe 2.1.), verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation der Kulturen in phosphatfreiem DMEM Medium („DMEM without sodium phosphate“, Gibco) wurden die Kulturen in phosphatfreies DMEM Medium mit 0,5 mCi/ml ^{33}P überführt. Die Zeit für die in vivo Phosphorylierung mit ^{33}P betrug 4 Stunden. Danach erfolgte die Stimulierung einer der zwei WT Kulturen und einer der zwei KO Kulturen mit 1 mM 8-Br-cGMP für 30 min. Nach 30 Minuten wurden alle Kulturen geerntet.

2.4.2 Herstellung des Proteinextraktes

Proteinextrakt aus VSMC-Primärkulturen

Vor Lysieren der Kulturen in 1 ml SDS-Lysepuffer pro Kulturschale wurde dreimal mit phosphatfreiem DMEM gewaschen. Danach erfolgte die Proteinextraktherstellung wie unter 2.2.1.

2.4.3 2D Gelelektrophorese

Die 2D Gelelektrophorese wurde wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die IEF bei jedem Experiment gleich lange durchgeführt und die Gele von unstimulierten und cGMP-stimulierten WT VSMCs parallel angefertigt. Die Visualisierung geschah mittels Autoradiographie bzw. Phosphoimager.

2.4.4 Detektion radioaktiver Proteine mittels Phosphoimager und Autoradiographie

Die phosphorylierten Proteine auf dem 2D Gel konnten mit einer ^{33}P sensitiven Platte (Storage Phosphor Screen super sensitive type ST, CycloneTM), deren Expositionszeit auf dem Gel im Dunkeln 24 Stunden betrug, im Phosphoimager (Fujifilm, Phosphoimager BAS-1500) dargestellt werden. Maximale Auflösung und Schärfe für die direkte Detektion von ^{33}P -markierten Proben lieferte die Autoradiographie mit Expositionszeiten von 2 Wochen. Hierfür wurden Biomax MR Filme (Biomax MR cat 873 6936, Kodak) verwendet.

2.4.5 MS-kompatible Silberfärbung

Für präparative 2D Gele zur Analyse des Phosphoproteoms erfolgte die MS-kompatible Durchführung der Silberfärbung.

Protokoll der MS-kompatiblen Silberfärbung:

Fixieren	40% Ethanol (Roth, $\geq 95\%$ per analysis) 10% Eisessig (Roth) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	60 min
Waschen	30% Ethanol (Roth) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	2x20 min
Waschen	H ₂ O bidest.	20 min
„Sensitizing“	0,02% Natriumthiosulfat (5%w/v) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	1 min
Waschen	H ₂ O bidest.	2x20 sec
Silberreaktion	0,2% Silbernitrat (2,5% w/v) 0,025% Formaldehyd (37% w/v) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	20 min
Waschen	H ₂ O bidest.	2x20 sec
Entwickeln	3% Natriumcarbonat 0,05% Formaldehyd (37% w/v) auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	2-5 min
Stoppen	5% Essigsäure auffüllen auf 250 ml mit H ₂ O bidest.	10 min
Waschen	H ₂ O bidest.	2 x 10 min

2.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ende der 80er Jahre entwickelte Hillenkamp die MALDI-MS (Matrix unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie), eine Methode zur schonenden Erzeugung von

Ionen. Bei dieser Technik werden Proteinionen durch Beschuss mit einem UV-Laser Puls aus einem Kristall freigesetzt. Die Trennung und der Nachweis der Analytioneen erfolgen dann in einem TOF-Analysator („time of flight“), bei dem die Massenbestimmung über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Da die protonenbeladenen Ionen unterschiedliche Masse-/Ladungsverhältnisse und daher unterschiedliche Geschwindigkeiten haben, erreichen sie den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten. Diese Flugzeiten werden bestimmt und ausgewertet.

Die Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine auf den 2D Gelen erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. J. Kellermann (MPI, München) mittels MALDI-TOF.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Proteomanalyse von Aorten und primären VSMC-Kulturen

3.1.1 Experimenteller Ansatz

Bringt man native, kontraktile VSMCs in Kultur, so findet eine phänotypische Modulation zu synthetischen, „atherogenen“ Zellen statt. Native und modulierte VSMCs exprimieren ein unterschiedliches Spektrum von Zytoskelett-, Extrazellulärmatrix-, Rezeptor- und kontraktile Markerproteinen. Bei der Atherosklerose spielen VSMCs vom synthetischen Typ eine wesentliche Rolle. Welche Proteine diesen Prozess beeinflussen, ist bislang weitaus unbekannt.

Zur Analyse differentiell exprimierter Proteine während der phänotypischen Modulation wurde das Proteinexpressionsmuster von nativen VSMCs (aus Aorten) mit dem Proteinexpressionsmuster von synthetischen VSMCs (aus primären VSMC-Kulturen) mittels der 2D Gelelektrophorese Methode verglichen. Für die Analyse von nativen Zellen wurde der Proteinextrakt aus 10 Aortenhälften von WT Mäusen gepoolt, um individuelle Expressionsunterschiede zu nivellieren. Die anderen 10 Aortenhälften der WT Mäuse wurden zu einer primären VSMC-Kultur angesetzt (2.1). Der Proteinextrakt dieser VSMC-Kultur wurde für 2D Gele von synthetischen VSMCs verwendet. Hierbei wurden beide Gele für einen pH-Bereich von 5-6 parallel angefertigt (2.2.4) und direkt miteinander verglichen, um eine optimale Reproduzierbarkeit zu erhalten.

3.1.2 Unterschiede im Proteom von Aorten und primären VSMC-Kulturen

Nach der 2D Gelelektrophorese von Proteinextrakt aus Aorten und primären VSMC-Kulturen wurden die silbergefärbten 2D Gele ausgewertet. Dabei wurde auf Expressionserhöhungen (zunehmende Spots) und Expressionsabnahmen (abnehmende Spots) im pH-Bereich von 5-6 geachtet.

Ziel war es, Proteine zu finden, deren Expression während der phänotypischen Modulation reguliert wird. Dafür wurde folgender Ansatz gewählt:

Es wurde das Proteinmuster eines 2D Gels von Aorten mit dem Proteinmuster des parallel gefahrenen 2D Gels von primären VSMC-Kulturen verglichen. Die

Auswertung wurde mit Hilfe eines Leuchttisches nach Augenmaß durchgeführt. Hierbei konnten die zu vergleichenden Gele direkt übereinander gelegt werden. Die beiden Gele waren aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Methode zu einem großen Teil deckungsgleich. Für den pH-Bereich von 5-6 konnten 28 Unterschiede gefunden werden (Abb.3). Es wurden 16 Expressionszunahmen und 12 Expressionsabnahmen in den 2D Gelen von VSMC-Kulturen im Vergleich zu 2D Gelen von Aorten per Augenmaß detektiert. Hiervon konnten insgesamt 14 regulierte Proteinspots in fünf verschiedenen VSMC-Kulturen und den dazu gehörigen Aorten (2.1) bestätigt werden.

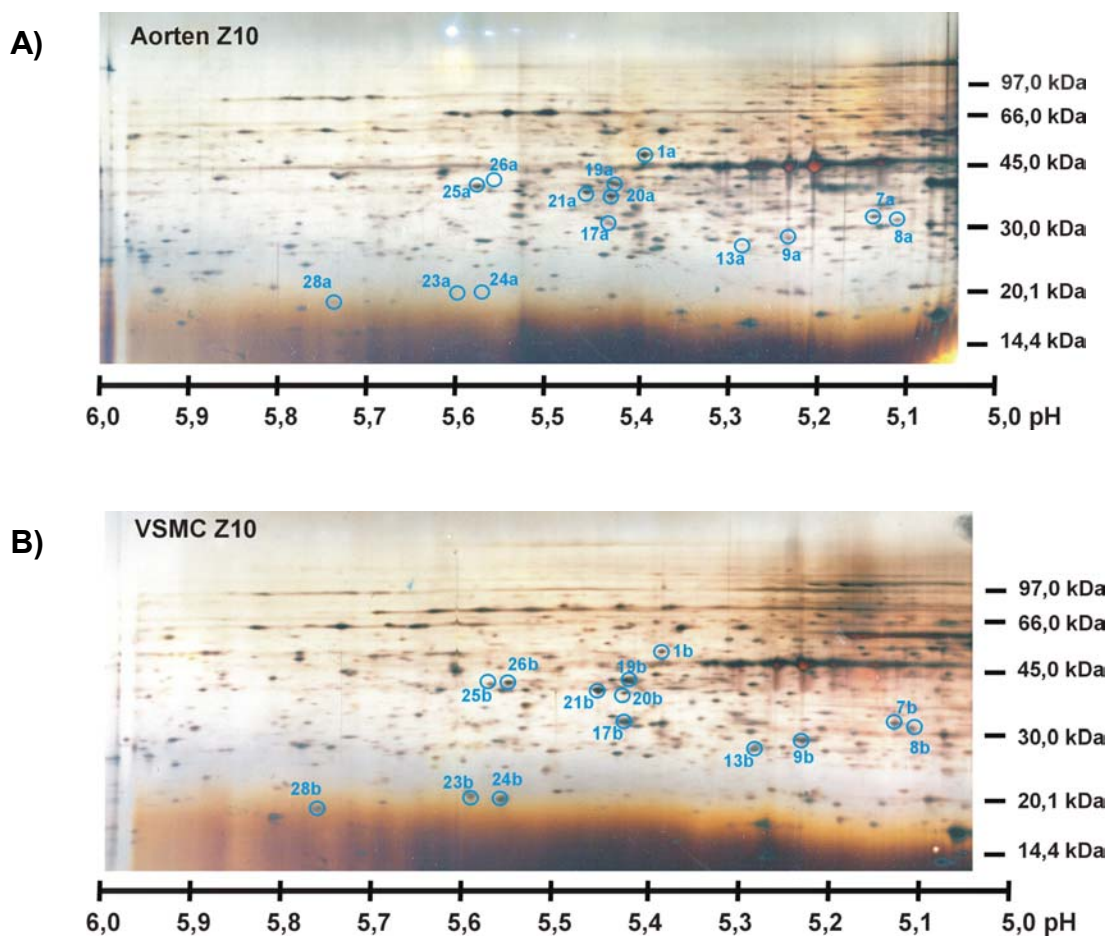


Abb.3: Proteinexpressionsmuster von Aorten (A) und VSMC-Kulturen (B) im pH-Bereich von 5-6

Es wurde 80 µg Proteinextrakt je 2D Gel aufgetragen. Die blau eingekreisten Spots sind diejenigen, welche reguliert und mittels MS analysiert wurden. Z10 steht für das zehnte Experiment (2.1). Die Spots auf dem VSMC Z10 2D Gel sind mit dem Buchstaben b versehen. Die Spots mit dem Buchstaben a gehören zu dem Aorten Z10 2D Gel. Verglichen wurde beispielsweise die Spotintensität des Spotpaares 1a/1b.

Die Abbildung 4 zeigt Beispiele für regulierte Spots im pH-Bereich von 5-6. Spot 1a und Spot 25a in Aorten wurden in VSMC-Primärkulturen zu Spot 1b und Spot 25b herunterreguliert. Andere Spots wie z.B. 23a, 24a und 26a aus Aorten wurden in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen hochreguliert.



Abb.4: Einzelne Änderungen im Proteinexpressionsmuster von Aorten im Vergleich zu VSMC-Kulturen

Im Vergleich: Spots aus Aorten und VSMC-Kulturen; Spot 1a und 25a in Aorten wurden in VSMC-Kulturen zu 1b und 25b herunterreguliert. Die Spots 23a, 24a und 26a erfuhren eine Hochregulation zu den Spots 23b, 24b und 26b.

Zur densitometrischen Bestimmung der Spots wurden die Gele eingescannt und das Programm AIDA (Version 2.11, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) verwendet. Das Auswerteverfahren war wie folgt:

Für jeden regulierten Spot wurde ein Referenzspot (nicht reguliert) in unmittelbarer Nähe gewählt, um Unterschiede auszugleichen, die durch die leicht variierende Silberfärbung oder durch geringe Unterschiede beim Proteinauftrag zustande kamen. Anschließend wurde der Hintergrundwert von den zu analysierenden Spots abgezogen und der regulierte Spot mit seinem Referenzspot in Verhältnis gesetzt (Abb.5). Der erhaltene Wert des regulierten Spots in Aorten wurde durch den Wert des Spots in VSMC-Kulturen geteilt (Tab.1). Die Werte der Spots sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Auswertung nach Augenmaß und mittels Computer ähnliche Resultate ergibt (Abb.5, Tab.1).

Ergebnisse

Tab.1: Auswertung der regulierten und identifizierten Spots per Densitometrie und per Auge

Der Pfeil ↓ bedeutet eine Herunterregulation. Eine Hochregulation ist mit dem Pfeil ↑ gekennzeichnet.

Spot Nr.	Protein	Abkürzung	Regulation VSMC/Aorta	
			Densitometrie	Auge
1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein, mitochondrial	Uqcrc1	0,6	2 fach ↓
7	Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	1,5	1 fach ↑
8	Ran-specific GTPase-activating protein	Ranbp1	1,8	1 fach ↑
9	Actin cytoplasmic1/2	ACTB	3	2 fach ↑
13	Apolipoprotein A1/nicht identifiziert	APA1	6,5	2,5 fach ↑
17	Actin cytoplasmic1/2	ACTB	4,4	2,5 fach ↑
19	Actin cytoplasmic1/2	ACTB	1,2	1,5 fach ↑
20	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit, mitochondrial	Pdhb	0,6	2 fach ↓
21	Annexin A3	Anxa3	1,2	2 fach ↑
23	Stathmin	Stathmin	2,6	2 fach ↑
24	Nicht identifiziert		2,1	2 fach ↑
25	Isocitrate dehydrogenase (NAD+) subunit alpha, mitochondrial	IDH3A	0,6	1,5 fach ↓
26	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1	Ddah1	4,5	2,5 fach
28	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	Ube2n	0,8	0,25 fach ↑

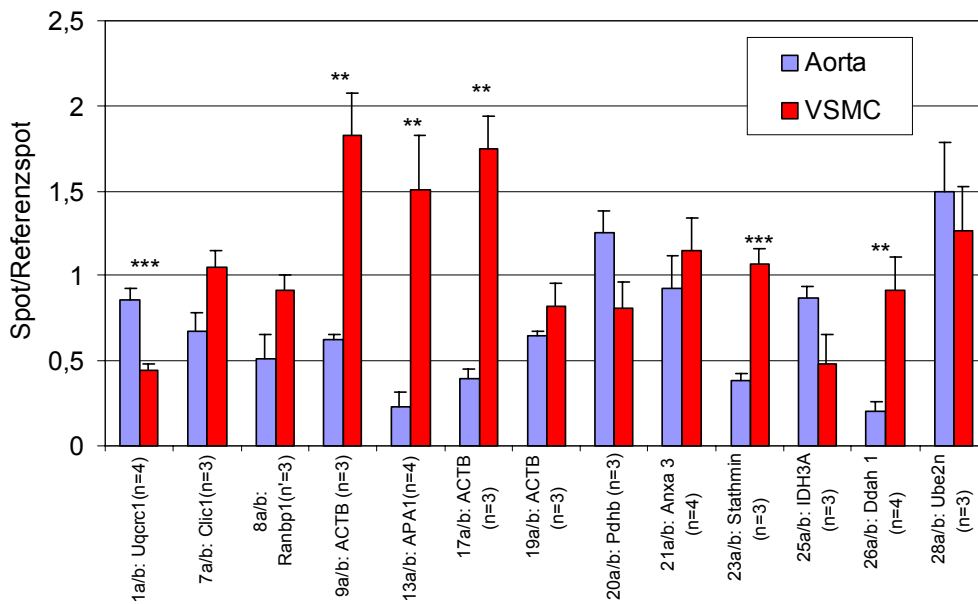


Abb.5: Densitometrische Auswertung der Silbergele im pH-Bereich von 5-6

Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (2 Populationen). Die Abkürzungen der einzelnen Spots sind der Tab. 1 zu entnehmen. (Spot 24 wurde nicht aufgenommen, da mangels Material nicht identifizierbar.) Die Wahrscheinlichkeiten p wurden mit einem Sternchen * wie folgt abgekürzt: p(0,05)=*; p(0,01)=**; p(0,001)=***. Der Buchstabe n ist die Abkürzung für die Anzahl der ausgewerteten Spots.

3.1.3 Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine mittels MS

Um die regulierten Spots mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer zu identifizieren, mussten die Spots ausgeschnitten werden und das Verhältnis aus Proteinmenge zu Gelmenge möglichst groß sein. Aus diesem Grund wurden präparative Coomassie Blue 2D Gele angefertigt (Abb.6). Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in bidestilliertem Wasser bei 4°C aufbewahrt und in Zusammenarbeit mit dem MPI (Dr. J. Kellermann) mittels Massenspektrometrie analysiert.

Die Tabelle 2 zeigt die Proteine, deren Spots für die MS-Analyse ausgeschnitten und analysiert wurden. Die isoelektrischen Punkte, die anhand der Lokalisation der Spots auf dem 2D Gel errechnet wurden, und die Molekulargewichte (MG) der einzelnen Spots entsprechen etwa den errechneten der Datenbank. Die MG wurden durch den Vergleich mit einem aufgetragenen Größenmarker und der daraus resultierenden Eichgerade in halblogarithmischer Darstellung errechnet.

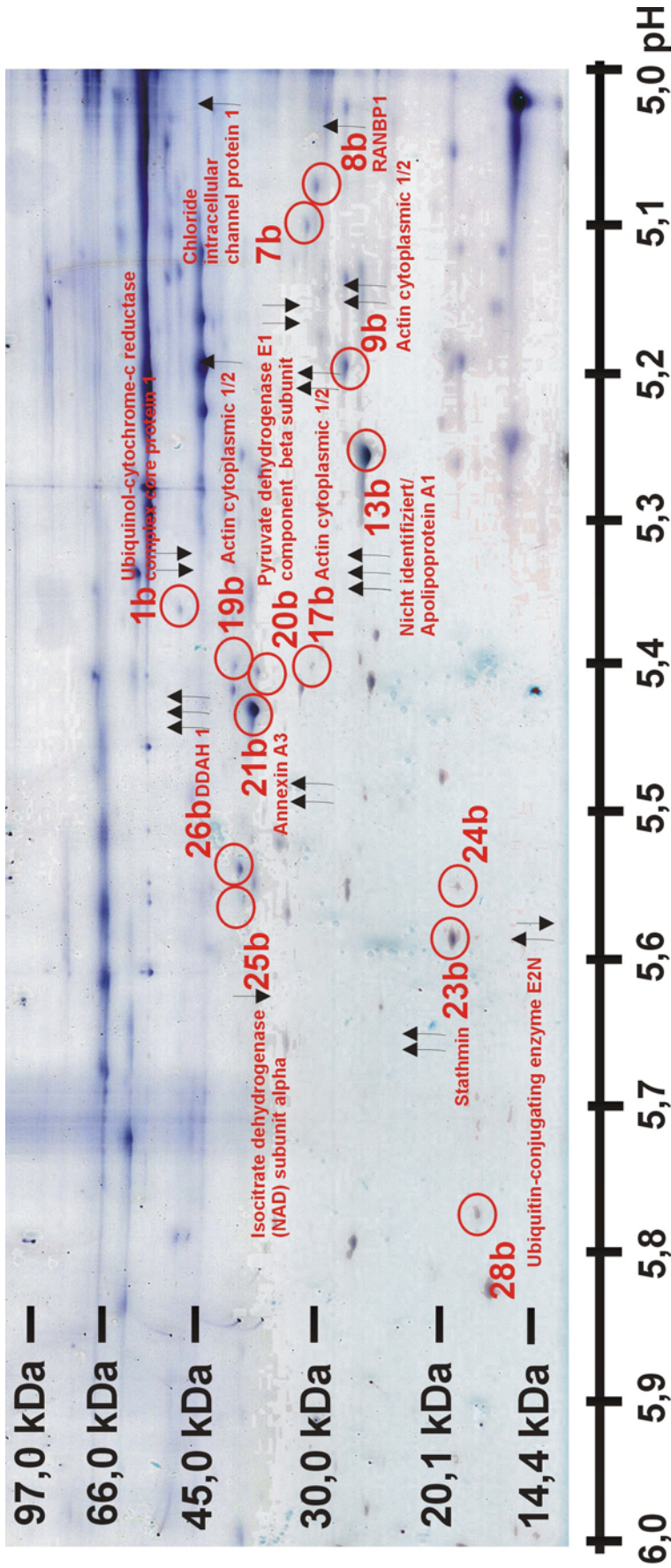


Abb.6: Präparatives Coomassie 2D Gel einer VSMC-Kultur

Die rot umrandeten Spots sind die identifizierten phänotypisch regulierten Proteine; die Pfeile ↑ kennzeichnen eine Hochregulation in VSMC-Kulturen, die Pfeile ↓ kennzeichnen eine Herunterregulation in VSMC-Kulturen, die Anzahl der Pfeile repräsentiert die Stärke der Regulation (nach Augenmaß). Spot 24b war mangels Material nicht identifizierbar und Spot 13b konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Alle Spots auf einem VSMC 2D Gel sind mit dem Buchstaben b versehen. Die Spots auf einem Aorten 2D Gel sind mit dem Buchstaben a markiert.

Tab.2: Identifizierte Proteine

Die Spots mit dem Buchstaben A wurden aus einem Aorten 2D Gel isoliert. Die Spots mit dem Buchstaben B stammen aus dem parallel gelaufenen VSMC 2D Gel. In der letzten Spalte ist die Hoch-/Herunterregulation von VSMC/Aorta (Abb. 5) in Zahlen dargestellt.

Spot	Protein	Acc. Nr. 1	Acc.Nr. 2	Datenbank	MG (kDa)	IEP	MG (kDa)	IEP	2D Gel VSMCZ10	Regulation
1A/B	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein	UCR1_Mouse	Q9CZ13		53,4	5,8	60	5,4	5,4	0,6
7A/B	Chloride intracellular channel protein 1	CLI1_Mouse	Q9Z1Q5		27,3	5,1	35	5,1	5,1	1,5
8A/B	Ran-specific GTPase-activating protein	RANG_Mouse	P34022		23,8	5,2	31	5,1	5,1	1,8
9B	Actin cytoplasmic 1/2	ACTB/G_Human	P02570/P02571		42	5,3	29	5,3	5,3	3
17B	Actin cytoplasmic 1/2	ACTB/G_Human	P02570/P02571		42	5,3	31	5,5	5,5	4,4
19B	Actin cytoplasmic 1/2	ACTB/G_Human	P02570/P02571		42	5,3	50	5,5	5,5	1,2
20A/B	Pdhb_Mouse	Gil12805431			35,2	5,6	44	5,4	5,4	0,6
21A/B	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	Gil18152793			39,3	6,4	44	5,4	5,4	0,6
23B	Annexin A3	ANX3_Mouse	O35639		36,5	5,3	44	5,5	5,5	1,2
25B	Stathmin	STN1_Mouse	P54227		17,1	5,8	19,1	5,4	5,4	2,6
26B	Isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit alpha, mitochondrial	Gil18250284			40	6,3	45	5,6	5,6	0,6
28A/B	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1	Gil38371755			31,8	5,6	45	5,5	5,5	4,5
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N/ Unamed product	Gil4507793/Gil12838544			17,2	6,1	17,7	5,8	5,8	0,8

3.1.4 Validierung der differentiell exprimierten Proteine auf RNA- und Proteinebene

Um die Ergebnisse der 2D Gelelektrophorese zu überprüfen, wurde Stathmin, eines der regulierten Proteine, auf Proteinebene mittels Western Blot (Abb. 7) und auf RNA-Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR (Abb. 8) getestet.

Die Western Blot Analyse mit dem spezifischen Antikörper gegen Stathmin zeigte, dass Stathmin, ein Mikrotubulus destabilisierendes Phosphoprotein, in VSMC-Kulturen im Vergleich zu Aorten stark hochreguliert ist (Abb. 7). Als Ladungskontrolle diente Akt (Akt-Kinase). Des Weiteren wurde das Expressionsmuster von bereits bekannten, in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten Proteinen untersucht. Mac2, ein Makrophagen Markerprotein und pan (p44/42) MAPK („mitogen activated protein kinase“), eine Kinase, die z.B. über Wachstumsfaktoren aktiviert wird, wurden in VSMC-Kulturen im Vergleich zu Aorten vermehrt exprimiert. Die cGKI Expression war in VSMC-Kulturen reduziert. Auf RNA-Ebene fand ebenfalls eine Hochregulation von Stathmin in VSMC-Kulturen statt (Abb. 8). Die Hochregulation von Stathmin auf den 2D Gelen konnte somit bestätigt werden.

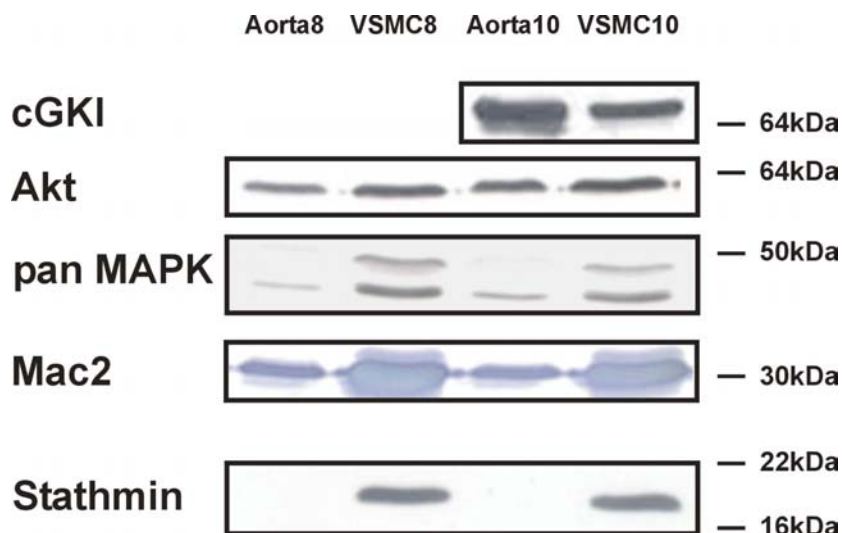


Abb.7: Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Proteine cGKI, Akt, pan MAPK, Mac2 und Stathmin

Die VSMC-Primärkulturen wurden nach 7 Tagen in serumhaltigen Medium geerntet. Danach wurden die Proteinextrakte aus den Aorten und den VSMC-Kulturen hergestellt (2.1; 2.2). Pro Spur wurde 20 µg Protein geladen. Die Visualisierung der Proteine geschah mittels der Chemilumineszenzmethode (ECL-Reaktion) mit Ausnahme des Nachweises von Mac2 (alkalische Phosphatase Technik). Jedes Experiment d.h. jede VSMC-Kultur und die dazugehörigen Aorten sind nummeriert. Hier ist die achte und zehnte VSMC-Kultur dargestellt.

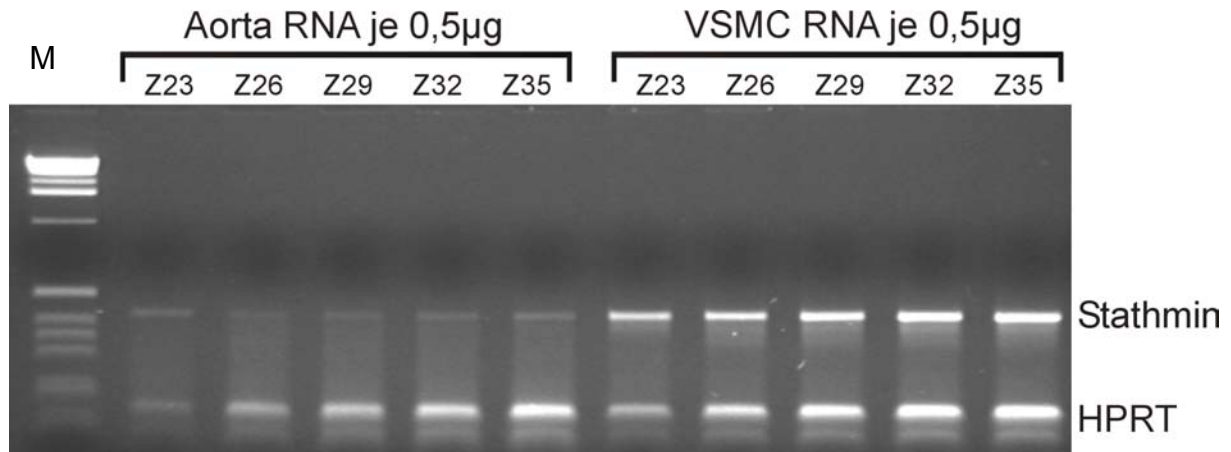


Abb 8: Semiquantitative RT-PCR von Stathmin und HPRT nativer Aorten und primärer VSMC-Kulturen im Vergleich

Ganz links im Bild ist ein molekularer DNA-Größenmarker (M) auf das Gel aufgetragen. Für die RT-PCR wurden jeweils 0,5 µg RNA eingesetzt und nach der angegebenen Anzahl von Reaktionszyklen (Z) Aliquots entnommen. Gleichzeitig wurde ein interner Standard, die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) coamplifiziert (2.3.). Die semiquantitative RT-PCR wurde von R. Ferstl im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

3.2 Phosphoproteomanalyse

3.2.1 Experimenteller Ansatz

Da die cGKI nach Aktivierung mit cGMP das γ -Phosphat des ATPs von der katalytischen Domäne der Kinase auf ein Substratprotein überträgt, können Substratproteine über den Einbau von radioaktivem Phosphat (^{33}P), das in das ATP eingebaut wurde, mittels Autoradiogrammen sichtbar gemacht werden. VSMCs nehmen im Ruhezustand, zur Biosynthese von extrazellulärer Matrix oder zur Proliferation Glucose und andere Nahrungsmoleküle auf. Diese werden einer schrittweisen Oxidation unterzogen, um chemische Energie in Form von ATP zur Verfügung zu stellen. ATP-Moleküle werden aus ADP und P_i synthetisiert. Auf diese Weise kann das radioaktive Phosphat in das ATP eingebaut werden und die durch cGMP-Inkubation aktivierte cGKI das radioaktive Phosphat auf ein Substratprotein übertragen.

Um optimale Bedingung für das Phosphorylierungsexperiment zu etablieren, wurden Vorversuche durchgeführt, die die Phosphorylierung zweier bekannter Substratproteine detektierten. Die Phosphoproteine VASP („vasodilator-stimulated

phosphoprotein“) und PDE V („phosphodiesterase isoenzyme 5“) sind geeignet, die Aktivierung der cGKI zu verfolgen (Oelze et al., 2000 , Rybalkin et al., 2002).

Western Blots von 8-Br-cGMP-stimulierten Primärkulturen zeigten, dass in serumfreigestellten Kulturen die Aktivierung der cGKI deutlicher zu sehen ist als in serumhaltigen Kulturen (10% FCS) (Abb. 9). Nach Inkubation für 10 min mit 1 mM 8-Br-cGMP findet eine Phosphorylierung der PDE V statt, die unter beiden Bedingungen (SRF, 10% FCS) gut zu sehen ist. VASP hingegen weist in den serumkultivierten glatten Muskelzellen eine hohe Basalphosphorylierung auf. Eine Zunahme der VASP-Phosphorylierung nach 8-Br-cGMP Inkubation ist in den serumkultivierten VSMC-Primärkulturen kaum nachweisbar, während in den serumfreigestellten eine deutliche Induktion zu sehen ist. Deshalb wurde das Phosphorylierungsexperiment in VSMC-Primärkulturen durchgeführt, die ab Tag 5 für zwei Tage in serumfreiem Medium (SRF) kultiviert wurden (2.1).

Nach der in vivo Markierung von WT und cGKI-KO VSMC-Primärkulturen mit radioaktivem Phosphat (³³P) wurden die Kulturen ohne/mit 8-Br-cGMP inkubiert (2.4.1). Nach Anfertigung von silbergefärbten 2D Gelen aus den Proteinextrakten der Kulturen erfolgte die Sichtbarmachung der phosphorylierten Proteine mittels Autoradiographie und der Vergleich der Phosphosignale der 4 Gruppen (WT; WT+cGMP; KO; KO+cGMP) untereinander (2.4.3, 2.4.4).

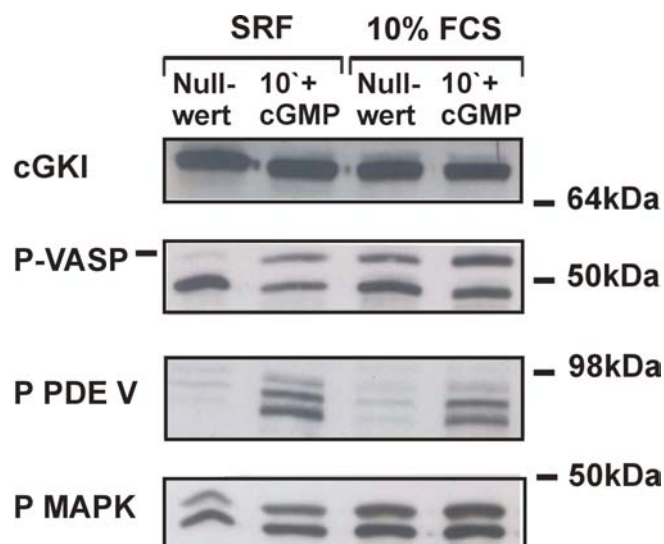


Abb. 9: Western Blot von +/- 8-Br-cGMP stimulierten VSMC-Primärkulturen zur Detektion des Aktivierungsgrades der cGKI

10-minütige Inkubation der 2 Tage serumfreigestellten VSMC-Kulturen (SRF) und der VSMC-Kulturen in 10% FCS Medium mit 1 mM 8-Br-cGMP. Der Nullwert bedeutet eine 10-minütige Inkubation ohne 8-Br-cGMP. Der P-VASP, P PDE V, P MAPK- Antikörper erkennt die phosphorylierte Form von VASP, PDE V und MAPK. Pro Spur wurden 20 µg Proteinextrakt geladen.

3.2.2 Unterschiede im Phosphoproteom von unstimulierten und cGMP-stimulierten VSMCs

Zur Analyse des Phosphoproteoms wurden die Autoradiographien von unstimulierten und 8-Br-cGMP-stimulierten WT bzw. cGKI-KO VSMC 2D Gelen miteinander verglichen. Beobachtet man eine Phosphorylierung bzw. eine Phosphorylierungserhöhung eines Spots zwischen unstimulierten und 8-Br-cGMP stimulierten WT VSMC-Kulturen und ist diese nicht in den ohne/mit 8-Br-cGMP inkubierten KO Zellen zu sehen, kann man davon ausgehen, dass diese Phosphorylierung durch die cGKI hervorgerufen wird.

3.2.3 Auswertung per Auge

Die Auswertung der Autoradiogramme von unstimulierten und stimulierten WT und cGKI-KO VSMC 2D Gelen (pH-Bereich von 3-10) erfolgte mit Hilfe eines Leuchttisches. Auf den Autoradiogrammen ließen sich über hundert phosphorylierte Proteinspots abgrenzen (Abb.10). Die Stimulation mit 1 mM 8-Br-cGMP für 10 min zeigte Veränderungen in der Inkorporierung von ^{33}P verglichen mit dem unstimulierten Zustand. Hierbei wurde zusätzlich die Intensität eines phosphorylierten Spots mit den relativen Phosphorylierungssignalintensitäten in der Umgebung dieses Spots verglichen. Die phosphorylierten Proteinspots, bei denen die Phosphorylierung nach cGMP-Stimulation in den WT Zellen zunahm und bei denen keine Änderung des Phosphorylierungszustandes bei den KO Zellen zu sehen war, wurden nach Bestätigung in 3 unabhängigen Experimenten als potenzielle cGKI Substrate identifiziert. Insgesamt konnte eine starke Basalphosphorylierung vieler Proteine beobachtet und 3 Proteinspots (IEP: 6,5-7,3; MG: ~55kDa) erkannt werden, die möglicherweise durch die cGKI phosphoryliert werden. Abbildung 10 zeigt das Autoradiogramm eines WT 2D Gels und darunter sind Ausschnitte aus den einzelnen Autoradiogrammen (WT, WT+cGMP, KO, KO+cGMP) zu sehen. Die Auswertung der Phosphoimagerbilder erwies sich als gleichwertig gegenüber den Autoradiogrammen.

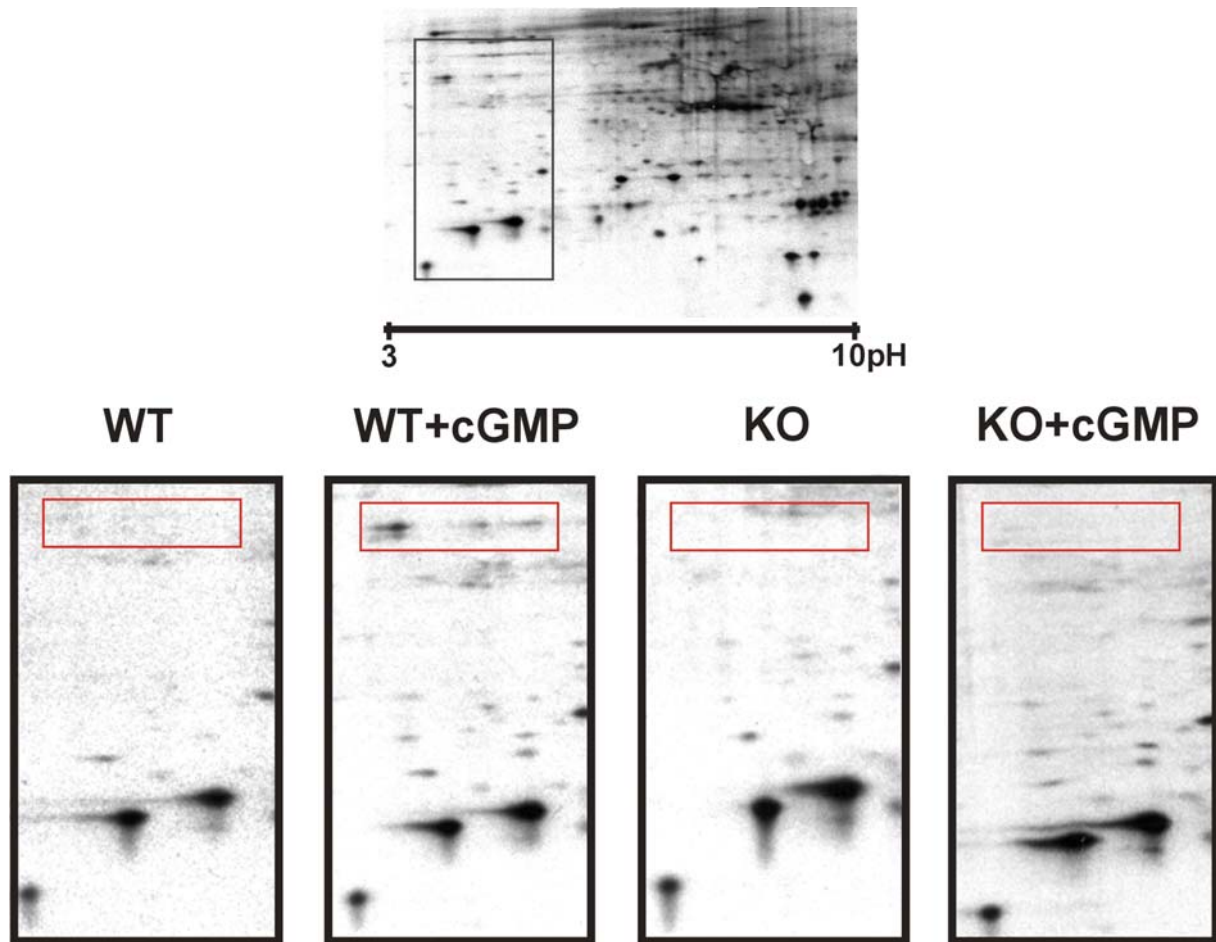


Abb. 10: Autoradiogramme von VSMC 2D Gelen nach in vivo Markierung mit ^{33}P

Oben: Autoradiogramm von einer WT VSMC-Kultur ($\sim 700\mu\text{g}$) mit 1 mM 8-Br-cGMP für 30 min stimuliert;

Unten: 4 Autoradiogrammausschnitte von WT/cGKI-KO VSMC-Kulturen ($\sim 700\mu\text{g}$) ohne/mit 1 mM 8-Br-cGMP für 30 min stimuliert. Die drei Spots, die cGKI Substrate sein könnten, sind rot eingerahmt.

3.2.4 Identifizierung der Substratproteine der cGKI mittels MS

Während das Autoradiogramm eines 2D Gels über hundert Spots detektierte, waren auf dem gleichen Gel etwa 500 silbergefärbte Spots zu erkennen. Die silbergefärbten Spots zeigten keine klaren Unterschiede in ihren Signalintensitäten zwischen unstimuliertem und stimuliertem Zustand.

Die drei mit der Autoradiographie detektierten potenziellen cGKI Substratspots wurden mit der vorher durchgeführten Silberfärbung des gleichen Gels kaum sichtbar ($\sim 600\mu\text{g}$ Protein). Auch das Auftragen von etwa 800 μg Proteinextrakt führte nur zur schwachen Anfärbung dieser drei Spots (Abb.11). Da nach Auftragen von 1,5 mg Protein auf einem Coomassie gefärbten präparativen 2D Gel die drei

interessierenden Spots ebenfalls nicht zu sehen waren, wurde eine MS-kompatible Silberfärbung von 800 µg und 1 mg Proteinextrakt durchgeführt. Auf dem silbergefärbten 2D Gel (1 mg Protein) konnten die drei Proteine nicht mehr getrennt dargestellt werden, da die Silberfärbung der umgebenden Spots diese verdeckten. Somit wurden die schwach angefärbten Spots des 2D Gels (800 µg Protein), ausgeschnitten. Die Abbildung 11B zeigt die enge Nachbarschaft der rot umrandeten potenziellen Substratespots der cGKI zu anderen Spots bei 800 µg Proteinextrakt (Abb.11). Die MS-Analyse dieser 3 Spots war bei Zusammenstellung der Doktorarbeit noch nicht abgeschlossen.

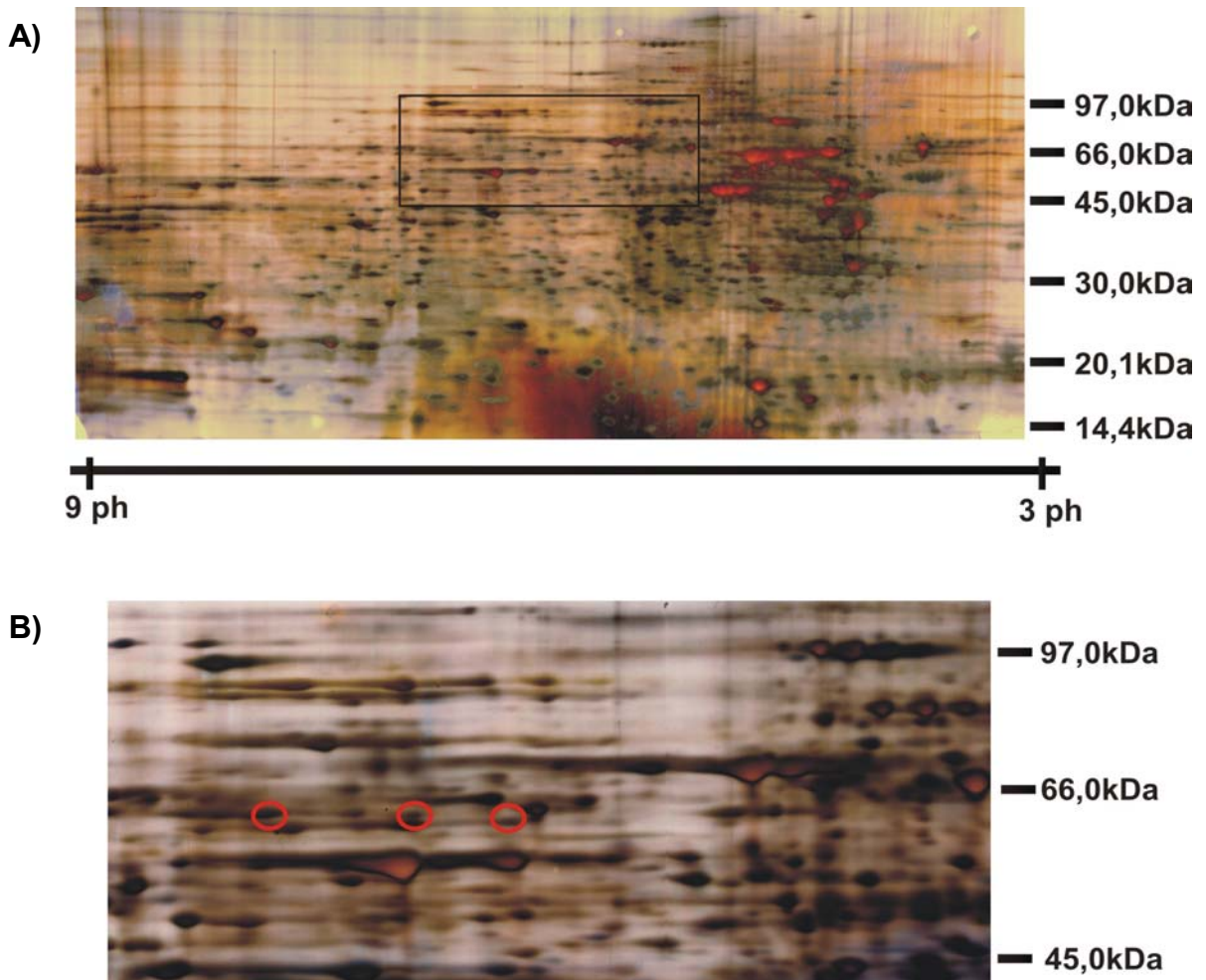


Abb.11: ^{33}P markiertes silbergefärbtes WT+8-Br-cGMP VSMC 2D Gel (800 µg Proteinextrakt)

Abb. 11B zeigt den Ausschnitt (300% Vergrößerung) des oben in Abb. 11A dargestellten 2D Gels, in dem die drei potenziellen cGKI Substrate (rot umrandet) zu erwarten sind. (IEP: 6,5-7,3; MG: etwa 55 kDa). Durch Aufeinanderlegen des dazugehörigen Autoradiogramms auf das ^{33}P markierte VSMC 2D Gel konnten die drei Spots des Autoradiogramms den Silberspots zugeordnet werden.

4 Diskussion

4.1 Einfluß des Probenmaterials auf die Ergebnisse der Proteomanalyse

Die molekularen Mechanismen der Plaquentstehung sind bis jetzt noch nicht vollständig geklärt und das Proteom normaler und pathologischer Gefäße ist weitgehend unbekannt. Ein Problem ist die heterogene Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques. Glatte Muskelzellen stellen die Hauptkomponente eines gesunden Blutgefäßes dar, während bei der Plaquentstehung, die durch einen inflammatorischen, aktiven Prozess charakterisiert ist, auch T-Lymphozyten und Makrophagen in die Media der Blutgefäße einwandern (Libby, 2002). Eine Proteomstudie von You et al. konnte zeigen, dass sich die Koronararterien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit verglichen mit gesunden Kontrollen in nur einem Protein stark unterschieden (You et al., 2003). Aufgrund der intraindividuellen Unterschiede der Probanden und des Stadiums der Atherosklerose wurden die Unterschiede in der Proteinexpression wahrscheinlich maskiert. Die Heterogenität atherosklerotischer Läsionen erschwert zusätzlich die Interpretation der Daten. Die Analyse des Proteoms glatter Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques stellt aufgrund der oben dargestellten Schwierigkeiten eine Herausforderung dar. Die phänotypische Modulation von VSMCs zum synthetischen Phänotyp spielt bei der Pathogenese der Atherosklerose eine Schlüsselrolle. In der vorliegenden Arbeit wurden kultivierte VSMCs aus Mausearten als Modell zur Untersuchung des synthetischen Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen verwendet. Um eine möglichst homogene Zusammensetzung von VSMCs zu erreichen, wurden die nativen Aorten von Fett und Blutresten befreit (2.1). Um intraindividuelle Unterschiede herauszunivellieren, wurde die eine Hälfte der Aorta für die Proteomanalyse des kontraktiven Phänotyps verwendet, die andere Hälfte für die Proteomanalyse des synthetischen Phänotyps in Kultur gebracht und je Experiment 10 halbe Aorten je Gruppe zusammengefaßt (2.1). Da das Proteom eine Momentaufnahme der Zelle darstellt, wurde bei jedem Experiment die Kultur nach 7 Tagen geerntet und die Konfluenz und Morphologie der Zellen dokumentiert. Die Zellkultur stellt ein einfach zu überwachendes Modellsystem zur Analyse des Proteomprofils dar, bei dem sich verändernde externe Einflüsse (z.B. Stress) leichter kontrollieren lassen.

Auch wäre es von Interesse zu untersuchen, wie sich das Expressionsmuster von VSMCs auf verschiedene Stimuli wie z.B. Zytokine verändert. Patton et al. konnten Unterschiede in der Proteinexpression von Elongationsfaktoren und Hitzeschockproteinen in serumfreigestellten, mit Wachstumsfaktoren stimulierten VSMCs detektieren, die mit den in vivo Daten konsistent sind (Patton et al., 1995).

Da in der vorliegenden Arbeit nur das Proteinexpressionsprofil im pH-Bereich von 5-6 untersucht wurde, könnte ein weiteres Zukunftsprojekt die Proteomanalyse im pH-Bereich von 3-5 und 6-9 sein. Einer der Haupttechniken zur Quantifizierung der relativen Proteinmenge ist der Vergleich der Proteinspotintensitäten. Aufgrund der hohen Sensitivität der Silberfärbung (Detektionsgrenze bei 0,1 ng Protein pro Spot) wurden silbergefärbte 2D Gele ausgewertet. Ein Nachteil ist jedoch die nicht lineare Färbung, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Aus diesem Grund wurde bei der Analyse der 2D Gele darauf geachtet, dass nur Spotunterschiede, die sich in 5 unabhängigen Experimenten bestätigen ließen und eine starke Regulation zeigten, als regulierte Proteine gewertet wurden (3.1.2).

4.2 Kritische Betrachtung der Ergebnisse der Phosphoproteomanalyse

Bei der Signalweiterverarbeitung und -amplifizierung spielt die Phosphorylierung von Proteinen an ihren Serin-, Threonin- und Tyrosinresten eine entscheidende Rolle. Etwa ein Drittel aller Proteine sind in Eukaryonten phosphoryliert (Mann et al., 2002). Der Phosphorylierungszustand der Proteine in Zellen wird durch das Zusammenspiel von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert. In vitro und in vivo Daten weisen auf eine Rolle der cGKI in der Atherogenese und Angiogenese hin (Wolfsgruber et al., 2003, Yamahara et al., 2003). Der cGMP/cGKI Signalweg könnte somit eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von „atherogenen“ VSMCs spielen. Ziel ist es, diejenigen Substratproteine zu identifizieren, die Effekte über den cGMP/cGKI Signalweg vermitteln. Hierzu wurde die entdeckungsorientierte Phosphoproteomanalyse mittels der 2D Gelelektrophorese als Ansatz gewählt, mit deren Hilfe man Substratproteine identifizieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurden Primärkulturen untersucht, da bekannt ist, dass die Expression der cGKI in passagierten Kulturen stark reduziert (Eigenthaler et al., 1999) und somit auch die

Aktivierung der cGKI durch cGMP in passagierten Zellen schwer darstellbar ist. Damit man bei möglichst vielen Proteinen eine Zunahme der Phosphorylierung nach Aktivierung der cGKI sieht, wurden die Primärkulturen 2 Tage vor dem Phosphorylierungsexperiment in serumfreies Medium überführt. Führt man dagegen die Stimulation der cGKI in serumhaltigen Primärkulturen durch, so sieht man eine Zunahme der Phosphorylierung bei weniger Proteinen als im Vergleich zu den serumfreigestellten Kulturen (3.2.1). Ein Problem der 2D Gelelektrophorese ist, dass nur die am stärksten exprimierten Proteine sichtbar gemacht werden können. Da Signalmoleküle oft nur in sehr geringen Mengen vorkommen, können bei der Analyse von phosphorylierten Proteinen mittels der 2D Gelelektrophorese Nachweisprobleme auftreten (Mann et al., 2002). So können die auf den Autoradiogrammen sichtbaren Phosphoproteine mittels der Coomassiefärbung trotz Auftragen von 1 mg Proteinextrakt oft nicht sichtbar gemacht werden (3.2.4). Deshalb wäre die Anreicherung von Phosphoproteinen sinnvoll. Es gibt derzeit einige Anreicherungsmethoden von Phosphoproteinen (z.B. phosphospezifische Antikörper), die jedoch neben Vorteilen auch Nachteile haben. IMAC („immobilized metal affinity chromatography“) zur Anreicherung von Phosphoproteinen und SILAC („stable isotope containing amino acids in cell culture“) sind ebenfalls geeignete Verfahren zum Nachweis von Phosphoproteinen. Können auf dem Weg der 2D Gelelektrophorese aufgrund ihres geringen Vorkommens keine Substratproteine identifiziert werden, stellen IMAC oder SILAC interessante und vielversprechende Methoden zur Darstellung des Phosphoproteoms in glatten Gefäßmuskelzellen dar.

4.3 Rolle der differentiell exprimierten Proteine in VSMCs

Bei der Analyse differentiell exprimierter Proteine in Aorten und VSMC-Kulturen konnten mittels der 2D Gelelektrophorese im pH-Bereich von 5-6 28 regulierte Proteinspots detektiert werden, wovon 12 Proteinspots mittels Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden konnten (Tab. 2). Stoffwechsellzyme wie die „pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit“, die „isocitrate dehydrogenase 3 (NAD) subunit alpha“ und das „ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I“ wurden in kultivierten VSMCs im Vergleich zur nativen Aorta vermindert exprimiert. Unter den 12 Proteinen wurden diejenigen vier, die eine Rolle im Zellzyklus und bei der Proliferation spielen, in VSMCs hochreguliert. Hierzu

zählen das „chloride intracellular channel protein 1“ (Valenzuela et al., 2000), Stathmin (Rubin et al., 2004), „ubiquitin-conjugating enzyme E2N“ (Habelah et al., 2004) und das „ran-specific GTPase-activating protein“ (Avis et al., 1996). Des Weiteren wurde „actin cytoplasmic 1/2“ als Bestandteil des Zytoskeletts, Annexin A3 und ein weiteres Protein, die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1, die mit vaskulären Erkrankungen assoziiert ist, hochreguliert (Dayoub et al., 2003, Chen Y. et al., 2003). Die Tabelle 3 (S.44) gibt einen kurzen Überblick zur Lokalisation und Funktion einiger der regulierten Proteine.

„pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit“, „isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit alpha“, „ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1“

Da synthetische glatte Muskelzellen eine erhöhte Syntheserate von Proteinen wie zum Beispiel Extrazellulärmatrixproteinen aufweisen, besitzen sie zahlreiche Organellen für die Protein- und Lipidsynthese und Mitochondrien im Vergleich zu den kontraktile Zellen (Ang et al., 1990, Merrilees et al., 1990). Demzufolge würde man erwarten, dass Enzyme der Glycolyse („pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit“), des Citratzyklus („isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit alpha) und der Atmungskette („ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1“) in synthetischen Zellen hochreguliert werden. In dem in vitro Modell der phänotypischen Modulation werden diese mitochondrialen Enzyme jedoch herunterreguliert. Eine Herunterregulation der den Energiemetabolismus in Mitochondrien betreffenden Enzyme findet man auch bei der Proteomanalyse von chronisch gestressten Kardiomyozyten der Ratte (Liu et al., 2004). In Fibronektin-stimulierten hypertrophen kultivierten Kardiomyozyten hingegen werden diese Enzyme auf RNA-Ebene hochreguliert (Chen H. et al., 2004). Synthetische VSMCs könnten möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen diese Enzyme aktivieren. Auf diese Weise metabolisieren weniger Enzyme mehr Pyruvat und folglich müssten weniger mitochondriale Enzyme exprimiert werden.

Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1)

Ein in Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten stehendes interessantes Enzym, die DDAH 1 wird in synthetisch veränderten VSMCs in dem in vitro Modell hochreguliert. Das Enzym DDAH 1 kann die NO-Synthase Aktivität erhöhen, indem

es ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin), einen potenten Inhibitor der NO-Synthase, degradiert. DDAH 1 hat das Potential, die über NO vermittelten Signalwege über die Modulation des ADMA Spiegels zu regulieren. Eine wichtige Komponente in der Pathogenese der Atherosklerose ist die Entzündungsreaktion. Zytokine und Chemokine aktivieren glatte Muskelzellen der Gefäßwand, sodass diese aus der Media in die intimale Läsion wandern (Dzau et al., 2002). Zytokine können die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in glatten Muskelzellen induzieren. Zytokine stimulieren dosisabhängig iNOS und DDAH in kultivierten SMCs aus Ratten (Ueda et al., 2003). Das ADMA-DDAH System könnte ein weiterer regulatorischer Mechanismus in der entzündungsvermittelten NO Produktion bei vaskulären Krankheiten darstellen. Die kultivierten synthetischen Muskelzellen in dem in vitro Modell exprimieren vermehrt DDAH 1 und könnten somit gut geeignet sein, die in vivo Situation zu simulieren.

Stathmin

Bei der Proteomanalyse phänotypisch modulierter VSMCs konnte eine Hochregulation von Stathmin (ein zytosolisches Protein mit einem MG von 17 kDa) detektiert werden. Eine Erhöhung der Stathminexpression findet man sowohl in gesunden proliferierenden Zellen und Zellen während der Neurogenese als auch in stark proliferierenden Brust- und Prostata-Tumorzellen (Rowlands et al., 1995, Jin et al., 2004, Bieche et al. 1998, Friedrich et al., 1995). Stathmin bindet an Tubulin und destabilisiert in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsstatus den Mikrotubulusapparat (Belmont et al., 1996, Larsson et al., 1997, Jourdain et al., 1997, Horwitz et al., 1997). Stathmin reguliert somit die Dynamik des Mikrotubuluszytoskeletts und die Bildung der mitotischen Spindel. Stathmin-defiziente Mäuse zeigen während der Entwicklung keinen auffallenden Phänotyp. Dagegen weisen gealterte Stathmin-Knockout Mäuse eine progressive Axonopathie des zentralen und peripheren Nervensystems auf (Liedtke et al., 2002). Stathmin scheint somit bei der Aufrechterhaltung der axonalen Integrität mitzuwirken. Eine Studie von Zahedi et al. konnte Stathmin als Proliferationsmarker in der Regenerationsphase nach akutem ischämischen Nierenversagen identifizieren (Zahedi et al., 2004). Die Rolle von Stathmin in VSMCs wurde bisher noch nicht untersucht. Insbesondere wurde Stathmin noch nicht im Zusammenhang mit vaskulären Krankheiten erwähnt. In dieser Arbeit konnte mit dem

entdeckungsorientierten Ansatz erstmals eine Hochregulation von Stathmin in synthetischen VSMCs gezeigt werden. Diese Expressionserhöhung bestätigte sich auf Proteinebene mittels Western Blot und auf RNA-Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR (3.1.4). Da Stathmin in phänotypisch modulierten VSMCs in vitro hochreguliert wird, könnte Stathmin eine Rolle bei der Pathogenese von vaskulären Krankheiten spielen und als ein Markerprotein fungieren.

Mac2, cGKI, MAPK

Da die Migration, Proliferation und Dedifferenzierung der VSMCs wesentlich an der Entstehung von Plaques beteiligt sind, wurde die Regulation bereits in diesem Zusammenhang bekannter Proteine im Zellkulturmodell analysiert. Eine Studie von Rong et al. zeigte, dass nach Cholesterobeladung von Muskelzellen aus Mäusen diese zu einem Macrophagen-ähnlichen Stadium transdifferenzieren und Mac2 als Marker exprimieren (Rong et al., 2003). Des Weiteren findet man in atherosklerotischen Plaques Zellen, die aus Muskelzellen entstanden sind und die immunhistochemisch Mac2-positiv sind (Feil S. et al., 2004). Ausgehend von den derzeitigen Ergebnissen sollte Mac2 in kultivierten VSMCs im Vergleich zu nativen Muskelzellen aus Aorten hochreguliert werden. Mittels Western Blot konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mac2 in der Tat in VSMC-Kulturen hochreguliert wird (3.1.4). Des Weiteren ist allgemein akzeptiert, dass die Expression der cGKI während der Kultivierung stark abnehmen kann (Eigenthaler et al., 1999). Die Herunterregulation der cGKI in VSMC-Primärkulturen verglichen zu Aorten konnte mittels Western Blot bestätigt werden (3.1.4). Eine Hochregulation von MAPK („mitogen activated protein kinase“) findet man wiederum in der VSMC-Kultur. Es findet eine Änderung des Proteinexpressionsprofils während der phänotypischen Modulation statt und die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass das Zellkulturmodell als Modell der phänotypischen Modulation in vivo dienen könnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die phänotypisch regulierten identifizierten Proteine neue Ansätze zum besseren Verständnis der Atherosklerose liefern.

Tab.3: Lokalisation und Funktion einiger regulierten Proteine

Protein	Regulation VSMC/Aorta	Nachgewiesene Lokalisation	Funktion
Actin cytoplasmic 1/2	3 (Spot 9)	Muskelgewebe	Zellmotilität
Annexin A3	1,2	neutrophile Granulozyten (Ernst et al. 1991)	Rolle bei der Phagozytose in neutrophilen Granulozyten (Ernst et al. 1991)
Chloride intracellular channel protein 1	1,5	Herz, Niere, VSMC, Skelettmuskel (Tulk et al., 1998)	Chloridionen-Kanal Rolle im Zellzyklus (Valenzuela et al., 2000)
Dimethylarginin Dimethylaminoxidase 1	4,5	Zytokinstimulierte VSMCs (Ueda et al., 2003), Herzgewebe (Decking 2002)	Erhöht die NOS-Aktivität, indem es ADMA, einen potenten Inhibitor der NOS, degradiert. Rolle bei der Blutdruckregulation (Dayoub et al., 2003), Rolle beim myokardialen Remodeling (Chen Y. et al., 2003)
Isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit alpha	0,6	Mitochondrien	Katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat. Bei chron. Stress Herunterregulation im Herzen (Liu et al., 2004)
Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	0,6	Mitochondrien	Bestandteil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, katalysiert die Konversion von Pyruvat in Acetyl-CoA und CO ₂ . Herunterregulation in chronisch gestressten Herzen (Liu et al., 2004)
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1	0,6	Mitochondrien	Bestandteil des Komplex III als Teil der mitochondrialen Atmungskette
Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	0,8	Cytosol	Katalysiert die Synthese von Polyubiquitinketten zur transkriptionalen Aktivierung von Zielgenen. Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der zellulären Antwort auf Stress (Habelhah et al., 2004)
Ran-specific GTPase-activating protein 1	1,8	Cytosol, Nucleus	Regulatorische Komponente des Ran-Netzwerkes, verantwortlich für nukleären Transport und Regulation des Zellzyklus (Avis et al., 1996))
Stathmin	2,6	Leukämiezellen (Hanash et al., 1988), wandernde Neuronen (Jin et al., 2004) und proliferierende Zellen	Regulation des Zellzyklus (Rubin et al., 2004), Marker für Zellproliferation nach akutem ischämischen Nierenversagen (Zahedi et al., 2004), Aufrechterhaltung der axonalen Integrität (Liedtke et al., 2002), Rolle bei der Bildung der mitotischen Spindel und der Zytokinese (Rubin et al., 2004)

4.4 Zukunftsperspektive: Rolle der differentiell exprimierten Proteine in der Pathogenese von kardiovaskulären Krankheiten und bei der proatherogenen Wirkung von cGKI

Aufgrund der phänotypischen Modulation von VSMCs in atherosklerotischen Plaques und der damit verbundenen Herunterregulation von Markergenen, ist es schwierig, diese Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren. Das hier eingesetzte in vitro Modell kultivierter VSMCs verbunden mit dem entdeckungsorientierten Proteomansatz scheint gut geeignet, neue in vivo Markerproteine synthetischer VSMCs zu finden, z.B. könnte das während der phänotypischen Modulation regulierte Protein Stathmin als Markerprotein für dedifferenzierte Zellen in vivo fungieren. Nach der Bestätigung auf RNA- und Proteinebene weisen vorläufige immunhistochemische Ergebnisse daraufhin, dass Stathmin in vivo in der Neointima, in der phänotypisch modulierte VSMCs zu finden sind, hochreguliert wird (S. Feil, R. Lukowski, R. Feil, unpublizierte Daten). Stathmin könnte bei der Atherosklerose und Restenose auch eine funktionelle Rolle spielen. Ein zukünftiges interessantes Projekt wäre die Untersuchung der Funktion von Stathmin im Zellkulturmodell mittels „RNA-interference“ oder in vivo mit Hilfe von Stathmin Knockout-Mäusen. Stathmin Knockout-Mäuse existieren bereits, aber bis jetzt wurde ihr vaskulärer Phänotyp noch nicht eingehend untersucht. Bekannt ist derzeit nur, dass Stathmin Knockout-Mäuse eine altersabhängige Axonopathie entwickeln (Liedtke et al., 2002).

In vitro und in vivo Analysen weisen darauf hin, dass der cGMP/cGKI Signalweg die phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen fördert und proatherogen wirkt (Wolfsgruber et al., 2003). Die Frage ist, über welche molekularen Mechanismen der cGMP/cGKI Signalweg die phänotypische Modulation von VSMCs vermittelt. Die differentiell exprimierten Proteine stellen hierbei Kandidatenproteine dar, die eventuell auch über den cGMP/cGKI Transduktionsweg reguliert werden. Nach der Bestätigung der Regulation der Proteine auf RNA- und Proteinebene (RT-PCR und Western Blot; 3.1.4) wäre es wichtig zu untersuchen, ob diese Proteine über den cGMP/cGKI Signalweg reguliert werden können.

5 Zusammenfassung

Die phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) spielt in der Pathogenese der Atherosklerose eine Schlüsselrolle. Bringt man native, kontraktile VSMCs in Kultur, so findet eine phänotypische Modulation zu proliferierenden, „atherogenen“, synthetischen glatten Muskelzellen statt. Die molekularen Mechanismen, die die Modulation des kontraktiven Phänotyps in einen synthetischen Phänotyp beeinflussen, sind bislang unklar. Diskutiert wird eine Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI) bei der Regulation der phänotypischen Modulation und bei proliferativen Prozessen von VSMCs. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Proteine zu identifizieren, die während der phänotypischen Modulation von VSMCs reguliert werden. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung von Substratproteinen der cGKI in VSMCs, die möglicherweise die Proliferation, Migration oder Genexpression beeinflussen.

Das Proteinprofil nativer Mausearten wurde mit dem Profil kultivierter primärer VSMCs verglichen. Die Hochregulation von Mac2, einem Marker, den man in transdifferenzierten Gefäßmuskelzellen nach Cholesterobeladung und in Plaques findet, weist darauf hin, dass das in dieser Arbeit verwendete Zellkulturmodell die phänotypische Modulation von VSMCs in vivo simulieren kann. Mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese und Massenspektrometrie (MS) wurden 12 weitere Proteine identifiziert, die während der phänotypischen Modulation reguliert wurden. Herunterreguliert wurden z.B. mitochondriale Stoffwechsellenzyme wie die mitochondriale „pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit“, die mitochondriale „isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit alpha“ und das „ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I“. Hochreguliert wurden „actin cytoplasmic 1/2“ als Bestandteil des Zytoskeletts, Annexin A3 und Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH 1), das mit vaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Des Weiteren erfolgte eine Hochregulation von Proteinen, für die eine Rolle im Zellzyklus und bei der Proliferation beschrieben wurde. Hierzu zählen das „chloride intracellular channel protein 1“, „ubiquitin-conjugating enzyme E2N“, „ran-specific GTPase-activating protein“ und Stathmin. Stathmin (ein zytosolisches Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa), das in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus den Mikrotubulusapparat destabilisiert, wurde bislang noch

nicht in Zusammenhang mit VSMCs erwähnt. Mittels Western Blot und semiquantitativer RT-PCR wurde die Expressionsänderung auf Protein und RNA-Ebene bestätigt. Die Hochregulation von Stathmin in kultivierten VSMCs weist darauf hin, dass dieses Protein ein Markerprotein synthetischer VSMCs darstellen und eine Rolle bei der Pathogenese vaskulärer Krankheiten spielen könnte. So konnten mit Hilfe des entdeckungsorientierten Proteomansatzes Proteine identifiziert werden, die möglicherweise an der phänotypischen Modulation von VSMCs und damit an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sein könnten.

Zur Identifizierung neuer Substratproteine der cGKI wurde die Phosphoproteomanalyse gewählt, d.h. nach der radioaktiven in vitro Phosphorylierung wurden die Phosphoproteine über 2D Gele aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Durch Vergleich des Phosphoproteoms von Wildtyp und cGKI-defizienten VSMCs wurden drei potenzielle Substratproteine der cGKI (MG etwa 55 kDa, IEP: 6,5-7,3) entdeckt. Die Identifizierung dieser Proteine mittels MS befindet sich derzeit noch in Arbeit.

Ingesamt weisen die Ergebnisse der Proteom- und Phosphoproteomanalyse in dieser Arbeit darauf hin, dass die 2D Gelelektrophorese kombiniert mit der Massenspektrometrie eine geeignete Methode ist, um die molekularen Mechanismen der Atherosklerose weiter aufzuklären.

6 Abkürzungen

2D	zweidimensional
8-Br-cGMP	8-Bromo-Guanosin-3'-5'-monophosphat
ACTB	actin cytoplasmic/ beta actin
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AKT	Akt Kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	„atrial natriuretic peptide“
Anxa3	Annexin A3
APA1	Apolipoprotein A1
ATP	Adenosin-Tris-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
BK _{Ca}	kalziumabhängiger Kaliumkanal
BNP	„brain natriuretic peptide“
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)diemethylammonio)-1-propanesulfonate
CHASM	„calponin homology-associated smooth muscle“
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I
cGKI _c	cGMP-abhängige Proteinkinase I common
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase II
cGMP	zyklisches 3', 5'Guanosinmonophosphat
Clic1	„chloride intracellular channel protein 1“
CNG Kanäle	„cyclic nucleotide gated cation channels“
CNP	„C-type natriuretic peptide“
Da	Dalton
DDAH 1	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DTT	1, 4- Dithiothreit
EDRF	„endothelium-derived relaxing factor“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	„electrospray ionization“
FCS	„fetal calf serum“
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IDH3A	„isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit alpha, mitochondrial“
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEP	isoelektrischer Punkt
IMAC	„immobilized metal affinity chromatography“
IPG-Strip	immobilized pH-Gradient Strip
IRAG	Ins (1,4,5) P ₃ -Rezeptor-assoziertes cGKIβ Substrat

Abkürzungen

KO	Knockout
LMW	„low molecular weight marker“
Mac2	Makrophagen Markerprotein 2
MALDI	„matrix-assisted laser-desorption ionization“
MALDI-TOF	MALDI- time of flight
MAPK	„mitogen activated protein kinase“
MG	Molekulargewicht
MMLV-RT	„moloney murine leukemia virus reverse transcriptase“
MS	Massenspektrometrie
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PDE	Phosphodiesterase
PDE V	„phosphodiesterase isoenzyme V“
Pdhb	„pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit, mitochondrial“
PI3K	„phosphatidylinositol 3 kinase“
pGC	partikuläre Guanylylzyklase
PMSF	„phenyl methyl sufonyl fluoride“
PPAR- γ	„peroxisome proliferator-activated receptor γ “
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ranbp1	„ran-specific GTPase-activating protein“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SILAC	„stable isotope containing amino acids in cell culture“
sGC	lösliche Guanylylzyklase
SRF	serumfreies DMEM
TCA	Trichloressigsäure
Techn.	technisch
TOF	„time of flight“
Ube2n	„ubiquitin-conjugating enzyme E2N“
Uqcrc1	„ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I“
VASP	„vasodilator-stimulated phosphoprotein“
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule-1“
VSMC	„vascular smooth muscle cell“
WT	Wildtyp

7 Anhang

7.1 Für die Western Blot Analyse verwendete primäre Antikörper

Antigen	Quelle	Klassifizierung	Verdünnung
cGKI_c	Schlossmann,J	Polyklonal, Kaninchen	1:200
pan MAPK	Cell Signalling, #9102	Polyklonal, Kaninchen	1:1000
P-MAPK	Cell Signalling, #9103	Polyklonal, Kaninchen	1:1000
VASP	Cell Signalling, #3112	Polyklonal, Kaninchen	1:2000
PDE V	Beavo, Jo	Polyklonal, Maus	1:500
Stathmin	Cell Signalling, #3352	Polyklonal, Kaninchen	1:1000
Akt	Cell Signalling, #9272	Polyklonal, Kaninchen	1:1000
Mac2	Cedarlane Lab. Lim. CL8942AP	Monoklonal, Maus	1:1000

8 Literaturverzeichnis

- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. and Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K^+ channel, Hslo, is target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem.* 273, 32950-6
- Ang, A.H., Tachas, G., Campbell, J. H., Bateman, J. F. and Campbell G. R. (1990) Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J.* 265, 461-469
- Avis, J. M. and Clarke, P. R. (1996) Ran, a GTPase involved in nuclear processes: its regulators and effectors. *J Cell Sci.* 109, 2423-2427
- Belmont, L. D. and Mitchison, T. J. (1996) Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell.* 84, 623-631
- Bieche, I., Lachkar, S., Becette, V., Cifuentes-Diaz, C., Sobel, A., Lidereau, R. and Curmi, P. A. (1998) Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer. *Br J Cancer.* 78, 701-709
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135, 151-171
- Boerth, N. J., Dey, N. B, Cornwell and Lincoln, T. M. (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. *J Vasc Res.* 34, 245-259
- Borman, M. A., MacDonald, J. A. and Haystead T. A. (2004) Modulation of smooth muscle contractility by CHASM, a novel member of the smoothelin family of proteins. *FEBS Lett.* 573, 207-213
- Campbell, G. R. and Campbell, J. H. (1997) Smooth muscle diversity: implications for the question; what is a smooth muscle cell? *Biomed Res.* 8, 81-125
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R. and Ross R. (1979) The smooth muscle cell in cell culture. *Physiol Rev.* 59, 1-61
- Chen, H., Huang, X. N., Stewart, A. F. and Sepulveda, J. L. (2004) Gene expression changes associated with fibronectin-induced cardiac myocyte hypertrophy. *Physiol Genomics.* 18, 273-83
- Chen, Y., Park, S., Li, Y., Missov, E., Hou, M., Han, X., Hall, J. L., Miller, L. W. and Bache, R. J. (2003) Alterations of gene expression in failing myocardium following left ventricular assist device support. *Physiol Genomics.* 14, 251-260
- Dayoub, H., Achan, V., Adimoolam, S., Jacobi, J., Stuehlinger, M. C., Wang, B. Y., Tsao, P. S., Kimoto, M., Vallance, P., Patterson, A. J. and Cooke J. P. (2003) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation.* 108, 3042-7
- Decking, U. K. (2002) Spatial heterogeneity in the heart: recent insights and open questions. *News Physiol Sci.* 17, 246-250
- Dzau, V. J., Braun-Dullaes, R. C. and Sedding, D. G. (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 8, 1249-1256

- Eigenthaler, M., Lohmann, S. M., Walter, U. and Pilz, R. B. (1999) Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135,173-209
- Ernst, J. D. (1991) Annexin III translocates to the periphagosomal region when neutrophils ingest opsonized yeast. *J Immunol.* 146, 3110-3114
- Feil, S., Hofmann, F. and Feil, R. (2004) SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ Res.* 94, 863-865
- Friedrich, B., Gronberg, H., Landstrom, M., Gullberg, M. and Bergh A. (1995) Differentiation-stage specific expression of oncoprotein 18 in human and rat prostatic adenocarcinoma. *Prostate.* 27, 102-109
- Furchgott, RF. and Zawadzki, JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288, 373-376
- Garbers, D. L. and Lowe, D. G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 269, 30741-4
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 21, 1037-1053
- Habelhah, H., Takahashi, S., Cho, S. G., Kadoya, T., Watanabe, T. and Ronai Z. (2004) Ubiquitination translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *The EMBO J.* 23, 322-332
- Hanash, S. M., Strahler, J. R., Kuik, R., Chu, E. H. and Nichols, D. (1988) Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *J Biol Chem.* 263, 12813-12815
- Hofmann, F. and Sold, G., (1972) A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3': 5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 49, 1100-1107
- Hofmann, F., Ammendola, A. and Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.*, 113, 1671-1676
- Hofmann, F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 280, 1-4
- Horwitz, S. B., Shen, H. J., He, L., Dittmar, P., Neef, R., Chen, J. and Schubart, U.K. (1997) The microtubule-destabilizing activity of metablastin (p19) is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem.* 272, 8129-8132
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. and Wood, K. S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. *Circ Res.* 61, 866-879
- Jin, K., Mao, X., Cottrell, B., Schilling, B., Xie, L., Row, R. H., Sun, Y., Peel, A., Childs, J., Gendeh, G., Gibson, B. W. and Greenberg, D. A. (2004) Proteomic and immunochemical characterization of a role for stathmin in adult neurogenesis. *FASEB J.* 18, 287- 299
- Jourdain, L., Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D. and Carlier, M. F. (1997) Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry.* 36, 10817-10821

- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerine and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 3, 23-35
- Kellner, R. (2000) Proteomics. Concepts and perspectives. *Fresenius J Anal Chem.* 366, 517-524
- Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 26, 231-243
- Kuo, J. F. and Greengard, P. (1970) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3', 5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 245, 2493-2498
- Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G. and Gullberg, M. (1997) Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol* 17, 5530-5539
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature.*, 420, 868-874
- Lincoln, T. M., Dey, N., Boerth, N. J., Cornwell, T. L and Soff, G. A. (1998) Nitric oxide-cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases. *Acta Physiol Scand.* 164, 507-515
- Lincoln, T. M, Dey, N. and Sellak, H. (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol.* 91, 1421-1430
- Liedtke, W., Leman, E. E., Fyffe, R. E., Raine, C. S. and Schubart U.K. (2002) Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems. *Am J Pathol.* 160, 469-480
- Liu, X. H., Qian, L. J., Gong, J. B., Shen, J., Zhang, X. M. and Qiang X. H. (2004) Proteomic analysis of mitochondrial proteins in cardiomyocytes from chronic stressed rat. *Proteomics.* 4, 3167-3176
- Mann, M., Ong, S. E., Gronberg, M., Steen, H., Jensen, O. N. and Pandey, A. (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* 20, 261-268
- Manderson, J. A., Mosse, P.R. L., Safstrom, J. A., Young, S. B. and Campbell G. R. (1989) Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis.* 9, 289-298
- Merrilees, M. J., Campbell, J. H., Spanidis, E. and Campbell, G. R. (1990) Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium. *Atherosclerosis.* 81, 245-254
- Mullis K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-50
- Oelze, M., Mollnau, H., Hoffmann, N., Warnholtz, A., Bodenschatz, M., Smolenski, A., Walter, U., Skatchkov, M., Meinertz, T. and Münzel, T. (2000) Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res.* 87, 999-1005

- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250, 4007-4021
- Owens, G. K. (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 75, 487-517
- Pandey, A. and Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 405, 837-846
- Patterson, S. D. and Aebersold, R.H (2003) Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 33, 311-323
- Patton, W. F., Erdjument-Bromage, H., Marks, A. R. Tempst, P. and Taubman M. B., (1995) Components of the protein synthesis and folding machinery are induced in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic agents. Identification by comparative protein phenotyping and microsequencing. *J Biol Chem.* 270, 21404-21410
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135, 105-149
- Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E. and Fisher, E. A. (2003) Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 13531-13536
- Rowlands, D. C., Williams, A., Jones, N. A., Guest, S. S., Reynolds, G. M., Barber, P.C. and Brown, G. (1995) Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Lab Invest.* 72, 100-113
- Rubin, C. I. and Atweh, G. F. (2004) The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem.* 93, 242-250
- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F. and Beavo, J. A. (2002) Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE 5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 277, 3310-3317
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-91
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. and Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signaling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I beta. *Nature.* 404, 197-201
- Somlyo, A.P. and 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, 177-185
- Sonnenburg, W. K. and Beavo J. A. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol.* 26, 87-114
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. and Mendelsohn, M.E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I alpha. *Science.* 286, 1583-1587

- Thyberg, J., Nilsson, J., Palmberg, L. and Sjolund M. (1985) Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res.* 239, 69-74
- Tulk, B.M. and Edwards J. C. (1998) NCC27, a homolog of intracellular Cl⁻ channel p64, is expressed in brush border of renal proximal tubule. *Am J Physiol.* 274, F1140-49
- Ueda, S., Kato, S., Matsuoka, H., Kimoto, M., Okuda, S., Morimatsu, M. and Imaizumi, T. (2003) Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res.* 92, 226-233
- Valenzuela, S. M., Mazzanti, M., Tonini, R., Qiu, M. R., Warton, K., Musgrove, E. A., Campbell, T. J. and Breit, S. N. (2000) The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. *J Physiol.* 529, 541-552
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. and Feil, R. (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res.* 90, 18-20
- Weinmeister, P. (2003) Analyse der cGKI-regulierten Proteinexpression in glatten Gefäßmuskelzellen mittels 2D Gelelektrophorese. Diplomarbeit, TU München, 1-73
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138, 141-143
- Wilkins, M.R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, Hochstrasser, D. F. and Williams, K. L. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 13, 19-50
- Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F. and Feil, R. (2003) A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 13519-13524
- Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, J. and Campbell G. R. (2001) Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton.* 49, 130-145
- Yamahara, K., Itoh, H., Chun, T., H., Ogawa, Y., Yamashita, J., Sawada, N., Fukunaga, Y., Sone, M., Yurugi-Kobayashi, T., Miyashita, K., Tsujimoto, H., Kook, H., Feil, R., Garbers, D., Hofmann, F. and Nakao, K. (2003) Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 3404-3409
- You, S. A., Archacki, S. R., Angheloiu, G., Moravec, C. S., Rao, S., Kinter, M., Topol, E. J. and Wang, Q. (2003) Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics.* 13, 25-30
- Zahedi, K., Wang, Z., Barone, S., Tehrani, K., Yokota, N., Petrovic, S., Rabb, H. and Soleimani, M. (2004) Identification of stathmin as a novel marker of cell proliferation in the recovery phase of acute ischemic renal failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286, C1203-C1211

9 Eigene Veröffentlichungen

Kongressbeiträge:

Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, F and Feil, R. (Feb. 2005) Expression of cGMP-dependent protein kinase type I in the murine CNS and eye. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 371; R 52, 217 Suppl. 1

Originalarbeiten:

Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, R. and Feil, R. (2005) Distribution of cyclic GMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. Neuroscience, in press

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F. Hofmann für die Aufnahme in seinen Mitarbeiterkreis, für sein Interesse und für die Bereitschaft zur Lösung kleinerer und größerer Probleme bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. R. Feil, meinem Arbeitsgruppenleiter, für die interessante Aufgabenstellung und die hervorragende Betreuung und Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Feil, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und in besonderem Maße zum Gelingen der Arbeiten im Labor beigetragen hat.

Ebenso unverzichtbar war die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Kellermann. Für die gute Beratung bei Problemen mit der 2D Gelelektrophorese und für die Möglichkeit, meine Proben zu identifizieren, danke ich herzlich.

Des weiteren bedanke ich mich bei R. Ferstl für die Durchführung der RT-PCR und bei P. Weinmeister, der mich in die Methode der 2D Gelelektrophorese eingeführt hat.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Daniel Kook für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, deren finanzielle und tatkräftige Unterstützung das Studium und den erfolgreichen Abschluß erst ermöglichten. Des Weiteren bedanke ich mich bei Ihnen für die kritische Revision der vorläufigen Fassung dieser Arbeit.

Ein Dankeschön an alle Mitarbeiter des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre.