

Felix Balzer

**Zur Funktion
der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1
in der vaskulären glatten Muskulatur**

2003

Pharmakologie und Toxikologie

**Zur Funktion
der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1
in der vaskulären glatten Muskulatur**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Felix Balzer
aus Münster

2003

Dekan:

Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter:

Prof. Dr. E. J. Verspohl

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. J. Neumann

Tage der mündlichen Prüfungen:

28.01. / 30.01. / 02.02.2004

Tag der Promotion:

02.02.2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster in der Zeit von Juli 1999 bis November 2003 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. J. Verspohl angefertigt.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Herrn Prof. Dr. med. W. Schmitz für die Überlassung der interessanten und methodisch vielseitigen Aufgabenstellung, wie auch für die gute Betreuung, insbesondere die zahlreichen Ratschläge und anregenden Diskussionen,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. J. Verspohl für die freundliche Übernahme der naturwissenschaftlichen Betreuung der Arbeit und die damit verbundenen Mühen,

Herrn PD Dr. med. Jörg Knapp für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die engagierte Betreuung der experimentellen Arbeit,

dem Innovationsprogramm Forschung - Innovative Medizinische Forschung (IMF) - der universitären Forschungsförderung Münster und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung,

meiner Mit-Doktorandin Frau Dr. rer. nat. Susanne Regine Aleth für die schöne gemeinsame Zeit und den stetigen Beistand im Kampf mit den Unwägbarkeiten der Proteinphosphatasen,

Frau Dr. rer. nat. Karin Loser für die Einarbeitung in die Methodik der Molekularbiologie,

Herrn Dr. rer. nat. Peter Bokník, Herrn Dr. rer. nat. Christian von Wallbrunn, Frau Katja Dillenhöfer und Herrn Marek Mátus für die stets vorhandene Bereitschaft zur intensiven Diskussion und die kritische Korrektur dieser Arbeit,

allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen für ihre freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie das familiäre Arbeitsklima,

meinen Eltern und Julia für ihre uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung und den Rückhalt in der Familie.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Serin/Threonin-Proteinphosphatasen	1
1.2. Hemmstoffe der Proteinphosphatasen	3
1.2.1. Endogene inhibitorische Proteine	3
1.2.2. Exogene Hemmstoffe	5
1.3. Regulation der Kontraktionskraft des glatten Muskels	7
1.3.1. Die glattmuskuläre Kontraktion	7
1.3.2. Die Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins	8
1.4. Mögliche pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen im kardiovaskulären System	9
2. FRAGESTELLUNG	10
3. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1. Untersuchungsmaterial	12
3.1.1. Labortiere/Gewebe	12
3.1.2. Zellen	13
3.2. Kontraktionskraftmessung an intakten Gefäßringen der Maus	13
3.3. Kontraktionskraftmessung an gehäuteten Gefäßmuskelfasern der Maus	14
3.4. Proteinchemische Arbeitstechniken	16
3.4.1. Herstellung der Homogenate	16
3.4.2. Proteinbestimmungen	17
3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
3.4.4. Coomassie-Färbung	18
3.4.5. Eindimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese	18
3.4.6. Western Blot-Verfahren	19
3.4.7. Immunologische Identifizierung von Proteinen	19
3.4.8. Quantifizierung der Proteinexpression	20
3.5. Arbeitstechniken mit RNA	21
3.5.1. Gesamt-RNA-Präparation	21
3.5.2. RNA-Gelelektrophorese	22
3.5.3. Northern Blot-Verfahren	23
3.5.4. Herstellung und Markierung radioaktiver DNA-Sonden	23
3.5.5. Hybridisierung und Detektion	24
3.6. Arbeitstechniken mit DNA	25
3.6.1. Herstellung kompetenter Bakterien	25
3.6.2. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	26

3.6.3. Plasmid-DNA-Präparation	27
3.6.4. Klonierungstechniken	29
3.6.5. RT-PCR-Technik	31
3.6.6. Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus	32
3.6.7. Southern Blot-Verfahren	33
3.6.8. Herstellung und Markierung einer nicht-radioaktiven DNA-Sonde	33
3.6.9. Hybridisierung und Detektion	34
3.7. Bestimmung der Phosphataseaktivität	34
3.7.1. Nicht-radioaktiver Phosphatase-Assay	34
3.7.2. Radioaktiver Phosphatase-Assay	35
3.8. Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe eines Baculovirussystems	37
3.8.1. Kultur von Insektenzellen	38
3.8.2. Klonierung des Transfervektors der His ₆ -PP1 α	38
3.8.3. Generierung eines rekombinanten His ₆ -PP1 α -Baculovirus durch homologe Rekombination	39
3.8.4. Selektion eines rekombinanten Virus	41
3.8.5. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung	41
3.8.6. Expression der rekombinanten His ₆ -PP1 α in Sf21-Insektenzellen	42
3.8.7. Renaturierung unlöslicher Sf21 His-PP1	42
3.8.8. Aufreinigung und Konzentrierung der Sf21 His-PP1 durch Metallionen-Affinitätschromatographie	43
3.9. Glattmuskelspezifische Überexpression der PP1 α in transgenen Mäusen	44
3.9.1. Generierung transgener Mäuse	44
3.9.2. Genotypisierung mit Hilfe der PCR- und Southern Blot-Technik	46
3.9.3. Charakterisierung der transgenen Mäuse auf Proteinebene	46
3.10. Adenovirale Expressionssysteme	47
3.10.1. Klonierung der Transfervektoren	49
3.10.2. Homologe Rekombination in Bakterienzellen	52
3.10.3. Generierung von Viren in HEK293-Zellen	54
3.10.4. Amplifikation von Viren und Titerbestimmung	56
3.10.5. Kultur und Infektion von H9c2-Zellen	57
3.10.6. Kultur und Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten	58
3.10.7. Kultur und Infektion von Aortenringen der Maus	59
3.11. Statistische Auswertung	59
3.12. Sicherheitsbestimmungen	59

4. ERGEBNISSE	60
4.1. Calcium-unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur der Aorta der Maus durch Hemmstoffe der Proteinphosphatasen	60
4.1.1. Kontraktionskraftmessung an intakten Gefäßringen	60
4.1.2. Kontraktionskraftmessung an gehäuteten Gefäßmuskelfasern	62
4.1.3. Messung der MLC ₂₀ -Phosphorylierung	64
4.1.4. Immunologischer Nachweis der Proteinphosphatasen in intakten Gefäßringen und gehäuteten Gefäßmuskelfasern	67
4.2. Expression einer His ₆ -markierten PP1 α im Baculovirussystem	67
4.2.1. Expression der His ₆ -PP1 α in Sf21-Insektenzellen	68
4.2.2. Renaturierung der unlöslichen Sf21 His-PP1	73
4.2.3. Aufreinigung und Konzentrierung der renaturierten Sf21 His-PP1 mittels Metallionen-Affinitätschromatographie	73
4.2.4. Charakterisierung der renaturierten und gereinigten Sf21 His-PP1	75
4.3. Generierung transgener Mäuse zur glattmuskelspezifischen Überexpression der PP1 α	78
4.3.1. Charakterisierung des Genotyps	78
4.3.2. Charakterisierung des Phänotyps	81
4.4. Generierung rekombinanter Adenoviren zur Expression der PP1 α	81
4.4.1. Generierung der rekombinanten Adenoviren Ad-PP1 und Ad-His-PP1	81
4.4.2. Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren Ad-PP1 und Ad-His-PP1	82
4.4.3. Charakterisierung von pAdEasy-PP1-UTR Klonen	86
4.5. Generierung eines rekombinanten Adenovirus zur Expression des I ₂ der PP1	88
4.5.1. Generierung des Ad-I ₂	88
4.5.2. Untersuchung der Proteinexpression	88
4.5.3. Untersuchung des I ₂ -Effekts	92
4.5.4. Untersuchung der Phosphataseaktivität im Gesamtextrakt	93
4.5.5. Infektion von Primärkulturen	95
5. DISKUSSION	97
5.1. Calcium-unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur durch Hemmstoffe der Proteinphosphatasen	97
5.1.1. Zielsetzung	97
5.1.2. Wirkung von Hemmstoffen der Proteinphosphatasen auf die Kontraktionskraft intakter Gefäßringe der Maus	98

5.1.3.	Wirkung von Hemmstoffen der Proteinphosphatasen auf die Kontraktionskraft gehäuteter Gefäßmuskelfasern der Maus	98
5.1.4.	Wirkung von Cantharidin auf intakte und gehäutete Gefäßpräparationen im Vergleich	100
5.2.	Expression der PP1 α im Baculovirussystem	102
5.2.1.	Zielsetzung	102
5.2.2.	Expression der Sf21 His-PP1 als unlösliches Aggregat	104
5.2.3.	Renaturierung der unlöslichen Sf21 His-PP1	106
5.2.4.	Manganabhängigkeit der reaktivierten Sf21 His-PP1	107
5.3.	Glattmuskelspezifische Überexpression der PP1 α in transgenen Mäusen	110
5.3.1.	Zielsetzung	110
5.3.2.	Genotyp ohne Phänotyp	110
5.3.3.	Transkription	111
5.3.4.	Translation	112
5.4.	Adenovirale Expression der PP1 α	113
5.4.1.	Zielsetzung	113
5.4.2.	Ad-PP1 und Ad-His-PP1	113
5.4.3.	Ad-PP1-UTR	114
5.5.	Adenovirale Expression des I ₂ der PP1	116
5.5.1.	Zielsetzung	116
5.5.2.	Expression und inhibitorischer Effekt des I ₂	116
5.5.3.	Expressionsverhalten der Proteinphosphatasen infolge einer I ₂ -Überexpression	118
5.5.4.	Veränderungen der Phosphataseaktivität infolge einer I ₂ -Expression	119
5.5.5.	Infektion von Primärkulturen und Ausblick	120
6.	ZUSAMMENFASSUNG	122
7.	ANHANG	124
7.1.	Chemikalien, Puffer und Lösungen	124
7.2.	Antikörper	138
7.3.	Geräte und Bezugsquellen	139
7.4.	Primer und PCR-Programme	141
8.	LITERATURVERZEICHNIS	143

% (m/V)	Massen-Volumen-Prozent = g Substanz in 100 ml Endprodukt
% (V/V)	Volumen-Prozent = ml Substanz in 100 ml Endprodukt
A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AcNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
Ad	Adenovirus
α MHC	kardiale α -Isoform der schweren Kette des Myosins
Amp	Ampicillinresistenzgen
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat Toluidin-Salz
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti (10^{-2})
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca^{2+}	Calciumionen
$[\text{Ca}^{2+}]$	freie Calciumionenkonzentration
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	freie, intrazelluläre Calciumionenkonzentration
CaM	Calmodulin
Cant	Cantharidin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	codierende Sequenz
CIP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Rinderdarm)
CMF HBSS	calcium- und magnesiumfreie Hank´s balanzierte Salzlösung
CMV	Zytomegalievirus(-Promotor)
CPI-17	PKC-abhängiger Phosphataseinhibitor (17 kDa)
DAG	Diacylglycerol
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein (32 kDa)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt

DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E x	1. x-ter Tag der Embryogenese 2. <i>early gene</i> x (frühe Gene der adenoviralen Infektion)
ECF	<i>enhanced chemifluorescence</i> (-Substrat)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ec PP1 α	rec. PP1 α aus <i>E. coli</i> (Zhang et al. 1992)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
x g	Vielfaches der Fallbeschleunigung
GFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (vereinfachend für die weniger gebräuchliche, aber zutreffende Abkürzung eGFP)
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H9c2	kontinuierlich wachsende Zelllinie aus embryonalem Rattenmyokard
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i> (humane embryonale Nierenzellen)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
His _x	Polyhistidin-Sequenz der angegebenen Länge (x)
I ₁	Inhibitor 1 der Proteinphosphatase 1
I ₂	Inhibitor 2 der Proteinphosphatase 1
IC ₅₀	inhibitorische Konstante 50
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IMAC	immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie

IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IU	1. infektiöse Einheiten (im Zusammenhang mit Viren) 2. internationale Einheiten (z. B. Penicilline, Phosphorylase-Kinase)
Kan	Kanamycinresistenzgen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K-PSS	kaliumhaltige physiologische Salzlösung
Ktr.	Kontrolle
l	Liter
L	Leucin
lg	dekadischer Logarithmus
m	1. Meter 2. Milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
MC	Microcystin LR
mCi	Millicurie = 37 x 10 ⁶ Bq
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MLC ₂₀	regulatorische leichte Kette des Myosins (20 kDa)
MLCK	Kinase der leichten Kette des Myosins
MLCP	Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins
MMLV	<i>murine moloney leukemia virus</i> (Moloney-Maus-Leukämievirus)
MOI	Multiplizität der Infektion
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Newton
n	Stichprobenumfang
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NI	nicht infiziert
NRC	neonatale Rattenkardiomyozyten
nt	Nucleotid
OA	Okadasäure
OD _x	optische Dichte bei x nm

ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsstart)
p	<i>probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
P	Phosphor
<i>P</i>	Phosphat
³² P	Radionuklid des Phosphor
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCa	- lg [Ca ²⁺]
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	<i>plaque-forming units</i> (Plaques-bildende Einheiten)
pH	- lg [H ⁺]
p. i.	<i>post infectionem</i> (nach Infektion)
PI-Einheiten	PhosphorImager-Einheiten
PK	Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNP	p-Nitrophenol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PP	Serin/Threonin-Proteinphosphatase
PP1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 1
PP1 _α	katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 Isoform α
PP2A	katalytische Untereinheit der PP2A (Isoformen α und β)
Primer	Oligonucleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
PSS	physiologische Salzlösung
Pwo	DNA Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>
q. s.	<i>quantum satis</i> (soviel wie nötig)
R	Arginin
rec.	rekombinant
rl ₂	rekombinanter I ₂ aus <i>E. coli</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

rPP1 α	rekombinante PP1 α aus <i>E. coli</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	1. Raumtemperatur 2. Reverse Transkription
S	Sedimentationskonstante (Svedberg-Einheit)
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Linie 9 (Insektenzelllinie)
Sf9 PP1	rec. PP1 α aus Sf9-Insektenzellen (Watanabe et al. 2001)
Sf9 PP2B	rec. PP2B aus Sf9-Insektenzellen (Perrino et al. 1992)
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> Linie 21 (Insektenzelllinie)
Sf21 PP1	rec. PP1 α aus Sf21-Insektenzellen (Berndt und Cohen 1990)
Sf21 His-PP1	rec. His ₆ -PP1 α aus Sf21-Insektenzellen
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
ST	Standard
s. u.	siehe unten
syn.	synonym
T	Threonin
t ₅₀	Zeitspanne in der 50% eines maximalen Effektes erreicht werden
Tab.	Tabelle
Taq	DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TEV	TEV-Protease-Erkennungssequenz (<i>tabacco etch virus</i>)
TG	transgen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
U	<i>unit</i> (Einheit)
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV-Licht	ultraviolettes Licht

V	1. Volt
	2. Volumen
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i> (gegen)
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein weit verbreiteter Mechanismus der Regulation zellulärer Prozesse. Circa 30% der menschlichen Proteine enthalten kovalent gebundenes Phosphat (DePaoli-Roach et al. 1994). Der Grad der Phosphorylierung reflektiert dabei die relative Aktivität phosphorylierender Proteinkinasen (PK) und dephosphorylierender Proteinphosphatasen (PP). Durch Phosphorylierung ist eine Beeinflussung der Proteineigenschaften in Form von: Steigerung oder Unterdrückung von Enzymaktivität, Markierung für den Abbau, Zuordnung zu einem subzellulären Kompartiment und Interaktion mit bzw. Dissoziation von kooperierenden Proteinen möglich (Cohen 2001). Dieser einfache, reversible Mechanismus post-translationaler Modifikation ermöglicht es der Zelle, ihre Eigenschaften schnell und flexibel den jeweiligen Erfordernissen anzupassen.

1.1. Serin/Threonin-Proteinphosphatasen

Traditionell werden die Phospho-Serin und -Threonin dephosphorylierenden PPs anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren in Typ 1 und Typ 2 PPs gegliedert (Cohen und Cohen 1989, Cohen 1989, Shenolikar und Nairn 1991). Die Typ 1 PPs werden durch die PP1-spezifischen inhibitorischen Proteine 1 (I_1) und 2 (I_2) gehemmt (s. 1.2.1.). Sie dephosphorylieren bevorzugt die β -Untereinheit der Phosphorylasekinase. Dagegen dephosphorylieren die Typ 2 PPs hauptsächlich die α -Untereinheit der Phosphorylasekinase und werden nicht durch I_1 oder I_2 in ihrer Aktivität gehemmt. Die Typ 2 PPs werden noch weiter in die Subtypen PP2A, PP2B und PP2C unterteilt. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren vier zusätzliche PP-Typen identifiziert (Cohen 1997); diese sind: PP4 (Brewis et al. 1993), PP5 (Chen und Cohen 1997), PP6 (Bastians und Ponstingl 1996) und PP7 (Huang und Honkanen 1998).

Die verschiedenen PP-Typen lassen sich aufgrund der Abhängigkeit ihrer katalytischen Aktivität von divalenten Kationen weiter charakterisieren. Die Aktivität der PP2B, PP2C und PP7 ist vollständig von divalenten Kationen abhängig, wohingegen PP1, PP2A, PP4 und PP5 katalytisch spontan aktiv sind. Die Aktivität der PP2B ist Ca^{2+} -abhängig, die PP2C benötigt Magnesium (Herzig und Neumann 2000, Mumby und Walter 1993) und die PP7 ist Mg^{2+} -abhängig und wird durch Calcium aktiviert (Huang und Honkanen 1998). PP6 wurde bisher nicht biochemisch charakterisiert.

Die primären Aminosäuresequenzen und Kristallstrukturen der PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 und PP7 besitzen große Ähnlichkeiten und werden als sog. PPP-Genfamilie zusammengefaßt. Die PP2C hingegen unterscheidet sich von ihnen und bildet die sog. PPM-Genfamilie (Cohen 1997, 2002).

Für die Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur ist insbesondere die PP1 von zentraler Bedeutung, da sie als Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) zur Relaxation der Muskulatur beiträgt (s. 1.3.2.). Die vier in Säugetierzellen gefundenen PPs vom Typ 1 werden als PP1 α , PP1 β (syn. PP1 δ), PP1 γ_1 und PP1 γ_2 bezeichnet (Sasaki et al. 1990). Sie werden von drei Genen codiert, wobei die PP1 γ_1 und PP1 γ_2 *Splice*-Varianten eines Gens sind. Eine weitere PP1 α -Variante, PP1 α_2 (Durfee et al. 1993, Yoshida et al. 1999), wurde bei Menschen gefunden, was darauf hindeutet, daß auch von dieser PP1-Isoform mindestens zwei *Splice*-Varianten existieren. Die Sequenzhomologie zwischen den einzelnen PP1-Isoformen ist > 90%. Die Sequenzen der Isoformen sind zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert, z. B. ist die Homologie der PP1 α von Ratte, Maus und Kaninchen > 99%; PP1 α der Ratte und des Mensch sind identisch (Barker et al. 1990, Berndt et al. 1987, Kitamura et al. 1991, Sangrador et al. 1998). Bisher konnten die Kristallstrukturen der PP1 α und der PP1 γ_1 aufgeklärt werden. Die PP1 ist danach ein globuläres Protein, dessen Oberfläche von drei Furchen - der hydrophoben Furche, der sauren Furche und der C-terminalen Furche - durchzogen wird. Das aktive Zentrum liegt im Kreuzungspunkt der drei Furchen (Egloff et al. 1995, Egloff et al. 1997, Goldberg et al. 1995).

Die PP1 reguliert neben der Muskelkontraktion auch so unterschiedliche zelluläre Prozesse wie den Zellzyklusverlauf, die Proteinsynthese, den Kohlenhydrat-metabolismus, die Transkription und die neuronale Signaltransduktion (Cohen 2002, Shenolikar und Nairn 1991, Wera und Hemmings 1995). Die Regulation dieser Vielfalt zellulärer Prozesse durch ein einzelnes Enzym gelingt aufgrund der Interaktion der katalytischen Untereinheit der PP1 mit mehr als 50 verschiedenen regulatorischen Untereinheiten (Cohen 2002). Die Interaktion der regulatorischen Untereinheiten erfolgt dabei mit der hydrophoben Furche auf der Oberfläche der PP1 über ein kurzes stark konserviertes Bindungsmotiv, dem RVxF-Motiv (Cohen 2002). Die meisten der regulatorischen Untereinheiten führen die katalytische Untereinheit einem spezifischen subzellulären Kompartiment zu. Regulatorische Untereinheiten der PP1 sind z.B. die Glykogen-bindenden Untereinheiten, G_M und G_L (Johnson et al. 1996), die Myosin-bindenden Untereinheiten M₁₁₀₋₁₃₃ (Johnson et al. 1997), die

regulatorischen Proteine des Zellkerns, mit dem Kerninhibitor der PP1 (NIPP-1; Beullens et al. 1999) und der nukleären regulatorischen Untereinheit der PP1 (PNUTS; Kim et al. 2003) sowie dem neuronalen Protein Neurabin I (McAvoy et al. 1999). Neben den regulatorischen Untereinheiten sind mehrere endogene inhibitorische Proteine bekannt, die ebenfalls zur Regulation der PP1-Aktivität beitragen (s. 1.2.1.). Im Folgenden ist mit der Bezeichnung Proteinphosphatase 1 (PP1) die katalytische Untereinheit der PP1 gemeint.

1.2. Hemmstoffe der Proteinphosphatasen

1.2.1. Endogene inhibitorische Proteine

Die PP1 wird durch mehrere endogene inhibitorische Proteine reguliert. Hierzu gehören der Inhibitor 1 (I_1), der Inhibitor 2 (I_2), das Dopamin- und cAMP-regulierte Phosphoprotein-32 (DARPP-32) und der nukleäre Inhibitor der PP1 (NIPP-1) (Cohen 2002, Herzig und Neumann 2000). Der inhibitorische Effekt aller vier Inhibitoren ist thermo- und säurestabil, ein für Proteine ungewöhnliches Verhalten. I_1 und DARPP-32 sind Strukturhomologe; zu I_2 oder NIPP-1 bestehen hingegen kaum Sequenzhomologien. Auch in Bezug auf ihre Regulation durch reversible Phosphorylierung unterscheiden sich die vier Inhibitoren. I_1 und DARPP-32 entwickeln ihren inhibitorischen Effekt erst nach Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (Endo et al. 1996, Huang et al. 1999). Im Gegensatz dazu sind die unphosphorylierten Formen von I_2 und NIPP-1 potente Inhibitoren der PP1, deren Effektivität durch Phosphorylierung vermindert wird. Inaktive Komplexe von PP1 mit I_2 oder NIPP-1 werden durch Phosphorylierung der Inhibitoren reaktiviert (Beullens et al. 1999, Huang et al. 1999, Jagiello et al. 1995, Park und DePaoli-Roach 1994).

Interagiert der unphosphorylierte I_2 mit der PP1, kommt es zunächst zur Hemmung der Enzymaktivität und anschließend zur Bildung eines stabilen, inaktiven Komplexes, der als ATP-Mg-abhängige Phosphatase bezeichnet wird. Phosphorylierung des Heterodimers am Threonin-72 des I_2 durch Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) führt zu einer Erhöhung der Phosphataseaktivität ohne vorherige Dissoziation des Komplexes (DePaoli-Roach 1984). Es wird angenommen, daß durch die Phosphorylierung des I_2 eine Konformationsänderung ausgelöst wird, welche die katalytische Untereinheit in einen aktiven Zustand versetzt. Nach einer schnellen Autodephosphorylierung wird der Komplex gegenüber exogenem Substrat katalytisch aktiv. Im dephosphorylierten Komplex invertiert die katalytische Untereinheit anschließend wieder langsam zum ursprünglichen inaktiven Zustand

(s. Abb. 1.1.; Park und DePaoli-Roach 1994). Damit zeigt der I_2 sowohl hemmende als auch inaktivierende Effekte (Bollen und Stalmans 1992). Die Hemmung erfolgt schnell und kann nicht durch Phosphorylierung aufgehoben werden. Unter hemmenden Bedingungen verbleibt die PP1 in der aktiven Konformation. Im Gegensatz dazu erfolgt die Inaktivierung langsamer und es kommt zu einer Konformationsänderung der PP1 in eine inaktive Form. Diese Konformationsänderung kann durch Phosphorylierung von I_2 , nicht aber durch Elimination des I_2 , aufgehoben werden.

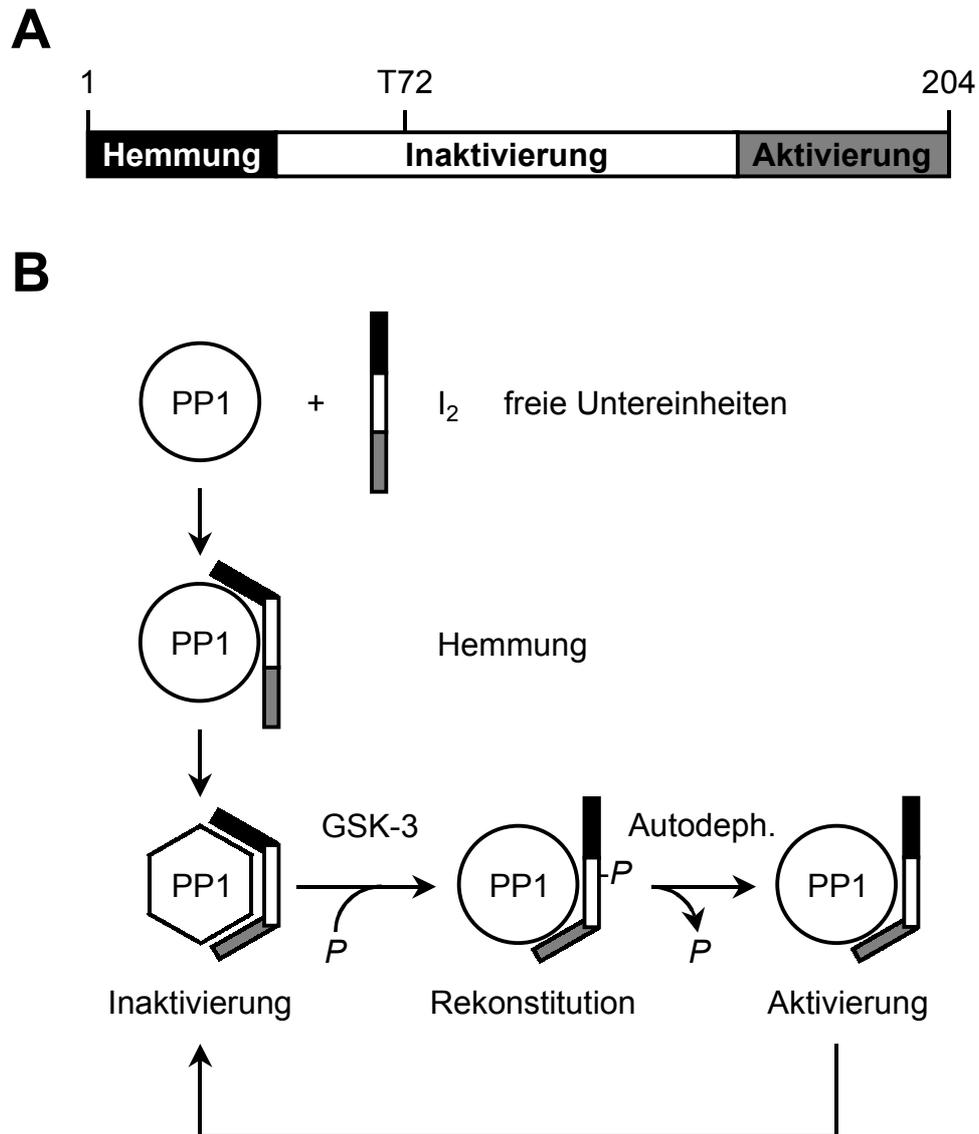


Abb. 1.1.:
Schema zur Interaktion zwischen der Proteinphosphatase 1 (PP1) und dem Inhibitor 2 (I_2)

(A) Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Inhibitors 2 der Proteinphosphatase 1 (I_2). **(B)** Modell der Hemmung, Inaktivierung, Rekonstitution und Aktivierung der PP1 durch den I_2 . GSK-3: Glykogen-Synthase-Kinase-3, P : Phosphat, T72: Threonin-72 des I_2 . (verändert nach Park und DePaoli-Roach 1994)

In jüngerer Zeit wurde ein weiterer PP1-Inhibitor entdeckt, das sog. CPI-17 (PKC-potenziertes inhibitorisches Protein der PP1, 17 kDa). CPI-17 wird ausschließlich in der glatten Muskulatur und im Gehirn exprimiert. CPI-17 entwickelt seinen inhibitorischen Effekt erst nach Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) oder Rho-assoziierte Kinase (ROK) und ist ein potenter Inhibitor der Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) (Kitazawa et al. 2000, Li et al. 1998).

Die Existenz einer großen Anzahl endogener Inhibitoren der PP1 deutet darauf hin, daß es für eine funktionierende Zellhomöostase wichtig ist, die Aktivität einer ungebundenen und damit unregulierten PP1 umgehend unter eine adäquate Kontrolle zu stellen (Cohen 2002). Dies unterstreicht abermals die universelle Bedeutung der PP1.

1.2.2. Exogene Hemmstoffe

Das Studium der PPs wurde durch die Entdeckung exogener Hemmstoffe erleichtert (Herzig und Neumann 2000). Hier wurden die Phosphatasehemmstoffe Cantharidin, Okadasäure und Microcystin LR zur Charakterisierung der PPs eingesetzt. Abb. 1.2. zeigt die chemischen Strukturformeln der Hemmstoffe.

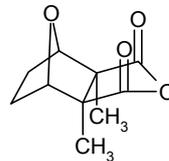
Cantharidin (Cant) ist ein Phthalsäureanhydrid, das von verschiedenen Käferarten, wie beispielsweise von der „Spanischen Fliege“ (*Cantharis vesicatoria*), produziert wird. Cant ist membrangängig und hemmt PP1 und PP2A mit IC_{50} -Werten von 500 und 40 nM (Honkanen 1993, Li et al. 1993, Neumann et al. 1995).

Okadasäure (OA) ist ein komplexer Polyether, der aus pazifischen Schwämmen (z. B. *Halichondria okadae*) isoliert wird (Tachibana et al. 1981). OA hemmt die PP1- und PP2A-Aktivität mit IC_{50} -Werten von 270 und 2 nM (Bialojan und Takai 1988).

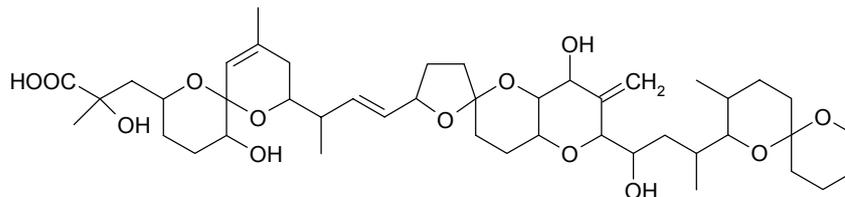
Microcystin LR (MC), ein von Cyanobakterien (z. B. *Microcystis aeruginosa*) produziertes cyclisches Heptapeptid, ist der potenteste (und toxischste) bekannte PP-Hemmstoff (Honkanen et al. 1994) mit IC_{50} -Werten von 0.1 nM für PP1 und PP2A (MacKintosh et al. 1990). MC kann als hydrophile Substanz nicht in intakte Zellen eindringen.

A

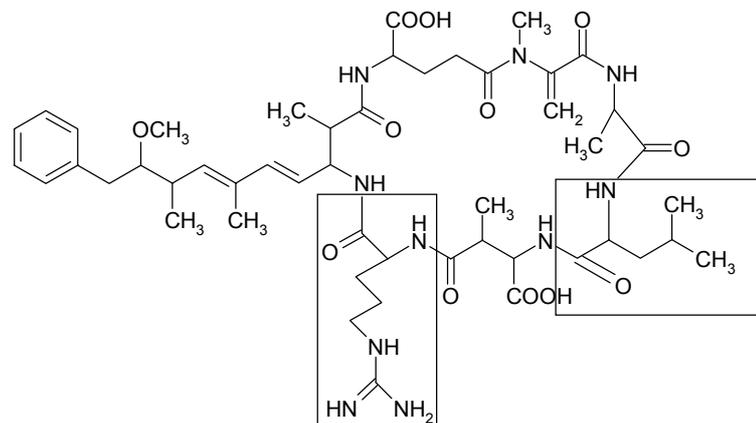
Cantharidin



Okadasäure



Microcystin LR

**B**

Hemmstoff	Substanz- klasse	IC ₅₀ (nM)	
		PP1	PP2A
Cantharidin (Cant)	Phthalsäure- anhydrid	500	40
Okadasäure (OA)	Polyether	270	2
Microcystin LR (MC)	Heptapeptid	0.04-1	0.04-1
Inhibitor 2 der PP1 (I ₂)	Protein	3-7	-

Abb. 1.2.:
Phosphatase-Hemmstoffe

(A) Chemische Strukturen von Cantharidin, Okadasäure und Microcystin LR (die Rahmen kennzeichnen die zwei in den Microcystinen variablen Aminosäuren Leucin (L) und Arginin (R)), (B) Biochemische Hemmstoffkonstanten der verwendeten Phosphatasehemmstoffe (verändert nach Herzig und Neumann 2000).

1.3. Regulation der Kontraktionskraft des glatten Muskels

1.3.1. Die glattmuskuläre Kontraktion

Der kontraktile Status der glatten Muskulatur wird primär durch die Konzentration an freiem intrazellulärem Calcium ($[Ca^{2+}]_i$) und daraus folgend dem Phosphorylierungsgrad der 20 kDa regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC_{20}) kontrolliert (Abb. 1.3.; Somlyo und Somlyo 1994). Kontraktile Stimuli erhöhen $[Ca^{2+}]_i$, indem Calcium (Ca^{2+}) aus dem extrazellulären Raum durch spannungsabhängige oder Rezeptor-gekoppelte Calciumkanäle eintritt und/oder aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird (Morano 1992). So bewirkt α -adrenerge Stimulation über die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) eine IP_3 -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum. Durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ werden die Ca^{2+} -Bindungsstellen des Calmodulins (CaM) abgesättigt. CaM ist an die Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) gebunden (Bayley et al. 1996, Johnson et al. 1996). Durch die Bindung von Ca^{2+} an CaM kommt es zu einer Konformationsänderung der MLCK, wodurch dem Substrat Myosin der Zugang zur Kinase ermöglicht wird (Pearson et al. 1988, Rhoads und Friedberg 1997). Der aktive Enzymkomplex Ca^{2+} -CaM-MLCK katalysiert primär den Transfer einer Phosphatgruppe auf die Aminosäure Serin-19 der MLC_{20} (Gallagher et al. 1997). In geringerem Ausmaß kommt es zur Diphosphorylierung der MLC_{20} durch zusätzliche Phosphorylierung von Threonin-18 (Ikebe et al. 1986). Diese Phosphorylierungsreaktion aktiviert die Actin-abhängige ATPase-Aktivität des Myosins und initiiert so die Kraftentwicklung des Muskels (Somlyo und Somlyo 1994).

Nach Wiederherstellung der $[Ca^{2+}]_i$ des Ruhezustands relaxiert die glatte Muskulatur. Dabei wird Ca^{2+} aus der Zelle entfernt oder erneut in das endoplasmatische Retikulum aufgenommen. Dies hat die Dissoziation des Ca^{2+} vom CaM und damit die Inaktivierung der MLCK zur Folge. Die MLC_{20} wird durch die Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) dephosphoryliert, wodurch der Querbrückenzyklus unterbunden wird und die Muskulatur relaxiert (Erdödi et al. 1996).

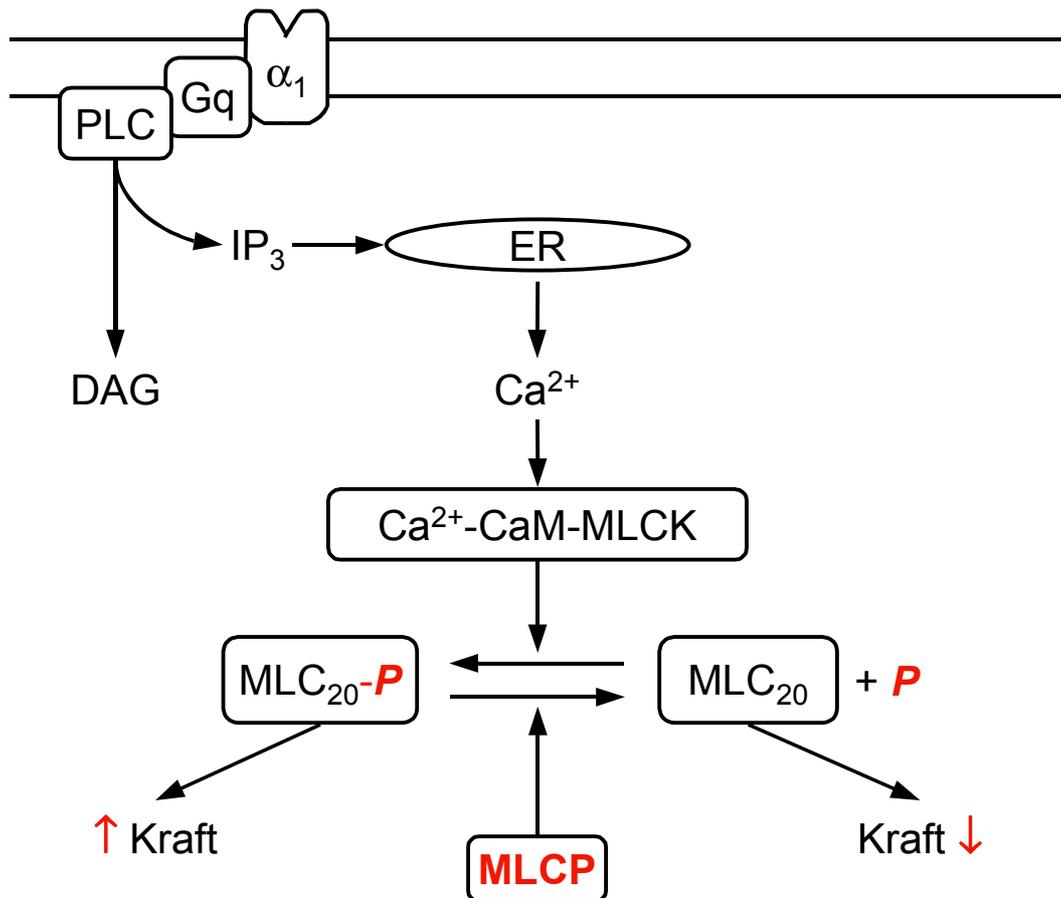


Abb. 1.3.:
Schema zur Regulation des Gefäßtonus

Schematische Darstellung der Regulation der Kraftentwicklung im glatten Muskel. Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren (α_1) führt über ein G-Protein (G_q) und Phospholipase C (PLC) zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 setzt Calcium (Ca^{2+}) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) frei. Ca^{2+} bindet an Calmodulin (CaM), wodurch die Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) aktiviert wird. Die MLCK phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC_{20}), was den Querbrückenzyklus der Myofilamente und damit die Kraftentwicklung ermöglicht. Die Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) hebt die Phosphorylierung durch die MLCK auf und es kommt zur Relaxation. P : Phosphat.

1.3.2. Die Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP)

Die MLCP ist eine Typ 1 Serin/Threonin-Proteinphosphatase. Das MLCP-Holoenzym besteht aus drei Untereinheiten: der 37 kDa schweren katalytischen Untereinheit (PP1), einer 110-133 kDa Myosin-bindenden Untereinheit ($M_{110-133}$: M_{110} in der Aorta der Ratte, M_{130} bzw. M_{133} im Zwischenmagen des Truthahns), die das Enzym an die Myosinfilamente bindet und einer 20 kDa Untereinheit (M_{20}) unbekannter Funktion (Hartshorne et al. 1998, Hartshorne und Hirano 1999).

Lange Zeit wurde angenommen, daß der Grad der Phosphorylierung der MLC_{20} und damit der glattmuskulären Kontraktion ausschließlich durch die Aktivität der MLCK beeinflusst wird und die MLCP konstitutiv aktiv ist. Jedoch sind inzwischen mehrere Mechanismen der Regulation der MLCP bekannt (Araki et al. 2001, Guo et al. 2003, Kitazawa et al. 2000, Niiro et al. 2003, Swärd et al. 2000, 2003). Die über diese Signaltransduktionswege vermittelte Hemmung der MLCP führt zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Verschiebung des MLCP-MLCK-Verhältnisses zugunsten der MLCK und wird auch als Calciumsensitivierung bezeichnet (Somlyo und Somlyo 2000).

1.4. Mögliche pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen im kardiovaskulären System

Veränderungen der kontraktile Eigenschaften der vaskulären glatten Muskulatur sind Bestandteil der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen wie Bluthochdruck und Krankheiten der Koronararterien (Somlyo und Somlyo 1994). Dabei könnte eine veränderte Phosphataseaktivität eine Rolle spielen (Knapp et al. 1999b). Einige Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionswege der Hemmung der Phosphataseaktivität sind bereits bekannt (s. 1.3.2.). Inwiefern Phosphatasen an der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen beteiligt sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Aus diesem Grund ist es von klinischer Relevanz, die Bedeutung der PPs für die Regulation der glattmuskulären Kontraktion detaillierter zu verstehen. Auf lange Sicht könnten durch weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet die PPs und ihre Regulation zum Wirkprinzip neuer Arzneimittel der Blutdruckregulation werden.

2. FRAGESTELLUNG

Der kontraktile Status der glatten Muskulatur wird primär durch die Konzentration an freiem intrazellulärem Calcium und daraus folgend dem Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC₂₀) kontrolliert. Der Phosphorylierungsgrad der MLC₂₀ wird jedoch nicht allein durch die Ca²⁺-abhängige phosphorylierende Aktivität der Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) bestimmt, sondern zusätzlich durch die Ca²⁺-unabhängige dephosphorylierende Aktivität der Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) beeinflusst. Bei der MLCP handelt es sich um eine heterotrimere Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1.

Aufgrund dieser zentralen Bedeutung der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1 (PP1) für die Regulation der Kontraktionskraft des glatten Muskels sollten im Rahmen dieser Arbeit die Konsequenzen einer veränderten zellulären PP1-Aktivität auf die Regulationsmechanismen in der vaskulären glatten Muskulatur untersucht werden. Dabei wurde angenommen, daß eine Senkung der Phosphataseaktivität zu einem erhöhten Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC₂₀) und damit zu einer Zunahme der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur führt. Umgekehrt sollte eine Erhöhung der Phosphataseaktivität eine vermehrte Dephosphorylierung der MLC₂₀ bewirken, wodurch eine Relaxation der glatten Muskulatur erfolgt. Über diese beiden Mechanismen sollte es folglich möglich sein, den kontraktile Status der vaskulären glatten Muskulatur und damit den Gefäßtonus Ca²⁺-unabhängig zu regulieren.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden *ex vivo*- und *in vivo*-Modellsysteme entwickelt, in denen die Phosphataseaktivität entweder durch Hemmstoffe der Phosphatasen erniedrigt oder durch eine Erhöhung der intrazellulären Enzymkonzentration gesteigert werden sollte. Zunächst sollte der Effekt von exogenen PP-Hemmstoffen auf die glatte Muskulatur der Aorta der Maus untersucht werden. Hierzu wurden Kontraktionskraftmessungen an intakten Gefäßringen, in Gegenwart von Ca²⁺, und an gehäuteten Gefäßmuskelfasern, in Abwesenheit von Ca²⁺, durchgeführt. Die Auswirkungen einer gesteigerten Phosphataseaktivität sollte im Modell der gehäuteten Gefäßmuskelfaser durch exogene Zugabe rekombinanter PP1 untersucht werden. Hierzu wurde rekombinante PP1 α mit Hilfe des Baculovirussystems erzeugt, isoliert und charakterisiert.

Neben den Untersuchungen in *ex vivo*-Modellen wurden auch *in vivo*-Modellsysteme etabliert. So sollte die PP1 α einerseits glattemuskelspezifisch im Modell der transgenen Maus und andererseits in Zell- und Gewebekulturen mit Hilfe des adenoviralen Expressionssystems überexprimiert werden. Parallel wurde der Inhibitor 2 der PP1 (I₂) im adenoviralen Expressionssystem exprimiert, um ein *in vivo*-Modell mit spezifisch reduzierter PP1-Aktivität zu generieren.

Durch diese Modelle sollte einerseits ein detaillierterer Einblick in die Regulationsmechanismen der Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur gewonnen werden; andererseits sollten Optionen der Beeinflussung der zellulären PP1-Aktivität erörtert werden, die zur Basis neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen werden könnten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Untersuchungsmaterial

3.1.1. Labortiere/Gewebe

Alle behördlichen Genehmigungen zur Durchführung von Organentnahmen lagen vor (Genehmigungsnummer G 45/96 des Regierungspräsidenten Münster).

Aorta der Maus

Die verwendeten Aorten stammten von erwachsenen (8-12 Wochen) CD-1 Mäusen der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) und wurden als Inzuchtlinie weiter gezüchtet. Die Mäuse wurden mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin®) und Leitungswasser *ad libitum* versorgt.

Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch Einatmen von Kohlendioxid getötet. Der Thoraxraum wurde vollständig eröffnet. Die Lunge, das Herz, der Thymus, die Trachea und der Ösophagus wurden entfernt. Die Aorta thoracica descendens wurde von der Durchtrittsstelle durch das Zwerchfell bis zum Aortenbogen entnommen. Die Aorta wurde sofort in kalte PBS pH 7.45 (s. 7.1.) überführt und aus dem umgebenden Fett- und Bindegewebe heraus feinpräpariert. Gerinnungsthromben im Aortenlumen wurden unter Zuhilfenahme einer Insulinspritze ausgeschwemmt.

Für Kontraktionskraftmessungen an intakten Gefäßringen der Maus (s. 3.2.) wurde die Aorta mit einem Skalpell durch wiegende Bewegungen transversal in ca. zwei Millimeter breite Ringe geschnitten. War die Aorta für die Gewebekultur vorgesehen (s. 3.10.7.) erfolgte die Präparation in kalter Krebs-Bicarbonat-Lösung (s. 7.1.). Für Kontraktionskraftmessungen an gehäuteten Gefäßmuskelfasern der Maus (s. 3.3.) wurde die Aorta zunächst der Länge nach mit einer Schere eröffnet und anschließend mit einem Skalpell durch wiegende Bewegungen transversal in Gefäßstreifen geschnitten (ca. 500-700 µm breit und ca. 3-4 mm lang). Für biochemische Untersuchungen wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Mäuse zur Generierung transgener Tiere

Zur Generierung transgener Mäuse wurden FVB/N-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borchen) verwendet (s. 3.9.). Für die dabei erhaltenen Mäuse der Ursprungs- und Folgegenerationen galten Haltungs- und Organentnahmebedingungen entsprechend dem oben Genannten.

3.1.2. Zellen

Insektenzellen

Bei den Insektenzellen handelt es sich um eine kontinuierlich wachsende Invertebratenzelllinie aus Ovarienzellen der Art *Spodoptera frugiperda* (Sf), einer amerikanischen Schmetterlingsart (Heerwurm; Vaughn et al. 1977). Insektenzellen wurden zur Expression rekombinanter Proteine im Baculovirussystem eingesetzt. Es wurde die Zelllinie Sf21 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zur Kultur der Zelllinie siehe 3.8.1..

H9c2-Zellen

Die H9c2-Zelllinie (ATCC, Manassas, USA) ist eine kontinuierlich wachsende, klonale Zelllinie, die aus embryonalem Rattenmyokard gewonnen wurde (Kimes und Brandt 1976). H9c2-Zellen dienen der Charakterisierung rekombinanter Adenoviren. Zur Kultur von H9c2-Zellen siehe 3.10.5..

Neonatale Rattenkardiomyozyten

Rattenkardiomyozyten wurden aus Neugeborenen (1-3 Tage) Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) isoliert und als Primärkultur im Zusammenhang mit dem adenoviralen Expressionssystem verwendet. Zur Isolierung und Kultur siehe 3.10.6..

3.2. Kontraktionskraftmessung an intakten Gefäßringen der Maus

Gefäßringe der Aorta der Maus (ca. zwei Millimeter lang) wurden wie unter 3.1.1. beschrieben präpariert und einzeln in einen Gefäßmyographen eingesetzt. Zur Kontraktionskraftmessung wurden zwei Drähte durch das Lumen des Gefäßrings geführt und mit Schrauben an den Kraftaufnehmern des Gefäßmyographen fixiert (Mulvany und Halpern 1977). Die Aorta wurde in mit Carbogen begaster physiologischer Salzlösung (PSS, s. 7.1.) für 30 min bei 37°C äquilibriert und anschließend auf einen für die Kraftentwicklung optimalen Lumendurchmesser vorgespannt. Diese optimale Grundspannung wurde aufgrund des Verhältnisses von innerem Gefäßumfang und Wandspannung ermittelt. Der innere Gefäßumfang wurde auf 90-100% desjenigen Umfangs gebracht, den das Gefäß gehabt hätte, wenn es einer passiven Spannung entsprechend einem transmuralen Druck von 100 mmHg ausgesetzt worden wäre (Mulvany und Halpern 1977); dies sind 30-35 mN (Lalli et al. 1997; Liu et al. 1997).

Die Gefäßringe wurden dreimal mit PSS gewaschen und anschließend zweimal durch Zugabe von kaliumhaltiger PSS (K-PSS, K^+ 118 mM, s. 7.1.) für 20 min zur Kontraktion gebracht. In K-PSS war im Vergleich zu PSS NaCl äquimolar gegen KCl ausgetauscht worden. Nach Auswaschen von K-PSS mit PSS, wurden Hemmstoffe der PPs (gelöst in DMSO und mit PSS verdünnt; DMSO-Endkonzentration 1% (V/V)) zugegeben und die Veränderungen in der Kontraktionskraft aufgezeichnet. Die Kraft wurde als aktive Wandspannung dargestellt (= Anstieg der über die Grundspannung hinaus in der Gefäßwand entwickelten Kraft geteilt durch die doppelte Gefäßsegmentlänge), die entsprechende Einheit ist mN/mm (Mulvany und Halpern 1977). Am Ende des Experiments wurden die Gefäßringe dem Gefäßmyographen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Ringe wurden zur Bestimmung der MLC_{20} -Phosphorylierung durch eindimensionale Harnstoff-Gel-elektrophorese verwendet (s. 3.4.5.).

3.3. Kontraktionskraftmessung an gehäuteten Gefäßmuskelfasern der Maus

Chemische Häutung

Gefäßstreifen der Aorta der Maus (ca. 500-700 μ m breit und ca. 3-4 mm lang) wurden wie unter 3.1.1. beschrieben präpariert, wodurch Streifen zirkulärer glatter Muskulatur erhalten wurden. Die chemische Häutung der Gefäßstreifen erfolgte in Anlehnung an die bei Siegman et al. (1997) beschriebene Methode. Die Gefäßstreifen wurden in Häutungsgrundlösung (s. 7.1.) überführt und für 30 min bei 4°C auf einem Rotationsmischer vorinkubiert. Anschließend wurden die Gewebeproben in Häutungslösung (Häutungsgrundlösung + 1 μ M Leupeptin + 1% Triton X-100, s. 7.1.) für vier Stunden bei 4°C auf einem Rotationsmischer chemisch gehäutet. Die gehäuteten Gefäßfasern der Aorta wurden mit Lagerungslösung für eine Stunde bei 4°C auf dem Rotationsmischer gewaschen und anschließend erneut in frische Lagerungslösung überführt. Bis zur Verwendung in Kontraktionskraftexperimenten wurden die Fasern in Lagerungslösung bei -20°C gelagert. Die Fasern wurden frühestens vier Tage nach der Häutung eingesetzt, da das kontraktile Verhalten in diesem Zeitraum starken Schwankungen unterlag und erst danach stabil wurde.

Kontraktionskraftmessung

Die Gefäßfasern (s. o.) wurden horizontal zwischen zwei Klammern aus rostfreiem Stahl befestigt. Eine der beiden Klammern war mit einem Kraftaufnehmer (MSK 1) verbunden. Es wurde besonders darauf geachtet, daß die Fasern plan und nicht in sich verdreht eingespannt wurden. Die Kontraktionslösung (K-Lösung, s. 7.1.)

entsprach der Relaxationslösung (R-Lösung, s. 7.1.) mit dem Unterschied, daß die K-Lösung zusätzlich 5 mM CaCl_2 enthielt. Durch Mischen von K- und R-Lösung konnten verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen im Organbad erzeugt werden. Die Konzentration an freiem Calcium ($[\text{Ca}^{2+}]$) wurde mit Hilfe eines Computerprogramms nach der Methode von Bers (1982) berechnet und als $-\lg [\text{Ca}^{2+}]$ dargestellt (pCa). Die Temperatur im Organbad wurde bei 25°C konstant gehalten.

Die Fasern wurden zunächst in R-Lösung (pCa > 8.0) justiert; durch Streckung der Faser über eine Mikrometerschraube wurde innerhalb eines Zeitraums von zehn Minuten eine stabile Ruhespannung von 80 μN voreingestellt. Anschließend wurden die Fasern bei einer maximalen Calciumkonzentration von pCa 4.4 für 30 min kontrahiert. Die Fasern wurden mit R-Lösung wieder auf die Ruhespannung zurückgeführt und erneut, diesmal mit einer Calciumkonzentration von pCa 6.2, für 30 min zur Kontraktion gebracht. Die Fasern wurden relaxiert und nach Erreichen der Ruhespannung erfolgte die Zugabe der zu testenden Agenzien in R-Lösung. Es bestand ein direkter Zusammenhang zwischen maximaler Kraftentwicklung und der Breite der jeweils verwendeten Muskelfaser. Um Muskelfasern unterschiedlicher Breite miteinander vergleichen zu können, wurde die Kontraktionskraft in der Auswertung der Experimente als Prozent der durch pCa 4.4 maximal ausgelösten Kraftentwicklung dargestellt.

Versuche mit Phosphatasehemmstoffen

Für diese Versuche wurden die PP-Hemmstoffe Cantharidin und Microcystin LR zunächst in DMSO gelöst und mit R-Lösung weiter verdünnt. Die Endkonzentration an DMSO im Organbad betrug in allen Fällen 1% (V/V). Am Ende des Experiments wurden die Fasern entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Muskelfasern wurden zur Bestimmung der MLC_{20} -Phosphorylierung durch ein-dimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese verwendet (s. 3.4.5.).

Versuche mit Mangan (Mn^{2+})

In dieser Versuchsserie wurden steigende Mengen Manganchlorid direkt in R-Lösung gelöst (Endkonzentration 1-10 mM) und in Kontraktionskraftexperimenten verwendet.

3.4. Proteinchemische Arbeitstechniken

3.4.1. Herstellung der Homogenate

Aorta der Maus: Aufarbeitung für die Detektion von MLC₂₀

Die Herstellung von Homogenaten aus Gefäßringen und Gefäßmuskelfasern der Aorta der Maus (s. 3.2. und 3.3.) für die Detektion von MLC₂₀ und die Bestimmung des MLC₂₀-Phosphorylierungsgrades nach eindimensionaler Harnstoff-Gelelektrophorese (s. 3.4.5.) erfolgte nach der sogenannten TCA-Methode.

Alle bei der Homogenisierung verwendeten Geräte wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die bei -80°C gelagerten Proben wurden in einen Porzellanmörser überführt, durch Zugabe von flüssigem Stickstoff nachgefroren und anschließend mit einem Pistill zermahlen. Unter kontinuierlicher Stickstoffkühlung wurde ein Milliliter 10%ige Trichloressigsäure (TCA) auf das Mahlgut aufgefroren. Das entstandene Gewebe/TCA-Gemisch wurde mit dem Pistill zu einem Pulver zerrieben, in 2ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis langsam aufgetaut. Nach intensivem Mischen wurden 500 µl Äther/Ethanol-Gemisch (80%/20% (V/V)) hinzugegeben, wiederum gemischt, fünf Minuten bei 15 800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung von TCA-Resten aus dem Sediment wurde dieser Vorgang noch fünfmal mit jeweils einem Milliliter Äther/Ethanol-Gemisch (80%/20% (V/V)) wiederholt und der Erfolg durch Prüfung auf pH-Neutralität im Überstand kontrolliert. Das Sediment wurde getrocknet, mit 100 µl Harnstoff-Probenpuffer (s. 7.1.) versetzt und für 60 min bei 25°C auf dem Thermomixer resuspendiert. Die Proben wurden für 15 min bei 15 800 x g zentrifugiert und der Überstand als Homogenat bezeichnet.

Aorta der Maus: Aufarbeitung für die Detektion von PP1 α und PP2A

Gefrorenes Gewebe der Aorta der Maus wurde in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Teflon-Gefäße überführt. Nach dem Auffrieren von Homogenisationspuffer A (s. 7.1.) wurde das Gewebe/Puffer-Gemisch in einer Labor-Schwingmühle (Mikro-Dismembrator) für eine Minute bei einer Schüttelfrequenz von 1600 rpm zerkleinert. Das Pulver wurde in 2ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden dreimal für zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab (VirSonic®) bei 3-5 W Leistung unter Kühlung homogenisiert. Die Proben wurden für 20 min bei RT belassen, für 15 min (15 800 x g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand als Homogenat bezeichnet.

Insektenzellen

Insektenzellen wurden im Nährmedium suspendiert und zentrifugiert (820 x g, 10 min, RT). Das Zellsediment wurde mit steriler, kalter PBS pH 7.45 (s. 7.1.) gewaschen und erneut zentrifugiert (90 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde in Homogenisationspuffer B (s. 7.1.) mit Hilfe einer Insulinspritze (10 x Kanüle 21Gx1½, 0.8x40 mm, Nr. 2; 10 x Kanüle 27Gx¾, 0.4x19 mm, Nr. 20) durch Scherkräfte zerkleinert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Proben für zehn Minuten bei 8 000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine. Der Zellrückstand wurde erneut in Homogenisationspuffer B resuspendiert, gewaschen, auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde als Sediment bezeichnet.

Adenoviral infizierte Zellen (H9c2-Zellen, Neonatale Rattenkardiomyozyten)

Adenoviral infizierte Zellen wurden im Nährmedium mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und zentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Das Zellsediment wurde in steriler, kalter PBS pH 7.45 (s. 7.1.) gewaschen und in Homogenisationspuffer C (s. 7.1.) aufgenommen. Um anhaftende Adenoviren zu inaktivieren, wurden die Proben für zehn Minuten auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden dreimal für zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab (VirSonic®) bei 3-5 W Leistung unter Kühlung homogenisiert und anschließend für zehn Minuten bei 15 800 x g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde als Homogenat bezeichnet.

3.4.2. Proteinbestimmungen

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Proben, die kein SDS enthielten, wurde mit dem Biorad Protein Assay Reagenz (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt (Bradford 1976). 1% (V/V) Triton X-100 störte in diesem Test nicht, so daß auch die Proteinproben von Insektenzellen mit diesem Verfahren bestimmt werden konnten. Als Proteinstandard wurde Albumin aus Rinderserum verwendet.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in SDS-haltigen Proben nach Lowry et al. (1951). Als Proteinstandard wurde Albumin aus Rinderserum verwendet.

3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970) in Gegenwart von SDS. Jede Proteinprobe wurde mit Probenpuffer (s. 7.1.) auf eine SDS-Konzentration von 5% (m/V) eingestellt und für 15 min bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt (Lindemann und Watanabe 1985). Benutzt wurde ein 4% (m/V) Polyacrylamid enthaltendes Sammelgel (nach Laemmli 1970) und ein 10% (m/V) Polyacrylamid enthaltendes Trenngel (nach Porzio und Pearson 1977). Die genaue Zusammensetzung der Gele ist im Anhang (s. 7.1.) beschrieben.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer vertikalen Hoefer SE600 Elektrophoresekammer in vorgekühltem Elektrodenpuffer (s. 7.1.) bei 4°C stromkonstant mit 40 mA pro Gel, bis die Farbfront des Probenpuffers den Übergang Sammelgel/Trenngel überschritt, und mit 60 mA pro Gel, bis die Farbfront den unteren Gelrand erreichte. Auf jedem Gel wurde ein Proteingrößenstandard (Amersham Biosciences; zur Zusammensetzung s. 7.1.) mitgeführt.

3.4.4. Coomassie-Färbung

Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele 60 min mit Färbelösung (s. 7.1.) gefärbt. Die Gele wurden mit Entfärbelösung (s. 7.1.) durch mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung entfärbt, bis der Hintergrund nur noch schwach blau war. Die entfärbten Gele wurden in zweifach destilliertem Wasser gewaschen und zwei Stunden in einem Vakuum-Geltrockner zwischen Cellophan[®]-Papier getrocknet.

3.4.5. Eindimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese

Dieses Verfahren der Gelelektrophorese diente der Differenzierung zwischen unterschiedlichen MLC₂₀-Phosphorylierungszuständen. In Abwesenheit von SDS erfolgt die Trennung nicht nur nach der Masse, sondern zusätzlich nach der Summe der Ladungen des Proteins. Alle bei dieser Methode verwendeten Chemikalien wurden von Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Zur Gelelektrophorese wurden 10%ige Harnstoff-Glycerol-Gele (s. 7.1.) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Minigel Twin Gelelektrophoresekammer (Biometra) mit unterschiedlichen Elektrodenpuffern für die obere und untere Elektrode (s. 7.1.) bei RT spannungskonstant mit 400 V. Zunächst wurde ein Vorlauf mit reinem Harnstoff-Probenpuffer (s. 7.1.) für eine Stunde durchgeführt. Die nach

3.4.1. gewonnen Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Die sich anschließende Gelelektrophorese erfolgte bis die Farbfront des Probenpuffers den unteren Gelrand erreichte, zuzüglich 30 min Nachlaufzeit. In diesem Gelsystem wurde kein Proteingrößenstandard mitgeführt.

3.4.6. Western Blot-Verfahren

Die gelelektrophoretisch getrennten Proteine wurden im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (0.45 µm Porengröße) übertragen (Gershoni 1988, Towbin et al. 1979). Der Transfer wurde in einer Blotkammer (Hoefer) stromkonstant mit 1.5 A für drei Stunden bei 4°C in Transferpuffer (s. 7.1.) durchgeführt. Durch eine Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung (s. 7.1.) wurde der Erfolg des Transfers kontrolliert und gleichzeitig wurden die Proteine auf der Membran fixiert. Die Membran wurde getrocknet und die Positionen des Proteingrößenstandards am Rand der Membran markiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran trocken bei 4°C gelagert. Gele der eindimensionalen Harnstoff-Gelelektrophorese (s. 3.4.5.) wurden im Gegensatz zum oben beschriebenen Standardprotokoll nur für 25 min stromkonstant mit 1.5 A transferiert.

3.4.7. Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die nach 3.4.6. hergestellten Membranen wurden, entsprechend dem zu erwartenden Molekulargewicht der Proteine (PP1 α 37 kDa; His₆-PP1 α ca. 45 kDa; PP2A 37 kDa; I₂ 31 kDa; GFP 28 kDa; MLC₂₀ 20 kDa), in horizontale Streifen geschnitten und in Puffer C (s. 7.1.) vollständig entfärbt.

Identifizierung von PP1 α , PP2A, I₂, His₄ und GFP

Die Membranstreifen wurden zur Blockade unspezifischer Antikörperbindung mit einer Lösung von 5% Milchpulver in Puffer C (s. 7.1.) für zwölf Stunden auf dem Flachbettschüttler bei 4°C vorbehandelt. Anschließend wurden die Streifen mit dem 1. Antikörper (verdünnt in 5% Milchpulver/Puffer C) bei 4°C für acht Stunden inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde in drei Waschsritten von jeweils fünf Minuten mit Puffer C entfernt. Die Membranstreifen wurden für zwölf Stunden bei 4°C mit dem Alkalische Phosphatase-konjugierten 2. Antikörper (verdünnt mit 5% Milchpulver/Puffer C) inkubiert, anschließend mit TBS pH 9.4 dreimal zehn Minuten gewaschen und eine Minute mit Alkalische Phosphatase (AP) Puffer (s. 7.1.) gespült.

Die Antikörper wurden in der in Tab. 7.1. angegebenen Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels nicht-radioaktiver Immunfärbung (s. u.).

Identifizierung von MLC₂₀

Die Membranstreifen wurden für eine Stunde mit einer 2%igen BSA-Lösung in Puffer A (s. 7.1.) bei 4°C vorbehandelt. Anschließend wurden die Streifen für jeweils zehn Minuten mit Puffer C und TBS pH 7.4 (s. 7.1.) gewaschen und mit in TTBS pH 7.4 (s. 7.1.) verdünntem 1. Antikörper bei 4°C für zwölf Stunden inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch Waschen mit TTBS pH 7.4 (3 x 5 min) entfernt. Die Membranstreifen wurden für zwei Stunden bei 4°C mit dem AP-konjugierten 2. Antikörper (verdünnt in TTBS pH 7.4) inkubiert, anschließend mit TBS pH 9.4 für dreimal zehn Minuten gewaschen und eine Minute mit AP-Puffer (s. 7.1.) gespült. Die Antikörper wurden in der in Tab. 7.1. angegebenen Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels nicht-radioaktiver Immunfärbung (s. u.).

Immunfärbung

Die Immunfärbung wurde zunächst mit dem Fluoreszenzsubstrat ECF (*enhanced chemifluorescence*, Amersham Biosciences) durchgeführt. Das ECF-Substrat wurde im Verhältnis 1:10 mit AP-Puffer (s. 7.1.) verdünnt und die Streifen zwei Minuten darin inkubiert. Die alkalische Phosphatase des zweiten Antikörpers katalysiert die Dephosphorylierung des ECF-Substrats in ein Produkt, das bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert (maximale Anregung bei 430 nm). Die Fluoreszenz wurde mit einem PhosphorImager (STORM 860) detektiert und mit Hilfe der ImageQuant[®]-Software quantifiziert. Nach der Detektion mit ECF wurden die Membranstreifen mit bidestilliertem Wasser entfärbt und für zehn Minuten in AP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranstreifen durch eine Farbreaktion mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-Toluidin-Salz (BCIP; 0.017% (m/V)) und Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT; 0.033% (m/V)) in AP-Puffer mit 0.8% (V/V) Dimethylformamid detektiert.

3.4.8. Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch dreidimensionale Densitometrie mit ImageQuant[®]-Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA). Das unspezifische Hintergrundsignal wurde im Local-Average-Modus von jedem Signal abgezogen.

3.5. Arbeitstechniken mit RNA

3.5.1. Gesamt-RNA-Präparation

RNA-Gewinnung aus Herzgewebe

Die Gesamt-RNA wurde mit einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) mit Guanidinisothiocyanat- und Phenol-haltigem TriStar Reagent™ (AGS) isoliert. 100 mg tief gefrorenes Herzgewebe (Herzgewebe einer männlichen Wistar-Ratte bzw. rechtsventrikuläres Herzgewebe des Menschen) wurde vorab grob zerkleinert und in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Teflon-Gefäß überführt. Es wurde ein Milliliter TrisStar Reagent™ aufgefroren und das Gewebe in einer Labor-Schwingmühle (Mikro-Dismembrator) für eine Minute bei einer Schüttelfrequenz von 1600 rpm homogenisiert. Nach dem Auftauen bei RT wurden, um die Ausbeute zu erhöhen, 70 µg Glykogen/ml TrisStar Reagent™ hinzugegeben und nach weiteren fünf Minuten bei RT 200 µl Chloroform zugefügt. Die Probe wurde geschüttelt, zehn Minuten bei RT belassen und anschließend zentrifugiert (15 800 x g, 5 min, RT). Es erfolgte eine Trennung in drei Phasen: Obere wäßrige Phase (RNA), weiße, dünne Interphase (DNA), rote, phenolische, untere Phase (Protein). Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen, zur Ausfällung der RNA mit einem Volumen (ca. 600 µl) Isopropanol versetzt und nach zehn Minuten Inkubation zentrifugiert (15 800 x g, 15 min, 4°C). Das RNA-Sediment wurde zweimal mit einem Milliliter 75%igem Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac® Plus AR) bei RT getrocknet und in 25 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -80°C.

RNA-Gewinnung aus kultivierten Zellen

Die Gesamt-RNA adenoviral infizierter H9c2-Zellen (s. 3.1.2. und 3.10.5.) wurde mit TRIzol Reagent™ (GibcoBRL/Life Technologies), modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (1987), isoliert. Die infizierten Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurden im Nährmedium mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und zentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Die Zellen wurden nicht mit PBS pH 7.45 gewaschen (vgl. 3.4.1.), um eine Degradierung der RNA zu vermeiden. Das Zellsediment wurde in einem Milliliter TRIzol Reagent™ lysiert. Um Polysaccharide und hochmolekulare DNA abzutrennen, wurde das Lysat zentrifugiert (12 000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde fünf Minuten bei RT inkubiert, damit Nucleoproteinkomplexe dissoziieren konnten. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl Chloroform kurz (ca. 15 sec) per Hand ausgeschüttelt und drei Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben zentrifugiert (12 000 x g, 15 min, 4°C). Die obere wäßrige Phase wurde

abgenommen, zur Ausfällung der RNA mit $\frac{1}{2}$ Volumen (ca. 300 μ l) Isopropanol und $\frac{1}{2}$ Volumen (ca. 300 μ l) Präzipitationslösung (s. 7.1.) versetzt und nach zehn Minuten Inkubation bei RT zentrifugiert (12 000 x g, 10 min, 4°C). Muskelzellen enthalten große Mengen an Polysacchariden und Proteoglykanen, welche die isolierte RNA verunreinigen. Eine Fällung unter Zugabe von Präzipitationslösung, d. h. hochmolarer Salzlösung, hält diese in Lösung; die präzipitierte RNA ist daher von höherem Reinheitsgrad. War das Sediment nach der Fällung weiterhin von weißem Erscheinungsbild anstelle des typischen glasigen Aussehens von reinen RNA-Sedimenten, so wurde die RNA in DEPC-Wasser gelöst und erneut gefällt. Das RNA-Sediment wurde mit einem Milliliter 75%igem Ethanol (mit DEPC-Wasser hergestellt) gewaschen und nach Trocknung bei RT in 50 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -80°C.

Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von Eins einer Konzentration von 40 μ g/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die OD bei 230 nm (Absorption durch Guanidinisothiocyanat), 280 nm (Absorption durch Proteine) und 320 nm (unlösliche Trübstoffe) bestimmt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} liegt für reine RNA bei 2.0 (Sambrook et al. 1989) und sollte nicht unter 1.7 liegen. Die OD_{260}/OD_{230} ist, wenn keine Verunreinigung mit Guanidinisothiocyanat vorliegt, größer 2.0. Die OD_{320} beträgt für eine klare Lösung 0.0.

3.5.2. RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte nach Sambrook et al. (1989) in einem denaturierenden 1%igen Agarosegel (s. 7.1.). Es wurden je Probe 24 μ g RNA eingesetzt und mit zwei Volumen Denaturierungspuffer (s. 7.1.) gemischt. Die Denaturierung erfolgte bei 70°C für fünf Minuten. Danach wurden die Proben, um eine Renaturierung zu verhindern, sofort auf Eis gekühlt und $\frac{1}{10}$ Volumen Ladepuffer (s. 7.1.) zugegeben. Nach einem Vorlauf von zehn Minuten erfolgte die elektrophoretische Trennung der RNA bei einer Spannung von 80 V in 1 x MOPS-Puffer (s. 7.1.) bis die Farbfront des Ladepuffers den unteren Gelrand erreicht hatte. Durch Betrachtung der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele unter UV-Licht wurde die Qualität der RNA-Präparation überprüft. Das Verhältnis der 28S-rRNA zur 18S-rRNA sollte 2:1 betragen. Durch Degradierung käme es zur Umkehr des Verhältnisses, da 28S-rRNA charakteristisch zu 18S-ähnlichen Fragmenten abgebaut wird.

3.5.3. Northern Blot-Verfahren

Das RNA-Gel (s. 3.5.2.) wurde 15 min in 10 x SSC äquiliibriert und anschließend durch abwärts gerichteten Kapillartransfer (Sambrook et al. 1998) in Hochsalzpuffer (10 x SSC; s. 7.1.) in einem Zeitraum von zwölf Stunden auf eine Nylonmembran (GenScreen, NEN-DuPont) übertragen. Die Membran wurde für fünf Minuten in 2 x SSC (aus 10 x SSC durch Verdünnung hergestellt) gewaschen und anschließend die RNA durch Bestrahlung mit 120 mJ/cm² UV-Licht (254 nm, GS Gene Linker, Biorad) auf der noch feuchten Membran fixiert (*cross-linking*). Die Membran wurde fünf Minuten bei 80°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken bei 4°C gelagert.

3.5.4. Herstellung und Markierung radioaktiver DNA-Sonden

PP1 α -Matrizen-DNA

Als Matrizen-DNA für die Markierung einer PP1 α -DNA-Sonde diente die codierende Sequenz (Kitamura et al. 1991; -10 bis +997) der PP1 α der Ratte (vgl. 3.6.5.).

His₆-Matrizen-DNA

Zur Detektion der His₆ Sequenz wurde ein DNA-Fragment als Matrizen-DNA verwendet, welches auch zur Generierung des AdTrack-CMV-His₆-PP1 α Transfervektors verwendet wurde (s. 3.10.1.). Dieses Fragment wurde durch PCR aus einem pAHLT-B-Vektor amplifiziert (Tab. 7.6.), durch das Enzym *Kpn* I geschnitten, gelelektrophoretisch getrennt und isoliert (s. 3.6.4.). Fragmentlänge 148 bp.

Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden nach der *random primed labeling*-Methode mit High-Prime-Lösung (Roche, Mannheim) hergestellt (Feinberg und Vogelstein 1983, 1984). 100 ng (mindestens 10 ng) Matrizen-DNA wurden mit bidest. Wasser auf ein Volumen von elf Mikrolitern gebracht, bei 95°C für zehn Minuten denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung zu unterbinden. Die abgekühlte Lösung wurde mit vier Mikrolitern High-Prime-Lösung und fünf Mikrolitern α -[³²P]-Desoxycytidintriphosphat (dCTP, 10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol, NEN-Du Pont) versetzt. Die High-Prime-Lösung enthielt 1 U/ μ l Klenow-Fragment, die drei fehlenden Desoxyribonucleotidtriphosphate und Oligonucleotidprimer zufälliger Sequenz. Der zur denaturierten DNA komplementäre Strang wurde unter Einbau des [³²P]-dCTP in einer Polymerasereaktion in 15 min bei 37°C gebildet. Nicht eingebaute Nucleotide wurden mittels des QIAquick-Nucleotide-Removal-Kits (Qiagen, Hilden) nach

Anweisung des Herstellers entfernt. Die radioaktive Sonden-DNA wurde mit 250 μ l EB-Puffer (Qiagen) von der Säule eluiert. Die eluierte Probe wurde 15 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Sonde wurde zur prähybridisierten Membran gegeben (s. 3.5.5.).

3.5.5. Hybridisierung und Detektion

Die Nylonmembran (s. 3.5.3.) wurde zusammen mit Prähybridisierungslösung (s. 7.1.) in einem Hybridisierungsofen auf 42°C vortemperiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde frisch denaturierte (5 min 95°C, danach sofort auf Eis) tRNA aus Bäckerhefe (Roche) direkt zur erwärmten Prähybridisierungslösung gegeben und der gesamte Ansatz für vier Stunden bei 42°C prähybridisiert. Die radioaktiv markierte, denaturierte Sonde wurde zur Prähybridisierungslösung gegeben (s. 3.5.4.) und die Hybridisierung bei 42°C für zwölf Stunden durchgeführt. Die hybridisierte Membran wurde einmal mit 2 x SSC + 0.1% (m/V) SDS bei RT, ein weiteres Mal mit 2 x SSC + 0.1% (m/V) SDS bei 60°C gewaschen (s. 7.1.), sowie mit 0.2 x SSC + 0.1% (m/V) SDS bei 60°C und abschließend mit 0.2 x SSC ohne SDS bei RT für je 15 min gewaschen. Die Membranen wurden feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer PhosphorImager[®]-Kassette für ca. 24 h exponiert. Für weitere Hybridisierungen wurde die radioaktiv markierte Sonde durch eine 30minütige Inkubation der Membran mit kochender 0.1%iger SDS-Lösung entfernt. Die vollständige Entfernung wurde durch erneute Exposition der Membran im PhosphorImager[®] überprüft. Die Membran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet bei 4°C gelagert.

3.6. Arbeitstechniken mit DNA

3.6.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Transformation von DNA in *E. coli* müssen die Bakterienzellen vorab kompetent, d. h. für DNA aufnahmefähig gemacht werden. Die klassische Methode zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen ist die Calciumchlorid-Methode, jedoch stellt auch die TSS-Methode (Chung et al. 1989) eine gute Alternative dar. Es handelt sich um eine Ein-Arbeitsschritt-Methode, die es ermöglicht, mit wenig Arbeitsaufwand kompetente Zellen direkt zu verwenden, was die Kompetenz gegenüber gefrorenen Aliquots um den Faktor Zehn steigert. Plasmide größer als zehn Kilobasenpaare wurden durch Elektroporation (Dower et al. 1988) in elektrokompetente Zellen transformiert.

Calciumchlorid-Methode

Es wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue MRF', JM109 oder Top10F (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Eine *E. coli*-Glycerinkultur wurde aus -80°C aufgetaut, auf einer LB-Agar-Platte ohne Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert (Vereinzelungsausstrich). Fünf Milliliter LB-Medium wurden mit einem Einzelklon der Platte angeimpft und im Schüttelinkubator über Nacht belassen (37°C, 220 rpm). In einem sterilen Erlenmeyer-Kolben wurden 80 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz mit 800 µl der Vorkultur angeimpft und bei 37°C, 220 rpm inkubiert. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₅₉₅ verfolgt. Nach Erreichen einer OD₅₉₅ von 0.45-0.6 wurde die Kultur 30 min auf Eis gestellt und anschließend für zehn Minuten (2 000 x g, 4°C) zentrifugiert. Das Medium wurde vollständig entfernt und das Bakteriensediment in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert (s. 7.1.). Nach einer Inkubation von 60 min auf Eis wurden die Zellen für zehn Minuten (2 000 x g, 4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in acht Millilitern CaCl₂-Lösung (100mM) + 15% (V/V) sterilem Glycerol resuspendiert und in Aliquots von 300 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zum Test auf Kontamination wurde ein Aliquot auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen. Es durfte kein Wachstum auftreten.

TSS-Methode

Es wurden in Anlehnung an die TSS-Methode von Chung et al. (1989) *E. coli* XL1-Blue MRF' (analog der Calciumchlorid-Methode) angezogen. Sobald die Kultur eine OD₅₉₅ von 0.3-0.6 aufwies, wurde das Wachstum durch Kühlung auf Eis gestoppt (10 min). Die Zellen wurden zentrifugiert (3 000 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellsediment in $\frac{1}{10}$ Volumen eiskaltem TSS-Puffer (s. 7.1.)

resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde für zehn Minuten auf Eis inkubiert, zu je 100 µl aliquotiert und in Stickstoff eingefroren bzw. direkt verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Elektrokompetente Zellen

Elektrokompetente Zellen wurden nach der Methode von Dower et al. (1988) hergestellt. Es wurden die *E. coli*-Stämme BJ5183 und DH10B verwendet. Fünf Milliliter LB-Medium ohne Antibiotikazusatz wurden mit 40 µl *E. coli*-Glycerinkultur angeimpft und im Schüttelinkubator über Nacht angezogen (37°C, 180 rpm). Mit der Vorkultur wurde ein Liter LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis die OD₅₇₈ 0.6-0.8 betrug. Die Kultur wurde für eine Stunde auf Eis gestellt und anschließend bei 1 400 x g für zehn Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in 100 ml kaltem Waschpuffer (s. 7.1.) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. 19 ml Waschpuffer wurden abgenommen und die Zellen in dem verbliebenen Waschpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren bzw. direkt verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.6.2. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Calciumchlorid-Methode

Bis zu 50 ng Plasmid-DNA bzw. ein Ligationsansatz wurden mit 100 µl kompetenter Zellen (s. 3.6.1.; auf Eis aufgetaut) versetzt und 30 min auf Eis belassen. Die Zellen wurden einem Hitzeschock von 42°C für zwei Minuten ausgesetzt, sofort auf Eis abgekühlt (2 min) und mit 900 µl gekühltem LB-Medium versetzt (Sambrook et al. 1989). Die Zellsuspension wurde auf einem Heizblock (1000 rpm, 37°C) für eine Stunde inkubiert und anschließend die transformierten Zellen auf vortemperierte Agarplatten, die das Antibiotikum der Plasmidresistenz enthielten (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin), ausplattiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C im Brutschrank.

TSS-Methode

Die nach 3.6.1. gewonnenen Zellen wurden direkt verwendet oder langsam auf Eis aufgetaut. 0.1-10 ng DNA oder ein Ligationsansatz wurden mit sterilem bidest. Wasser auf ein Volumen von 80 µl gebracht und mit 100 µl kompetenter Zellen und 20 µl 5 x KCM-Puffer gemischt. Das Gemisch wurde 20 min auf Eis und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium erfolgte eine Inkubation bei 37°C

für 40 min. Die Zellen wurden zentrifugiert (720 x g, 10 min, RT), 500 µl des Überstandes entfernt und die Zellen resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden auf vortemperierte Agarplatten, die das Antibiotikum der Plasmidresistenz enthielten, ausplattiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C. (Chung et al. 1989)

Elektrokompetente Zellen

Bis zu 1.0 µg salzfreie DNA wurden mit 40 µl der nach 3.6.1. erhaltenen elektrokompetenten *E. coli* gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (Gene Pulser®-Küvette, Biorad). Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationskammer (Gene Pulser®, Biorad) bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF. Zu dem elektroporierten Ansatz wurden sofort 500 µl SOC-Medium (s. 7.1.) gegeben. Es war entscheidend die elektroporierten und damit geschädigten Zellen schnell mit Medium zu versorgen, da die Überlebensrate in den ersten Minuten nach der Elektroporation ohne Substratzusatz stark abnimmt. Aus diesem Grund wurde auch das reichere SOC-Medium verwendet. Die Zellen wurden aus den Küvetten in 1.5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C für 60 min geschüttelt (Thermomixer). Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die das Antibiotikum des Resistenzgens enthielten. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert. (Dower et al. 1988)

3.6.3. Plasmid-DNA-Präparation

Analytische Plasmidisolierung

Die analytische Plasmidisolierung (Minipräparation) erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly 1979) und diente der schnellen Durchmusterung mehrerer Bakterienkulturen auf positive Klone. Die Zellen von 2-5 ml Bakterienkultur wurden zentrifugiert (15 800 x g, 1 min, 4°C). Das Zellsediment wurde in 300 µl Puffer P1 (Resuspensionspuffer, s. 7.1.) resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 (Lysispuffer, s. 7.1.) während einer Inkubationszeit von fünf Minuten (RT) vollständig lysiert. Durch diese alkalische Lyse in Anwesenheit von SDS werden Bakterienproteine, Plasmid-DNA und chromosomale Bakterien-DNA denaturiert. RNA wird durch RNase A (in Puffer P1) gespalten. Durch Zugabe von 300 µl gekühltem Puffer P3 (Neutralisationspuffer, s. 7.1.) wurde die Lösung neutralisiert. Die hohe Salzkonzentration fällt SDS als unlösliches Kaliumdodecylsulfat in Form eines weißen, flockigen Niederschlags aus. Denaturierte Proteine und chromosomale DNA werden in Salz-Detergens-Komplexen gebunden und ebenfalls mitgefällt. Die kleinere Plasmid-DNA hingegen kann unter diesen Bedingungen schneller als die chromosomale DNA renaturieren und verbleibt in Lösung.

Der weiße Niederschlag wurde durch Zentrifugation (15 800 x g, 15 min, 4°C) abgetrennt, der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (15 800 x g, 5 min, 4°C). Aus dem Überstand wurde die DNA mit 600 µl gekühltem 100%igem Isopropanol ausgefällt und niederzentrifugiert (15 800 x g, 30 min, 4°C). Das DNA-Sediment wurde zweimal mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und im offenen Reaktionsgefäß bei 37°C vorsichtig getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in sterilem, bidest. Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Präparative Plasmidisolierung

Mit der präparativen Plasmidisolierung (Maxipräparation) wurden Plasmide aus Kulturen mit einem Volumen von 500 ml bis 2 l gewonnen. Dazu wurde der Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Bakterien wurden, wie bei der analytischen Plasmidisolierung, alkalisch lysiert und genomische DNA, denaturierte Proteine und SDS wurden ausgefällt. Das über einen Faltenfilter geklärte Bakterienlysat wurde über eine Anionenaustauschersäule (Qiagen-tip 500, äquilibriert mit Puffer QBT, s. 7.1.) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Bindung erfolgt bei niedrigem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration aufgrund der Interaktion der negativ geladenen Phosphatreste der DNA mit den positiv geladenen Diethylaminomethanol-Gruppen auf der Oberfläche des Anionenaustauscherharzes. Die Anionenaustauschersäule wurde zweimal mit Waschpuffer (Puffer QC, s. 7.1.) mittlerer Salzkonzentration gewaschen und anschließend die DNA mit einem Hochsalzpuffer (Puffer QF, s. 7.1.) im schwach alkalischen Milieu eluiert. Durch Isopropanolfällung wurde die DNA konzentriert und entsalzt. Das DNA-Sediment wurde zweimal, um Isopropanol- und Salzreste zu entfernen, mit einem Milliliter kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und im offenen Reaktionsgefäß bei 37°C vorsichtig getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in sterilem, bidest. Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Diese DNA-Qualität wurde auch zur Sequenzierung verwendet, da für diese Anwendung höhere Anforderungen an die Reinheit gestellt werden, als bei der analytischen Plasmidisolierung erreicht werden konnten.

Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1.0 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml (Sambrook et al. 1989). Der lineare Meßbereich liegt zwischen 0.1 und 1.0.

3.6.4. Klonierungstechniken

DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen

Sämtliche DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonucleasen (Typs II) wurden nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Die Hauptbezugsquelle für Restriktionsendonucleasen war MBI Fermentas (Heidelberg); bei MBI nicht lieferbare Restriktionsendonucleasen wurden über New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden

Wurden Vektoren mit nur einem Enzym linearisiert, entstanden kompatible Enden. Um eine Religation zu verhindern, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden der Vektor-DNA, welche für die Ligation benötigt werden, mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Die Möglichkeit der Ligation von Vektor und einzuklonierendem DNA-Fragment blieb jedoch weiterhin bestehen, da das Fragment noch beide Phosphatreste trug. Die Abspaltung der Phosphatgruppen erfolgte mit einer Einheit CIP (Roche, Mannheim) pro 7.5 µg DNA in 1 x CIP-Puffer für 30 min bei 37°C. Die CIP wurde für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Zur sicheren Entfernung der CIP wurde die dephosphorylierte DNA zusätzlich über ein DNA-Agarosegel gereinigt und mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit aus dem Gel isoliert (s. u.).

Glätten von 3'- bzw. 5'-DNA-Überhängen

Wurden für die Klonierung glatte DNA-Enden benötigt und bei der Restriktion mit Restriktionsendonucleasen 3'- bzw. 5'-DNA-Überhänge erzeugt, so wurden die Überhänge durch den Einsatz von Klenow-Fragment (das große Fragment der DNA Polymerase I von *E. coli*) „geglättet“. Bei 5'-Überhängen wirkt das Klenow-Fragment als Polymerase und lagert den fehlenden komplementären DNA-Strang an. Bei 3'-Überhängen wirkt das Klenow-Fragment als 3'-5'-Exonuclease. Der Reaktionsansatz enthielt neben der DNA noch zwei Einheiten Klenow-Fragment (Roche, Mannheim) und 20 mM dNTP-Mix in 1 x Puffer für Taq-Polymerase. Der Ansatz wurde 20 min bei 30°C inkubiert und anschließend die Polymerase bei 75°C (10 min) inaktiviert.

Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten des Größenbereichs 0.1 bis 20 kb wurde die native Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Agarosekonzentration, die üblicherweise zwischen 0.5 und 2.0% (m/V) liegt, bestimmt dabei den Trennbereich. Für Fragmente kleiner zwei Kilobasenpaare wurden 2.0%ige, für Fragmente der Größe

bis sieben Kilobasenpaare wurden 1.0%ige und für Fragmente größer sieben Kilobasenpaare 0.7%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer (s. 7.1.) durch Erhitzen gelöst. Um die DNA später im UV-Licht sichtbar machen zu können, wurden 0.1 µg/ml des in die DNA interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden in einem 1 x Probenpuffer (s. 7.1.) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von ca. 5 V/cm Elektrodenabstand.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Gelextraktion der DNA wurde der QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt (s. o.) und das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Hierbei war ein schnelles Vorgehen angebracht, da DNA sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert und zu Depurinierungen, zur Bildung von Basendimeren und zu Strangbrüchen neigt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Methode basiert auf der Eigenschaft von DNA, in Anwesenheit von hohen Konzentrationen chaotroper Salze und bei niedrigem pH-Wert spezifisch an Silica-Gel-Membranen zu binden (Vogelstein und Gillespie 1979). Gleichzeitig lösen die chaotropen Salze die Agarose auf. Die gebundene DNA wurde mit Salz-Ethanol-Puffern mehrfach gewaschen und je nach Anwendung mit sterilem, bidest. Wasser oder Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, im Lieferumfang des Kits), d. h. bei niedriger Salzkonzentration und neutralem pH-Wert eluiert. Der DNA-Gehalt des Eluats wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (s. 3.6.3). Diese Methode wurde auch zur Trennung von DNA und Proteinen nach enzymatischen Reaktionen verwendet, indem der Reaktionsansatz direkt auf die Silica-Gel-Membran aufgebracht wurde (s. QIAquick Spin Handbook).

Ligation

Die Ligation erfolgte mit zehn Weiss-Einheiten T4-DNA-Ligase (Roche oder MBI Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor und einzubauendem DNA-Fragment betrug in der Regel 1:5. Häufig wurden mehrere Ansätze mit verschiedenen Mengenverhältnissen parallel getestet. Weitere Bestandteile des Ligationsansatzes waren zwei Mikroliter 10 x Ligationspuffer (Roche oder MBI Fermentas) und ein Mikroliter ATP 20 mM. ATP war zwar bereits im Ligationspuffer vorhanden (1 mM), jedoch wurde zusätzliches ATP zugegeben (in der Literatur wird 1-5 mM empfohlen). Bei der Ligation von glatten DNA-Enden wurde zusätzlich PEG 4000 15% (m/V) zugesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte bei GATC (Konstanz). Geeignete Sequenzierungsprimer wurden mit Hilfe des Programms OMIGA (Oxford Molecular, Oxford, England) ermittelt. Die Sequenzen der Primer sind unter 7.4. aufgelistet.

3.6.5. RT-PCR-Technik

cDNA-Synthese mittels reverser Transkription (RT)

Gesamt-RNA (s. 3.5.1.) aus ganzen Herzen adulter Ratten (für PP1 α) bzw. Gesamt-RNA aus dem rechten Ventrikel menschlicher Herzen (für I₂) wurde in einer reversen Transkription mit Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. 1.0 μ g Gesamt-RNA wurde zwei Minuten bei 70°C denaturiert und danach sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung zu verhindern. Der Reaktionsansatz bestand aus denaturierter Gesamt-RNA, 10 U humanem plazentalem RNase-Inhibitor, 1.0 mM dNTP (0.25 mM/Nucleotid), 2.8 μ M Primer p(dT)₁₅, 5.0 mM DTT und 30.0 U MMLV-Reverse-Transkriptase in 10 μ l 1 x RT-Puffer (Roche, Mannheim). Die Reaktion wurde bei 41°C für 60 min durchgeführt. Durch Erhitzen auf 94°C (5 min) wurde die Reaktion beendet. Der Ansatz wurde mit 90 μ l sterilem, bidest. Wasser verdünnt.

Amplifikation der PP1 α mittels PCR

Die codierende Sequenz der PP1 α (Kitamura et al. 1991) wurde durch PCR aus cDNA der Ratte (Herzgewebe) amplifiziert. Zur Amplifikation wurde Pwo-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet, da diese neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität besitzt, die sog. Korrekturaktivität (*proofreading*). Hierdurch steigt die Synthesegenauigkeit um den Faktor Zehn an (Cline et al. 1996).

Der Reaktionsansatz enthielt 0.1 ng cDNA der Ratte, 0.8 mM dNTP-Mix (0.2 mM/Nucleotid), 0.9 μ M *forward*-Primer, 0.9 μ M *reverse*-Primer, 2.0 mM MgSO₄ und 10.0 U Pwo-DNA-Polymerase in 50 μ l 1 x PCR-Puffer. In die verwendeten Primersequenzen waren zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen integriert. So wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *Bam*H I- und am 3'-Ende eine *Xba* I-Schnittstelle realisiert. Die PCR wurde in einem PCR-Gerät (Gene Amp[®] PCR System 9700, Perkin Elmer) durchgeführt. Die Primersequenzen und das PCR-Programm sind in Tab. 7.1. aufgeführt. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1015 bp.

Amplifikation des I₂ mittels PCR

Die codierende Sequenz des I₂ (zuzüglich 209 bp 3'-UTR, Helps et al. 1994) wurde durch PCR aus cDNA des Menschen (Herz, rechter Ventrikel) amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tab. 7.2. aufgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus 0.1 ng cDNA des Menschen, 0.8 mM dNTP-Mix (0.2 mM/Nucleotid), 0.9 µM *forward*-Primer, 0.9 µM *reverse*-Primer, 2.0 mM MgCl₂ und 10.0 U Taq-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) in 50 µl 1 x PCR-Puffer. Die verwendeten Primer enthielten zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen. So wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *Bgl* II- und am 3'-Ende eine *Xho* I-Schnittstelle integriert. Die PCR wurde mit dem in Tab. 7.2. beschriebenen Programm durchgeführt. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 844 bp.

3.6.6. Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus

Mit einem sterilen Skalpell wurde eine Schwanzbiopsie der Maus genommen. Die Probe wurde mit 700 µl TE/SDS-Puffer (s. 7.1) und 40 µl Proteinase K-Lösung versetzt und für ca. zwölf Stunden bei 55°C schüttelnd (1300 rpm) lysiert. Um die genomische DNA von Lipiden und Proteinen zu reinigen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Die Lösung wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol und einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, V/V/V) ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert (15 800 x g, 3 min, RT) und die obere, wäßrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Verunreinigungen wurden durch dieses Verfahren denaturiert und sammelten sich in der organischen Phase oder in der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an, während die Nucleinsäuren in der wäßrigen Phase verblieben. Um Phenolreste zu beseitigen, wurde die genomische DNA durch Zusatz von 70 µl Natriumacetat (3.0 M, pH 6.0) und 800 µl abs. Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 800 x g, 20 min, RT). Das Sediment wurde, um Salzreste zu entfernen, einmal mit Ethanol 70% (V/V) gewaschen und bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß langsam getrocknet. Die DNA wurde in 80 µl sterilem, bidest. Wasser aufgenommen und bei 50°C für zehn Minuten solubilisiert.

3.6.7. Southern Blot-Verfahren

Ziel des Southern Blot-Verfahrens ist es, gelelektrophoretisch getrennte DNA-Fragmente auf einer Membran zu fixieren, um mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Die nach 3.6.6. erhaltenen Fragmente genomischer DNA (80 µg je Probe) wurden mit insgesamt 120 U Restriktionsendonuclease *EcoR* I (s. 3.6.4.) in zwei Schritten über einen Zeitraum von zwölf Stunden bei 37°C weiter fragmentiert (alternativ wurde auch *Hind* III verwendet) und das Enzym anschließend bei 65°C für zehn Minuten inaktiviert. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (s. 3.6.4.). Das Gel wurde zur Depurinierung der DNA für 30 min in 0.25 mM HCl, anschließend zur Denaturierung der DNA für 30 min in 0.5 M NaOH / 1.0 M NaCl und abschließend zur Neutralisierung für zweimal 30 min in 3M NaCl / 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 auf einem Flachbettschüttler inkubiert. Die getrennten DNA-Fragmente wurden durch abwärts gerichteten Kapillartransfer in Hochsalzpuffer (10 x SSC; s. 7.1.) in einem Zeitraum von zwölf Stunden auf eine Nylonmembran (GenScreen, NEN-DuPont) übertragen. Die Membran wurde für fünf Minuten in 2 x SSC gewaschen. Die DNA wurde zunächst bei 80°C für zwei Stunden und anschließend durch Bestrahlung mit 50 mJ/cm² UV-Licht (254 nm, GS Gene Linker, Biorad) auf der Membran fixiert (*cross-linking*). Die Membran wurde trocken bei 4°C gelagert.

3.6.8. Herstellung und Markierung einer nicht-radioaktiven DNA-Sonde

Die DNA-Sonde zur Detektion der SM22-PP1 α -Sequenz wurde mittels PCR unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem dUTP erzeugt (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche, Mannheim). Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengestellt. Als Matrizen-DNA diente die SM22-PP1 α -Expressionskassette (s. 3.9.1.). Die Primersequenzen und das PCR-Programm sind in Tab. 7.3. aufgeführt. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 410 bp und umfaßte den Übergangsbereich zwischen SM22-Promotor und der für PP1 α codierenden Sequenz (s. S. 43 Abb. 4.13.). Die Sonde wurde bei -20°C gelagert und konnte mehrfach verwendet werden.

3.6.9. Hybridisierung und Detektion

Die Bestandteile der Prähybridisierungslösung (s. 7.1.) wurden auf dem Wasserbad bei ca. 90°C gelöst und anschließend die Lösung auf 65°C abgekühlt. Die Nylonmembran (s. 3.6.7.) wurde mit der DNA-Seite innen in eine Hybridisierungsröhre eingebracht und mit bidest. Wasser benetzt. Die Membran wurde für zehn Minuten bei RT in 6 x SSC vorinkubiert. 6 x SSC wurde entfernt und die Membran für eine Stunde bei 65°C in Prähybridisierungslösung prähybridisiert. Die Bestandteile der Hybridisierungslösung (s. 7.1.) wurden auf dem Wasserbad bei ca. 90°C gelöst, anschließend die Lösung auf 65°C abgekühlt und mit 20 µl DIG-markierter DNA-Sonde (s. 3.6.8.) versetzt. Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Hybridisierung bei 65°C für ca. zwölf Stunden durchgeführt. Die sondenhaltige Hybridisierungslösung wurde gesammelt und bis zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Nylonmembran wurde zur Blockade unspezifischer Antikörperbindung bei RT in Maleinsäure-Puffer (s. 7.1.) mit 1% (m/V) Blockingreagenz (Roche) in einer Glasschale für 60 min vorinkubiert und anschließend zusammen mit AP-konjugiertem anti-DIG Antikörper (1:5000 in Maleinsäurepuffer/Blockingreagenz) in Haushaltsfolie eingeschweißt und für 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde zweimal 15 min bei RT in Maleinsäure-Puffer mit 0.3% (V/V) Tween-20 gewaschen und zweimal 5 min mit Detektionspuffer äquilibriert. Die Detektion erfolgte analog dem Verfahren für Western Blots (s. 3.4.7.).

3.7. Bestimmung der Phosphataseaktivität

3.7.1. Nicht-radioaktiver Phosphatase-Assay

Die Methode beruht auf der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu p-Nitrophenol (pNP) und anorganischem Phosphat durch Phosphatasen. Durch die Dephosphorylierung kommt es zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums der Substanz mit einem Maximum im sichtbaren Spektralbereich bei 400-420 nm. Das heißt es wird ein gelber Farbkomplex gebildet dessen Intensität sich proportional zur Phosphataseaktivität verhält. Die Intensität kann im alkalischen Milieu (pH = 10) zusätzlich verstärkt werden; in saurem Milieu verblaßt die Farbe. pNPP wird in der Enzymdiagnostik zur quantitativen, colorimetrischen Messung von alkalischer, saurer und Prostataphosphatase im Serum verwendet (Andersch und Szczypinski 1947, Jacobsson 1960, Ohmori 1937). Ebenso wird pNPP durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert und kann somit zur Quantifizierung ihrer Enzymaktivität verwendet werden (Chung et al. 1999, Huang

und Honkanen 1998, Perrino et al. 1992, Zhang et al. 1992). Durch die unspezifische Dephosphorylierung des pNPPs durch verschiedene Phosphatasen ist die Verwendung dieser Methode jedoch auf die Charakterisierung reiner PP-Präparationen beschränkt und wurde in dieser Arbeit nur für den Bereich der Herstellung rekombinanter PP1 α mit Hilfe des Baculovirussystems (s. 3.8.) verwendet.

Die Probe wurde mit dem jeweiligen Homogenisationspuffer so verdünnt, daß die Absorption im linearen Bereich der Standardkurve lag ($A = 0.0-2.4$, entsprechend 0-100 nmol pNP). Der Reaktionsansatz bestand aus 200 μ l vorgekühlter Probenverdünnung und 400 μ l vorgekühlter pNPP-Reaktionslösung. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte bei einer Temperatur von 30°C für 20 min. Bei niedrigen Phosphataseaktivitäten konnte die Reaktionszeit auf 30 min erhöht werden. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und die Reaktion endgültig durch Zugabe von 200 μ l 5 M KOH gestoppt. Die Menge an freigesetztem pNP wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Dabei entsprach eine Absorption von 1.0 einer pNP- bzw. Phosphatfreisetzung von 0.05 nmol/ μ l Reaktionsansatz. Eine pNPP-Einheit Phosphataseaktivität wurde definiert als die Menge Enzym, welche 1 nmol pNP pro min freisetzt. Enthielt der Probenpuffer Manganionen wurde auf ein Abstoppen der Reaktion mit 5 M KOH verzichtet (Fällung von Mn(OH)₂) und die Probe nach Zugabe von 200 μ l bidest. Wasser und Kühlung auf Eis direkt gemessen.

3.7.2. Radioaktiver Phosphatase-Assay

Für die Charakterisierung der PP-Aktivität in der Zellkultur wurde der für PPs spezifische radioaktive Phosphatase-Assay verwendet (vgl. 3.7.1.).

Herstellung der Homogenate zur Messung der Phosphataseaktivität

Adenoviral infizierte H9c2-Zellen (s. 3.10.5.) wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und niederzentrifugiert (51 x g, 4 min, 4°C). Das Zellsediment wurde zweimal mit steriler, kalter PBS pH 7.45 (s. 7.1.) gewaschen, um anhaftende Viruspartikel sicher zu entfernen. Die Zellen wurden in Homogenisationspuffer II (1 ml je 75 cm² Zellrasen) aufgenommen, dreimal für zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab (VirSonic®) bei 3-5 W Leistung unter einer Sicherheitswerkbank auf Eis homogenisiert und anschließend 20 min bei 15 800 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde als Homogenat bezeichnet und bei -80°C gelagert.

Der Probenansatz bestand aus 0.4 µg Gesamtprotein des Homogenats in zehn Mikrolitern Homogenisationspuffer II und zehn Mikrolitern Puffer M1 (s. 7.1.). Die Proben wurden entweder mit zehn Mikrolitern 1%igem DMSO oder 50 nM Okadasäure in 1%igem DMSO gemischt, für 30 min bei 30°C vorinkubiert und in den Phosphorylase a-Assay eingesetzt. Die Endkonzentration im Assay betrug 10 nM Okadasäure und diente der Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität (s. 1.2.2.).

Herstellung der Homogenate zur Messung des inhibitorischen Effekts

Adenoviral infizierte H9c2-Zellen wurden im Nährmedium mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und zentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Die Zellen wurden einmal mit 100 mM HEPES pH 7.4 gewaschen und in sterilem 100 mM HEPES pH 7.4 (1.2 ml je 75 cm² Zellrasen) aufgenommen. Um anhaftende Adenoviren zu inaktivieren, wurden die Proben für zehn Minuten auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden dreimal für zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®]) bei 3-5 W Leistung unter Kühlung homogenisiert, erneut für zehn Minuten auf 95°C erhitzt (Inaktivierung von Viren und PPs) und anschließend 20 min bei 15 800 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde für zwölf Stunden in abgekochten, semipermeablen Dialyseschläuchen (Servapor[®], Serva, Heidelberg) im Verhältnis 1:1000 gegen 50 mM HEPES pH 7.4 bei 4°C dialysiert. Die Homogenate wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Der Probenansatz bestand aus 1.0 µg Gesamtprotein des Homogenats in 10 µl 50 mM HEPES pH 7.4, 10 µl Puffer M2, 10 µl 5.0 mM MnCl₂ und 2.5 ng rekombinanter PP1α aus *E. coli* (Sigma, Steinheim).

Herstellung von [³²P]-markierter Phosphorylase a

Die Phosphorylase a katalysiert *in vivo* den Glykogenabbau zu Glucose-1-phosphat. PPs dephosphorylieren die Phosphorylase a zur inaktiven Phosphorylase b. [³²P]-markierte Phosphorylase a (Ahmad et al. 1989, DePaoli-Roach 1984) wurde durch Inkubation von zehn Milligramm Phosphorylase b mit 40 IU Phosphorylase-Kinase und einem Millicurie γ-[³²P]-ATP für 150 min bei 30°C hergestellt. Zur Entfernung von nicht eingebautem γ-[³²P]-ATP wurde das Enzym durch Zugabe von drei Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und für 20 min bei 12 000 x g und 4°C (Centrikon Typ T-124) zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden in zwei Millilitern Dialysepuffer (s. 7.1.) aufgenommen, in einem semipermeablen Dialyseschlauch (Servapor[®], Serva, Heidelberg) zweimal gegen je zwei Liter Puffer dialysiert und bei 4°C gelagert.

Bestimmung der Phosphorylase-Phosphataseaktivität

Die Bestimmung der Phosphataseaktivität wurde nach Neumann et al. (1991) durchgeführt. Als Substrat wurde [³²P]-markierte Phosphorylase a eingesetzt und die Freisetzung von radioaktivem Orthophosphat als Maß der PP-Aktivität ermittelt. Probe (s. o.) und [³²P]-Phosphorylase a-enthaltender Reaktionsansatz (s. 7.1.) wurden auf Eis gemischt und anschließend die Dephosphorylierungsreaktion bei 30°C durchgeführt. Die Vorverdünnung der Probe und die Reaktionszeit wurden jeweils durch Vorversuche optimiert. Es durften maximal 15% der im Ansatz enthaltenen Aktivität umgesetzt werden, um die Freisetzungsgeschwindigkeit des Orthophosphats nicht durch eine abnehmende Substratmenge zu limitieren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von BSA 2% und TCA 50% beendet. Nach vollständiger Fällung auf Eis (10 min) wurde die Suspension bei 15 000 × g für fünf Minuten zentrifugiert und die Aktivität im Überstand in einem Szintillationszähler gemessen.

3.8. Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe eines Baculovirusystems

Baculoviren gehören zur Gruppe der *Baculoviridae*, einer Gruppe von doppelsträngigen DNA-Viren, die spezifisch Insektenzellen infizieren. Die in Insektenzellen (Eukaryoten) exprimierten Proteine besitzen anschließend viele der eukariotischen Proteinmodifikationen wie Glykosylierung, Acylierung oder proteolytische Spaltung (Fraser 1992), auf die in bakteriellen Expressionssystemen verzichtet werden muß. Des weiteren bleiben die Proteine in der Mehrzahl der Fälle in der Zelle gelöst (Kashima et al. 1999). Durch das virale Transfektionssystem wird eine hohe Ausbeute von bis zu 50% der Proteinexpression der Insektenzelle erreicht. Gleichzeitig ist die Handhabung sicher und einfach, da die Viruspromotoren in Vertebraten weitgehend inaktiv sind (Carbonell et al. 1985). Insektenzellen wachsen im Vergleich mit Säugerzellen schneller und benötigen keinen CO₂-Inkubator. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Variante des *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) verwendet. Das Virusgenom ist mit einer Größe von ca. 130 kb Länge einer direkten Klonierung gegenüber unzugänglich. Daher wurde das Fremdgen zunächst in einen kleineren Transfervektor kloniert, der anschließend mit dem Virusgenom in Insektenzellen zur homologen Rekombination gebracht wurde (Kitts und Possee 1993, Livingstone und Jones 1989). Das Fremdgen wurde dabei an Stelle des Polyhedrin-Gens integriert. Polyhedrin ist ein Hüllprotein, das in großer Menge in der späten Phase der Infektion gebildet wird. In der Natur werden die Viren in Polyhedrin eingehüllt, um sie vor Austrocknung zu schützen. (Fraser 1992)

3.8.1. Kultur von Insektenzellen

Es wurden Insektenzellen der kontinuierlich wachsenden Zelllinie Sf21 (Ovarienzellen der Art *Spodoptera frugiperda*; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (Vaughn et al. 1977). Zur Kultur wurde ein Milliliter der in Gefriermedium (TNM-FH Medium + 10% (V/V) DMSO) bei -80°C gelagerten Zellen (ca. 1×10^7 Zellen) mit vier Millilitern TNM-FH Medium (s. 7.1.) in eine 25 cm^2 -Zellkulturflasche gegeben und bei 27°C im Brutschrank ohne CO_2 -Begasung inkubiert. Das Medium wurde 30 min und 24 h nach der Aussaat der Zellen gewechselt. Nach Ausbildung eines zusammenhängenden Zellrasens wurde das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit fünf Millilitern frischem Medium vom Boden der Zellkulturflasche mit Hilfe einer Meßpipette abgespült und resuspendiert. Die Zelldichte und Vitalität der Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (0.4%ige Lösung; Life Technologies, Karlsruhe) bestimmt. Pro 25 cm^2 -Kulturflasche wurden 0.75×10^6 Zellen ausgesät. Dies entsprach einer Dichte von 0.15×10^6 Zellen/ml Medium. Der Erhalt der Kultur erfolgte entsprechend.

3.8.2. Klonierung des Transfervektors der His₆-PP1 α

Die codierende Sequenz der PP1 α (Kitamura et al. 1991) wurde mittels PCR amplifiziert (s. 3.6.5.) und in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eines 5'-dephosphorylierten Vektors (pTRE2) zwischen die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen *Bam*H I und *Xba* I einkloniert. Der Vektor pTRE2-PP1 α wurde mit der Restriktionsendonuclease *Xba* I gespalten und die *Xba* I-Schnittstelle durch den Einsatz von Klenow-Fragment „geglättet“, indem das Enzym als Polymerase den fehlenden komplementären DNA-Strang an den 5'-Überhang der Spaltstelle anlagerte. Der linearisierte Vektor wurde mit der Restriktionsendonuclease *Sac* I gespalten und das entstandene 1012 bp lange Fragment der für PP1 α codierenden Sequenz nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert. Das PP1 α -Fragment wurde in die MCS des 5'-dephosphorylierten Transfervektors pAchLT-A zwischen die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen *Sac* I und *Sma* I einkloniert. Abb. 3.1. zeigt eine schematische Darstellung des rekombinanten Transfervektors pAchLT-A-PP1 α .

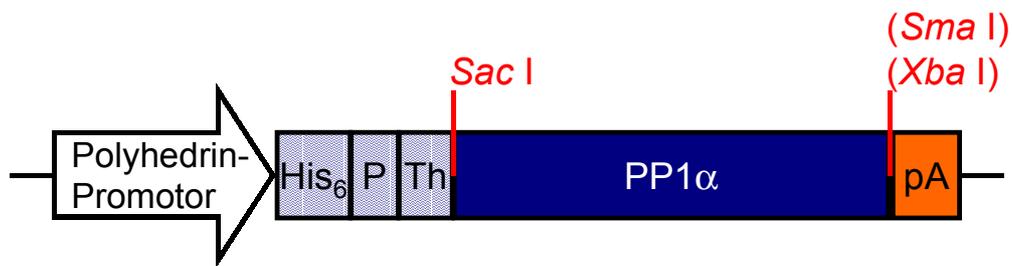


Abb. 3.1.:
Schematische Darstellung der Expressionskassette des rekombinanten Baculovirus zur Expression einer His₆-markierten PP1 α

Die codierende Sequenz der PP1 α wurde in die MCS des Baculovirus-Transfervektors pAcHLT-A inkloniert und in Sf21-Insektenzellen mit der Baculovirus-DNA (BaculoGold-DNA) zur homologen Rekombination gebracht. Der neu generierte rekombinante Baculovirus exprimiert die PP1 α als Fusionsprotein mit einer Erkennungssequenz von sechs Histidin-Molekülen (His₆), einer Proteinkinase-A-Phosphorylierungsstelle (P) und einer Thrombinerkennungssequenz (Th) unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors. pA: Polyadenylierungssignal.

In diesem Vektor steht die Expression des Fremdgens unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors. Die PP1 α sollte als Fusionsprotein mit zusätzlichen N-terminalen Sequenzen exprimiert werden. Bestandteile dieser Sequenz waren: sechs Histidin-Moleküle für die spezifische Erkennung und Aufreinigung, eine Proteinkinase A-phosphorylierbare Sequenz zur radioaktiven Markierung des exprimierten Proteins und eine Thrombinerkennungssequenz für die Abspaltung dieser zusätzlichen Proteinsequenzen. Die Sequenz der PP1 α und die Übergänge zum Transfervektor wurden durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierungsprimer: s. Tab. 7.4.).

3.8.3. Generierung eines rekombinanten His₆-PP1 α -Baculovirus durch homologe Rekombination

Der rekombinante Baculovirus wurde durch homologe Rekombination des nach 3.8.2. erzeugten pAcHLT-A-PP1 α Transfervektors mit dem eigentlichen Baculovirusgenom (BaculoGold[®]-DNA; Pharmingen, San Diego, USA) in Insektenzellen erzeugt. BaculoGold[®]-DNA ist eine modifizierte AcNPV-Baculovirus-DNA, die eine letale Deletion im Protein 1629 (ORF 1629) enthält und allein für keinen replikationsfähigen Virus codieren kann. Kotransfektion und homologe Rekombination mit dem den Defekt komplementierenden Transfervektor führt wiederum zu replikationsfähigen rekombinanten Baculoviren, wodurch eine Rekombinationsrate von mehr als 99% erreicht werden kann (Kitts und Possee 1993).

Kotransfektion

Die Transfektion erfolgte durch Calciumphosphatpräzipitation (Chen und Okayama 1988). 0.25 µg BaculoGold[®]-DNA und 3.0 µg pAChLT-A-PP1α (s. 3.8.2.) wurden in einem Milliliter Transfektionspuffer B (Pharmingen, s. 7.1.) gemischt und auf Eis vorgekühlt. In einer 25 cm²-Zellkulturflasche wurden 2.8 x 10⁶ Sf21-Zellen mit einem Milliliter Transfektionspuffer A (Pharmingen, s. 7.1.) benetzt und anschließend das Transferpuffer B/DNA-Gemisch tropfenweise zugegeben (weiße Trübung durch ausfallendes Calciumphosphat/DNA-Präzipitat). Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 27°C wurden die Zellen einmal mit TNM-FH Medium gewaschen und für 4-5 Tage bei 27°C in frischem TNM-FH Medium kultiviert.

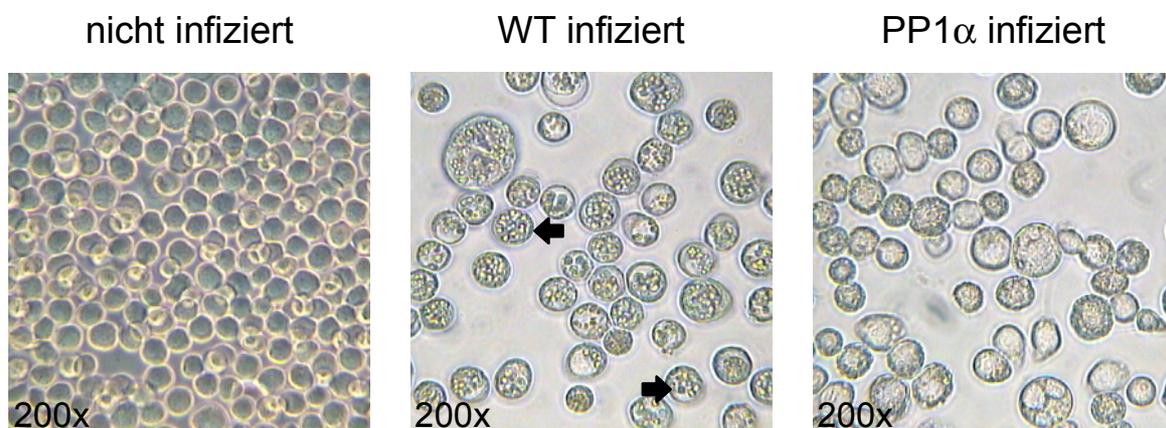


Abb. 3.2.:
Vergleich der Morphologie nicht infizierter und infizierter Sf21-Insektenzellen

Dargestellt ist das mikroskopische Erscheinungsbild von nicht infizierten, mit Wildtyp-Baculovirus (WT) infizierten und mit rekombinantem His₆-PP1α-Baculovirus (PP1α) infizierten Sf21-Zellen. Die Photographien wurden 72 h p. i. aufgenommen. Infizierte Zellen zeigen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen einen deutlichen Zuwachs im Zellvolumen und stellen die Zellteilung ein. Wildtyp-Baculovirus infizierte Zellen sind im Gegensatz zu mit rekombinanten Baculoviren infizierten Zellen mit den typischen Einschlußkörperchen des Hüllproteins Polyhedrin gefüllt (schwarze Pfeile). Rekombinate Baculoviren sind Polyhedrin-defizient.

Erste Infektion

Die kotransfizierten Zellen wurden resuspendiert und zentrifugiert (820 x g, 10 min, RT). Der Überstand enthielt den durch Aussprossung (*budding*) freigesetzten rekombinanten Baculovirus, mit dem zur weiteren Vermehrung der Viren 3 x 10⁶ Sf21-Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche infiziert wurden. Nach ca. fünf Tagen zeigten die infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen eine Vergrößerung des Zellvolumens auf das zwei- bis dreifache und die Zellen lösten sich vom

Boden der Zellkulturflasche ab (s. Abb. 3.2.). Die infizierten Zellen wurden resuspendiert und zentrifugiert (820 x g, 10 min, RT). Der Überstand enthielt die rekombinanten Viren aus denen nach 3.8.4. ein Einzelvirus selektiert wurde.

3.8.4. Selektion eines rekombinanten Virus

Die Selektion eines Virus erfolgte mit Hilfe eines Plaque-Assays. Der nach 3.8.3. erhaltene Virusüberstand wurde mit TNM-FH-Medium in Konzentrationen von 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} vorverdünnt. Jeweils 7×10^7 Sf21-Zellen wurden in 100 mm Petri-schalen mit 100 μ l Virusvorverdünnung in 10 ml TNM-FH Medium infiziert und für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das virushaltige Medium abgenommen und die infizierten Zellen mit 1% (m/V) Agarose (Low melting agarose, Pharmingen) überschichtet. Die Agarose wurde hierzu in Grace's Medium (Invitrogen, Groningen, Niederlande) unter Erhitzen gelöst und durch Verdünnung mit einem Volumen Medium auf eine Konzentration von 1% (m/V) verdünnt. Die Zellen wurden mit der auf 30°C abgekühlten Agarose überschichtet. Nach 6-10 Tagen Inkubation bei 27°C zeigten sich bei seitlicher Beleuchtung unter der Stereolupe weiße Plaques bestehend aus infizierten und teilweise lysierten Zellen. Ein Plaque repräsentiert eine monoklonale Viruspopulation.

3.8.5. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung

Amplifikation des monoklonalen Baculovirus

Nach 3.8.4. erhaltene Virusplaques wurden mit einer autoklavierten Pipettenspitze aus der Agarosefläche (Virusverdünnung 10^{-5}) ausgestanzt und die Viren in einem Milliliter TNM-FH Medium über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsmischer aus der Agarose gelöst. Sf21-Zellen wurden mit den aus der Agarose gelösten Viren des Plaque-Assays infiziert und bei 27°C inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die infizierten Zellen geerntet und zentrifugiert (820 x g, 10 min, RT). Die Überstände enthielten die monoklonalen, rekombinanten Viruspopulationen. Die Viren wurden analog der ersten durch eine zweite Infektion weiter amplifiziert. Die Expression der His₆-PP1 α wurde durch Western Blot-Analyse des Sediments untersucht und die Population mit der höchsten Proteinexpression zur Herstellung einer Stammlösung verwendet.

Herstellung einer Virusstammlösung

Zehn 183 cm²-Zellkulturflaschen mit jeweils 2.5×10^7 Sf21-Zellen wurden mit je 500 µl virushaltigem Überstand der zweiten Infektion nach Plaque-Assay (s. o.) in 30 ml TNM-FH Medium infiziert (MOI < 1). Nach fünf Tagen Inkubation bei 27°C wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert (820 x g, 10 min, RT). Der erhaltene Überstand wurde als Virusstammlösung weiterverwendet. Virusstammlösung für den aktuellen Gebrauch wurde lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt, die restliche Virusstammlösung bei -20°C gelagert.

Bestimmung des Virustiters

Virustiter wurden analog 3.8.4. mit Hilfe eines Plaque-Assays ermittelt. Es wurden Verdünnungen der Virusstammlösungen in den Konzentrationen 10^{-1} bis 10^{-8} in Zehnerschritten verwendet. Die Plaques der jeweiligen Verdünnung wurden ausgezählt und der Virustiter als Plaque bildende Einheiten (pfu) je ml Virusstammlösung berechnet.

3.8.6. Expression der rekombinanten His₆-PP1α in Sf21-Insektenzellen

Die Infektion der Sf21-Zellen erfolgte in einschichtiger Zellkultur in Kulturflaschen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von drei bis sechs. Die MOI gibt die Anzahl der Viruspartikel (pfu) je Zelle an. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 45 h. Die Zellen wurden durch Abspülen mit einer Meßpipette abgelöst und zentrifugiert (820 x g, 10 min, RT). Das Zellsediment wurde einmal mit steriler, kalter PBS pH 7.45 gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Herstellung der Homogenate s. 3.4.1..

3.8.7. Renaturierung unlöslicher Sf21 His-PP1

Die Renaturierung der unlöslichen His₆-PP1α erfolgte in Anlehnung an die Methode von Berndt und Cohen (1990). Die infizierten Sf21-Zellen (s. 3.8.6.) wurden wie unter 3.4.1. beschrieben aufgearbeitet und ein Sediment erhalten, das zu einem Großteil aus als unlösliches Protein exprimierter His₆-PP1α bestand. Das Sediment wurde in 6 M Guanidiniumpuffer pH 7.5 (ca. 1 µl Puffer je 10^5 ursprünglich infizierter Zellen) aufgenommen, wodurch guanidiniumlösliche Proteine in Lösung gingen. Die guanidiniumunlöslichen Anteile wurden durch Zentrifugation (15 800 x g, 10 min, RT) abgetrennt.

500 µl Guanidiniumlösung wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und die Gefäßwandung mit der Lösung benetzt. Durch schnelles Zuschütten von 35 ml Renaturierungspuffer und umgehendes, intensives Mischen der Lösungen wurde die Renaturierung der denaturierten His₆-PP1 α eingeleitet. Die Reaktivierung erfolgte bei RT unter gelegentlichem Umschwenken des Ansatzes. Der Verlauf der Renaturierung wurde durch Bestimmung der Phosphataseaktivität mit Hilfe des nicht-radioaktiven Phosphatase-Assays (pNPP-Assay, s. 3.7.1.) verfolgt. Verlangsamte sich die Zunahme der Phosphataseaktivität je µl Renaturierungsansatz oder nahm durch Proteolyse ab, so wurde die Renaturierung als abgeschlossen angesehen. Die Renaturierungszeiten waren von Experiment zu Experiment stark schwankend und währten minimal 2.5 h, maximal 9.0 h.

3.8.8. Aufreinigung und Konzentrierung der Sf21 His-PP1 durch Metallionen-Affinitätschromatographie

Die PP1 α wurde in Sf21-Zellen als Fusionsprotein mit einer N-terminalen Sequenz bestehend aus sechs Histidin-Molekülen (His₆-PP1 α) exprimiert (s. 3.8.2.). Da Polyhistidin-Sequenzen in nativen Proteinen selten sind, eignet sich diese His₆-Markierung zur spezifischen Detektion und Aufreinigung von Proteinen. Histidin geht bei physiologischem pH-Wert koordinative Bindungen mit einigen Übergangsmetallen (Ni²⁺, Co²⁺) ein. Talon-Harz (Clontech) ist ein cobaltbasierter Chelatkomplex für die Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC = *immobilized metal ion affinity chromatography*). In diesem Chelator wird ein Cobaltion in einer elektronegativen Bindungstasche gehalten, in der vier der sechs Koordinierungsstellen durch den Talonliganden belegt sind und die zwei restlichen zur koordinativen Bindung von polyhistidinmarkierten Proteinen zur Verfügung stehen. Die Proteine können entweder durch Protonierung des Imidazolstickstoffs oder durch Verdrängung aus der koordinativen Bindung durch Imidazolzusatz freigesetzt werden.

Talon-Harz wurde in seiner Lagerungslösung resuspendiert und 750 µl der Harzsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (700 x g, 2 min, RT) wurde der Überstand entfernt und das Talon-Harz durch dreimalige Zugabe von jeweils fünf Millilitern Waschpuffer (s. 7.1.) äquilibriert. Zum äquilibrierten Talon-Harz wurde die unter 3.8.7. erhaltene Proteinlösung gegeben und unter schwachem Schütteln für 15 min bei RT die renaturierte His₆-PP1 α an das Harz gebunden. Es wurde erneut zentrifugiert (700 x g, 2 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Talon-Harz wurde in drei Schritten mit insgesamt 14 ml Waschpuffer

gewaschen und zentrifugiert. Die gebundene His₆-PP1 α wurde mit Elutionspuffer (s. 7.1.) in vier Fraktionen a 300 μ l eluiert. Die Elutionslösung wurde mit einem Volumen autoklaviertem Glycerols versetzt und bei -20°C gelagert.

3.9. Glattmuskelspezifische Überexpression der PP1 α in transgenen Mäusen

Die Generierung von Mäusen mit einer glattmuskelspezifischen Überexpression der PP1 α erfordert einen murinen Promotor, der die Transkription gewebespezifisch reguliert. Zu diesem Zweck wurde das minimale Promotorfragment (bp -445 bis +62) des SM22 α -Gens verwendet (Li et al. 1996b, Moessler et al. 1996, Solway et al. 1995; s. auch 5.3.1.).

3.9.1. Generierung transgener Mäuse

Klonierung der Expressionskassette

Die codierende Sequenz der PP1 α (Kitamura et al. 1991) wurde mittels PCR amplifiziert (s. 3.6.5.) und in die MCS eines 5'-dephosphorylierten Vektors (pBS SK(-)-TieI-bGHpA) in die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen *Bam*H I und *Xba* I einkloniert. Das Klonierungszwischenprodukt bestand anschließend aus dem Vektorrückgrat eines pBlueskript II-Vektors (pBS SK(-)), in das zwischen *Hind* III/*Pst* I ein Tie I-Promotor (Rezeptortyrosinkinasepromotor, Maus, NCBI-Accession: S79346, bp 329-784), zwischen *Bam*H I/*Xba* I die codierende Sequenz der PP1 α (Ratte, NCBI-Accession: D00859, bp 69-1061) und daran anschließend zwischen *Xba* I/*Not* I ein Polyadenylierungssignal (bGHpA = bovines Wachstumshormon Polyadenylierungssignal, 309 bp) kloniert waren. Die SM22-Promotorsequenz (Maus, NCBI-Accession: U36589, bp 2283-2796) wurde aus einem pGFPemd-Vektor mit den Restriktionsendonucleasen *Kpn* I/*Hind* III isoliert und in den ebenfalls mit *Kpn* I/*Hind* III geschnittenen, 5'-dephosphorylierten Zwischenvektor vor den Tie I-Promotor umklont. Der Tie I-Promotor wurde aus dem Doppelpromotorkonstrukt durch die Restriktionsendonucleasen *Hind* III/*Bam*H I entfernt, die Schnittstellen mit Hilfe von Klenow-Fragment „geglättet“ (s. 3.6.4.) und der Vektor religiert. Abb. 3.3. zeigt eine schematische Darstellung der SM22-PP1 α -Expressionskassette. Die Sequenz der Kassette wurde durch Sequenzierung überprüft.

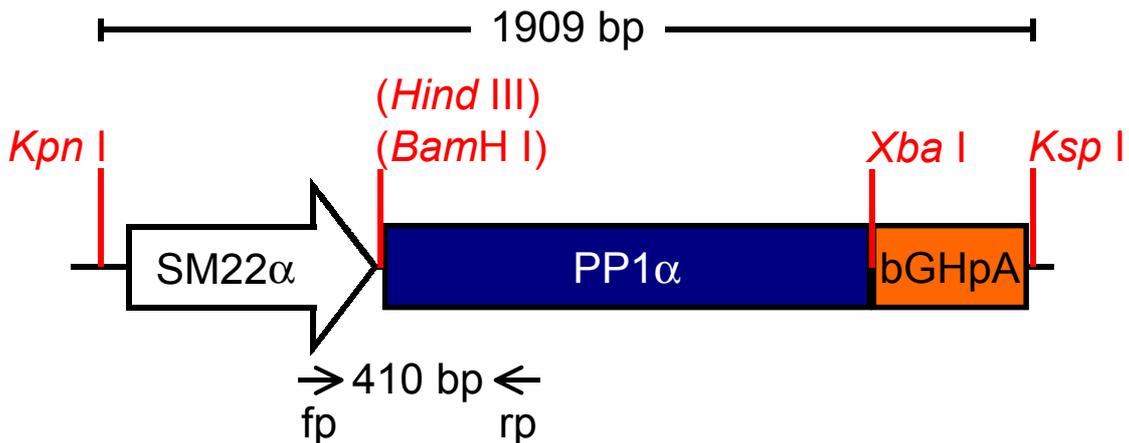


Abb. 3.3.:
Schematische Darstellung der SM22-PP1 α -Expressionskassette

Zur Generierung transgener Mäuse mit einer glattemuskelspezifischen Überexpression der PP1 α wurde die SM22-PP1 α -Expressionskassette mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen *Kpn I*/*Ksp I* isoliert und das DNA-Fragment in befruchtete Eizellen der Maus mikroinjiziert. Die Transkription der codierenden Sequenz der PP1 α stand in dieser Expressionskassette unter der gewebespezifischen Kontrolle des SM22-Promotors. Das Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons (bGHpA) bewirkte eine Polyadenylierung der mRNA. Das Transgen konnte mit Hilfe der PCR-Technik und spezifischen Primern (fp: *forward primer*, rp: *reverse primer*) aus genomischer DNA der Maus nachgewiesen werden. Das PCR-Produkt war 410 bp groß.

Vorbereitung der Expressionskassette für die Mikroinjektion

Das pSM22-PP1 α -Plasmid wurde in einer 1 l-Kultur von *E. coli* XL1-Blue MRF' amplifiziert und in einer präparativen Plasmidisolierung (s. 3.6.3.) isoliert. Durch Spaltung des Plasmids mit den Enzymen *Kpn I*/*Ksp I* wurden die prokaryotischen Sequenzen entfernt und die Expressionskassette bestehend aus SM22-PP1 α -bGHpA (1909 bp) für die spätere Integration in das Genom linearisiert. Die DNA wurde über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle

Durch Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle der Maus wurde ein Gentransfer in die Keimbahn mit zufälliger Integration der DNA in das Genom erzeugt. Es wurden weibliche Mäuse mit Hormonen zur Superovulation stimuliert und verpaart. Die fertilisierten Eizellen wurden entnommen und die Fremd-DNA mit einer Glaskapillare in den männlichen Vorkern der Eizellen injiziert. Zellen, welche die Injektion überlebten, wurden in scheinchwangere weibliche Mäuse implantiert und von ihnen ausgetragen. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Dr. B. Skryabin vom Institut für Experimentelle Pathologie durchgeführt.

3.9.2. Genotypisierung mit Hilfe der PCR- und Southern Blot-Technik

Genotypisierung mit Hilfe der PCR-Technik

Der Nachweis des Transgens erfolgte aus genomischer DNA, die aus der Schwanzspitze der Maus isoliert wurde (s. 3.6.6.). Es wurden zwei Mikroliter der genomischen DNA in die PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 0.4 mM dNTP-Mix (0.1 mM/Nucleotid), 1.0 μ M *forward*-Primer, 1.0 μ M *reverse*-Primer, 3.0 mM MgCl₂ und 2.5 U Taq-DNA-Polymerase (Gibco, Karlsruhe) in 50 μ l 1 x PCR-Puffer. Die PCR wurde in einem PCR-Gerät (Gene Amp[®] PCR System 9700, Perkin Elmer) durchgeführt. Die Primersequenzen und das PCR-Programm sind in Tab. 7.3. aufgeführt. Das amplifizierte DNA-Fragment hatte eine Länge von 410 bp.

Genotypisierung mit Hilfe der Southern Blot-Technik

Der Nachweis des Transgens in den Mäusen erfolgte mit Hilfe der Southern Blot-Technik aus genomischer DNA. Zur Durchführung s. 3.6.6. bis 3.6.9..

3.9.3. Charakterisierung der transgenen Mäuse auf Proteinebene

Die Charakterisierung der transgenen Tiere auf Proteinebene erfolgte gemäß den unter 3.4. beschriebenen Verfahren.

3.10. Adenovirale Expressionssysteme

Replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren stellen ein vielseitiges und schnelles virales Gentransportsystem (Transfektionssystem) für die funktionelle und therapeutische Genanalyse dar. Mit Adenoviren können unabhängig von der Zellteilung nahezu alle Arten von Säugetierzellen infiziert werden. Gleichzeitig sind sie jedoch von geringer Pathogenität für den Menschen. Mehr als 40 verschiedene Serotypen der Adenoviren sind bisher bekannt (Fields et al. 1996). Die in dieser Arbeit generierten rekombinanten Adenoviren sind nicht onkogene (verbleiben extrachromosomal) Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) und wurden nach der Methode von He et al. (1998) hergestellt. Das verwendete adenovirale Genom enthielt Deletionen in den Regionen E1 ($\Delta E1$, Ad5 Nucleotide 1 - 3533) und E3 ($\Delta E3$, Ad5 Nucleotide 28 130 - 30 820). Der produktive Infektionszyklus wird mit der Transkription des E1A-Gens eingeleitet, dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1B, E2A, E3 und E4 wirkt (E = *early gene*). Darauf folgt die DNA-Replikation und, mit der Aktivierung der späten viralen Gene, die Bildung neuer Virionen. Die E3 Region codiert für Proteine, die für die Umgehung der Immunantwort des Wirtsorganismus wichtig sind, sie ist für die Virusreplikation in der Zellkultur nicht essentiell. Durch die beiden Deletionen wurde somit einerseits erreicht, daß der rekombinante Adenovirus replikationsdefizient war und andererseits das Virusgenom bis zu 7.5 kb an fremden DNA-Fragmenten aufnehmen konnte, ohne die Enkapsidation der Virus-DNA zu stören (Benihoud et al. 1999, Bett et al. 1993).

Die Fremd-DNA wurde zunächst in einen Transfervektor kloniert, da eine direkte Klonierung in das Virusgenom aufgrund der Größe der DNA (33.4 kb) und Ermangelung singulärer Schnittstellen nicht möglich ist. Anschließend wurde durch homologe Rekombination mit dem viralen Genom (pAdEasy-1, Quantum Biotechnologies) in Bakterien das rekombinante adenovirale Genom erzeugt. Die exogene Expressionskassette wurde dabei in die E1-Region integriert. Die Generierung der Adenoviren erfolgte durch Transfektion der rekombinanten Plasmid-DNA in HEK293-Zellen. Die HEK293-Zelllinie ist eine kontinuierlich wachsende Zelllinie humaner, embryonaler Nierenzellen, die mit gescherter humaner Ad5-DNA transformiert wurde. Diese Zelllinie enthält die viralen Gene E1A und E1B (Ad5 Nucleotide 1 - 4344), welche die Deletionen im rekombinanten Virusgenom komplementieren können und so die Generierung rekombinanter, selbst replikationsdefizienter Adenoviren ermöglichen (Graham et al. 1977; Louis et al. 1997). Abb. 3.4. gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Virusherstellung.

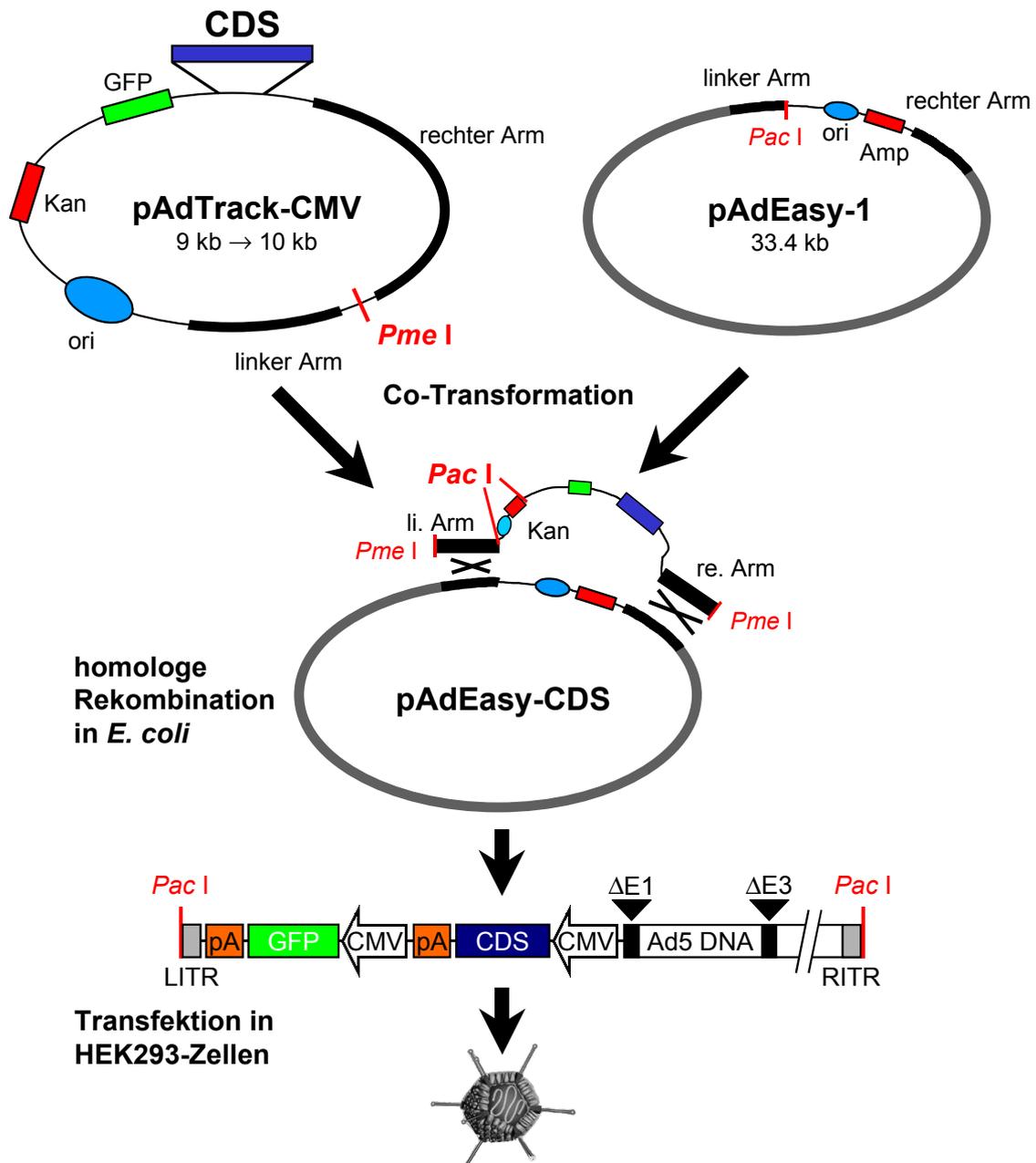


Abb. 3.4.:
Schematische Darstellung der Generierung rekombinanter Adenoviren

Die codierende Sequenz (CDS) des Zielgens wurde in den Transfektor pAdTrack-CMV einkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuclease *Pme I* linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) durch Co-Transformation in *E. coli* BJ5183 zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycin-resistenzgen (Kan) wurde auf rekombinante Plasmide selektiert. Das mit der Restriktionsendonuclease *Pac I* linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in HEK293-Zellen transfiziert, welche die Fähigkeit besitzen die Deletionen ($\Delta E1$, $\Delta E3$) im Virusgenom zu komplementieren und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren zu bilden. Ad5 DNA: genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5, Amp: Ampicillinresistenzgen, CMV: Zytomegalievirus-Promotor, $\Delta E1$, $\Delta E3$: Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation, GFP: grün fluoreszierendes Protein, LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, pA: Polyadenylierungssignal.

3.10.1. Klonierung der Transfervektoren

pAdTrack-CMV

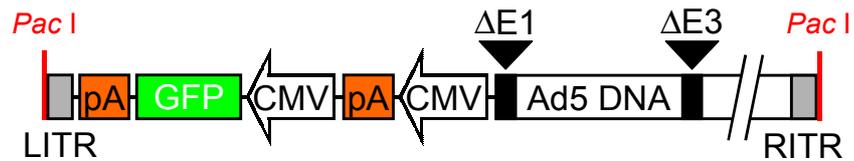
Als Transfervektor für alle nachfolgend aufgeführten Konstrukte diente der pAdTrack-CMV-Transfervektor (He et al. 1998). Der Transfervektor beinhaltet eine doppelte Expressionskassette. Die erste Kassette dient der Integration eines Fremdgens und besteht aus einem Zytomegalie-Virus Promotor (CMV), einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) und einem Polyadenylierungssignal (pA). Die zweite Kassette ist analog der ersten aufgebaut. Sie dient der Expression eines verstärkt grün fluoreszierenden Proteins (eGFP, im weiteren nur noch als GFP bezeichnet) zur Kontrolle des Infektionsverlaufs. Die Kassette besteht aus einem CMV-Promotor der die Transkription des GFP kontrolliert und einem pA. Durch die zwei CMV-Promotoren verläuft die Expression von GFP und Fremdgen unabhängig voneinander, es handelt sich nicht um ein Fusionsprotein. Die doppelte Expressionskassette ist von adenoviralen Sequenzen umgeben (linker und rechter Arm) die eine homologe Rekombination mit dem eigentlichen Virusgenom (pAdEasy-1) erlauben. Für die Amplifikation des Vektors in *E. coli* sind des weiteren ein Kanamycinresistenzgen (Selektionsgen) und ein Replikationsstart (*ori*, *origin of replication*) integriert.

Durch homologe Rekombination von pAdTrack und pAdEasy-1 wurde ein replikationsdefizienter Adenovirus generiert, der als Negativkontrolle diente. Abb. 3.5. zeigt eine schematische Darstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-Ktr.

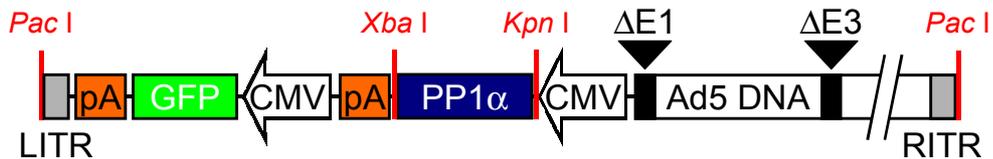
pAdTrack-CMV-PP1

Die codierende Sequenz der PP1 α (Kitamura et al. 1991) wurde mittels PCR amplifiziert (s. 3.6.5.) und in die MCS eines 5'-dephosphorylierten Vektors (pTRE2) in die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen *Bam*H I und *Xba* I inkloniert. Der Vektor pTRE2-PP1 wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Xba* I/*Kpn* I geschnitten und das isolierte 1006 bp-Fragment der codierenden Sequenz der PP1 α in den Transfervektor pAdTrack-CMV in die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen *Xba* I/*Kpn* I umklont. Die Sequenz der PP1 α und die Übergänge zum Transfervektor wurden durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierungsprimer: s. Tab. 7.5.). Abb. 3.5. zeigt eine schematische Darstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-PP1.

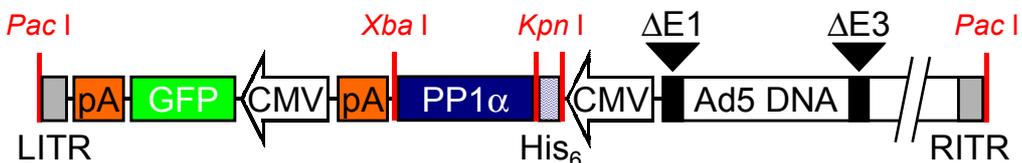
Ad-Ktr.



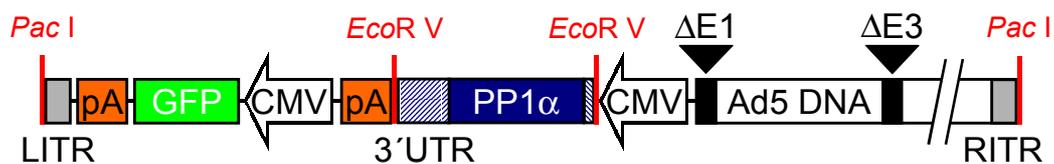
Ad-PP1



Ad-His-PP1



Ad-PP1-UTR



Ad-I₂

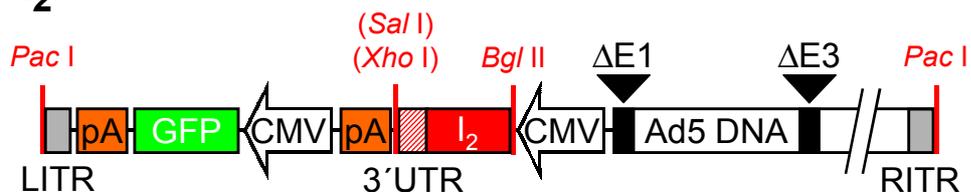


Abb. 3.5.:

Schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren

Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der generierten rekombinanten Adenoviren, die durch homologe Rekombination des jeweiligen pAdTrack-CMV-Transfervektors mit pAdEasy-1 und anschließender Linearisierung durch die Restriktionsendonuclease *Pac I* erhalten wurden. Ad5 DNA: genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5, CMV: Zytomegalievirus-Promotor, $\Delta E1$, $\Delta E3$: Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation, GFP: grün fluoreszierendes Protein, His₆: Histidinsequenz, auf die eine Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase A und eine Thrombinerkennungssequenz folgen (vgl. Abb. 3.1.), LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, pA: Polyadenylierungssignal, UTR: untranslatierte Region.

pAdTrack-CMV-His-PP1

Die Generierung eines Transfervektors zur Expression einer His₆-markierten PP1 α erfolgte durch Einklonieren der Markierungssequenz in den pAdTrack-CMV-PP1-Transfervektor (s. o.). Die His₆-Sequenz wurde mittels PCR aus dem pAcHLT-B-Vektor (Pharmingen, San Diego, USA) als Matrizen-DNA erzeugt. Der Reaktionsansatz enthielt 0.5 ng pAcHLT-B-DNA, 0.8 mM dNTP-Mix (0.2 mM/Nucleotid), 1.0 μ M *forward*-Primer, 1.0 μ M *reverse*-Primer, 2.0 mM MgSO₄ und 2.5 U Pwo-DNA-Polymerase in 50 μ l 1 x PCR-Puffer (Roche, Mannheim) (zur Pwo-Polymerase s. 3.6.5.). Der verwendete *forward*-Primer enthielt die Schnittstelle der Restriktionsendonuclease *Kpn* I, so daß am 5'-Ende des PCR-Produkts eine zweite *Kpn* I-Schnittstelle zusätzlich zur in der MCS bereits vorhandenen integriert wurde. Die Primersequenzen und das PCR-Programm sind in Tab. 7.6. aufgeführt. Das PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuclease *Kpn* I gespalten, das 148 bp-Fragment der Markierungssequenz isoliert und in den 5'-dephosphorylierten Transfervektor pAdTrack-CMV-PP1 in die Schnittstelle der Restriktionsendonuclease *Kpn* I einkloniert. Die Sequenz der His₆-PP1 α und die Übergänge zum Transfervektor wurden durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierungsprimer: s. Tab. 7.5.). Abb. 3.5. zeigt eine schematische Darstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-His-PP1.

pAdTrack-CMV-PP1-UTR

Die verwendete PP1 α -UTR-Sequenz der Ratte wurde von Kunimi Kikuchi (Research Section of Biochemistry, Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Japan) zur Verfügung gestellt und bestand aus der codierenden Sequenz der PP1 α flankiert von 68 und 357 bp langen Bereichen von 5'- und 3'-untranslatierten Regionen. Die 3'-UTR enthielt das native Polyadenylierungssignal und darauf folgend eine Polyadenylierungssequenz (Kitamura et al. 1991). Die PP1 α -UTR-Sequenz wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuclease *EcoR* I aus dem Klonierungsvektor pUC18 isoliert und die Schnittstelle mit Klenow-Fragment „geglättet“, indem das Enzym als Polymerase den fehlenden komplementären DNA-Strang an den 5'-Überhang der Schnittstelle anlagerte. Das PP1 α -UTR-Fragment wurde in die MCS des 5'-dephosphorylierten Transfervektors pAdTrack-CMV in die Schnittstelle der Restriktionsendonuclease *EcoR* V einkloniert. Die PP1 α -UTR-Sequenz und die Übergänge zum Transfervektor wurden durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierungsprimer: s. Tab. 7.5.). Abb. 3.5. zeigt eine schematische Darstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-PP1-UTR.

pAdTrack-CMV-I₂

Die codierende Sequenz des I₂ zuzüglich 209 bp 3'-UTR (Helps et al. 1994) wurde mittels PCR amplifiziert (s. 3.6.5.) und sollte in die MCS des Transfervektors pAdTrack-CMV in die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen *Bgl* II und *Xho* I inkloniert werden. Durch irreguläre Restriktion des Transfervektors wurde jedoch anstelle der *Xho* I-Erkennungssequenz (C/TCGAG) die *Sal* I-Erkennungssequenz (G/TCGAC) der MCS durch die Restriktionsendonuclease *Xho* I geschnitten. Nach Ligation von Vektor und I₂-Fragment entstand ein 3'-Übergang der Sequenz CTCGAC. Dieser inkorrekte Klonierungsschritt war jedoch für die weitere Verwendung des Transfervektors unproblematisch. Die I₂-Sequenz und die Übergänge zum Transfervektor wurden durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierungsprimer: s. Tab. 7.7.). Abb. 3.5 zeigt eine schematische Darstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-I₂.

3.10.2. Homologe Rekombination in Bakterienzellen

Präparation von pAdTrack-CMV-DNAs und pAdEasy-DNAs

Die präparative Plasmidisolierung erfolgte analog der unter 3.6.3. beschriebenen Standardmethode. Zur Elution der pAdEasy-DNAs wurde heißer Elutionspuffer verwendet, um die starke Bindung des großen Plasmids (33.4 kb) an die Anionenaustauschersäule zu brechen und die Ausbeute in der Elution zu erhöhen.

Vorbereitung der Transfervektor-DNA für die homologe Rekombination

Die pAdTrack-CMV-Transfervektoren wurden vor der homologen Rekombination mit der Restriktionsendonuclease *Pme* I linearisiert und 5'-dephosphoryliert, wodurch der rechte und linke Arm für die homologe Rekombination freigelegt wurden. Im späteren Verlauf der Klonierung wurde über das Kanamycinresistenzgen des pAdTrack-CMV auf rekombinationspositive Klone selektiert. Daher wurde auf eine quantitative Spaltung der Transfervektor-DNA geachtet, weil durch Reste von ungeschnittenem Transfervektor in der Präparation der Hintergrund bei der Selektion größer wird. 40 µg Transfervektor-DNA wurden mit insgesamt 300 U Restriktionsendonuclease *Pme* I (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in zwei Stufen nach den Angaben des Herstellers über einen Zeitraum von 14 h geschnitten. Das Enzym wurde hitzeinaktiviert (80°C, 20 min) und die DNA umgepuffert. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 6.0 versetzt, die DNA mit drei Volumen kaltem, absoluten Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 800 x g, 30 min, 4°C). Das Sediment wurde, um Salzreste zu entfernen, einmal mit Ethanol

70% (V/V) gewaschen und bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Die DNA wurde in sterilem, bidest. Wasser gelöst. Um eine Religation nach Elektroporation in *E. coli* zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIP) in einem Verhältnis von 0.15 U/µg DNA für 1.5 h bei 37°C dephosphoryliert. Die CIP wurde für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde über ein DNA-Agarosegel vom Enzym getrennt und mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert (s. 3.6.4.). Die Elution erfolgte mit sterilem, bidest. Wasser. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Proben auf einem 1%igen Agarosegel mit einem Massenstandard (MassRuler DNA Ladder, High Range, MBI Fermentas, Heidelberg) verglichen.

Elektroporation

Jeweils 100 ng zirkuläre, superhelicale pAdEasy-1-DNA wurden mit 500, 600 und 900 ng linearisiertem und 5'-dephosphoryliertem pAdTrack-CMV-Transfervektor gemischt und nach 3.6.2. mit Hilfe der Elektroporation in *E. coli* BJ5183 transformiert. Als Kontrollen dienten ein Ansatz, der ausschließlich 100 ng pAdEasy-1 (Test der Elektroporation) sowie ein Ansatz, der 900 ng des rekombinanten pAdTrack-CMV (Test der Vollständigkeit der Linearisierung) enthielt.

Selektion eines rekombinanten Klons

40 Kolonien der homologen Rekombination in BJ5183-Zellen wurden mit auto-klavierten Zahnstochern von den Kanamycin-LB-Agarplatten isoliert. Hierbei wurde kleineren Kolonien der Vorzug gegeben (He et al. 1998). Die Zahnstocher mit anhaftender Bakterienkolonie wurden zunächst in 20 µl steriles, bidest. Wasser getaucht, anschließend in zwei Milliliter LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt und die *E. coli* für zwölf Stunden bei 37°C und 180 rpm weiter kultiviert. Die 20 µl Wasser (mit gepickter Kolonie) wurden in eine PCR zum Nachweis von pAdEasy eingesetzt. Der PCR-Ansatz bestand aus 20 µl *E. coli*-Suspension, 1 x PCR-Enhancer (bei 65°C kristallfrei gelöst), 0.8 mM dNTP (0.2 mM/Nucleotid), 1.0 µM *forward*-Primer, 1.0 µM *reverse*-Primer, 0.06 U Eppendorf Master Taq-Polymerase in 1 x PCR-Puffer (Eppendorf, Hamburg). Die Primersequenzen und das verwendete PCR-Programm sind in Tab. 7.8. angegeben. Wurden pAdEasy-PCR-positive Kolonien identifiziert, erfolgte eine analytische Plasmidisolierung (s. 3.6.3.) aus den 2ml-Mini-Kulturen.

Bei pAdEasy-positiven Kolonien der PP1 α -Konstrukte wurde der Nachweis des Transgens mittels PCR gegen die PP1 α -Sequenz durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 0.8 mM dNTP-Mix (0.2 mM/Nucleotid), 1.0 μ M *forward*-Primer, 1.0 μ M *reverse*-Primer, 3.0 mM MgCl₂ und 2.5 U Taq-DNA-Polymerase in 50 μ l 1 x PCR-Puffer (Gibco, Karlsruhe). Die Primer und das PCR-Programm sind in Tab. 7.9. aufgeführt.

Bei pAdEasy-positiven Kolonien des I₂-Konstrukts erfolgte der Nachweis der homologen Rekombination durch Vergleich der Fragmentlängen nach Restriktion mit der Restriktionsendonuclease *Pac* I. Reine pAdEasy-DNA zeigte im 1%igen Agarosegel ein einzelnes Fragment von 33.4 kb. Nach erfolgreicher homologer Rekombination trat neben einem großen DNA-Fragment (> 33.4 kb) zusätzlich ein kleineres Fragment von 3.0 bzw. 4.5 kb auf (vgl. 4.4.3. und Abb. 4.17.A).

Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde in *E. coli* DH10B mittels Elektroporation umtransformiert. Dieses Vorgehen war notwendig, da sich *E. coli* BJ5183 durch den *recA*-negativ-Status zwar gut für die homologe Rekombination eignet, jedoch eine schlechte Plasmid-DNA-Ausbeute zeigt. *E. coli* DH10B hingegen ist *recA*-positiv. Die Plasmid-DNA wurde anschließend im präparativen Maßstab aus *E. coli* DH10B gewonnen (s. 3.6.3. und 3.10.2.). Die codierende Sequenz und die Übergänge zum Vektorrückgrat wurden analog den Angaben zu den Transfervektoren durch Sequenzierung erneut überprüft (s. 3.10.1.).

3.10.3. Generierung von Viren in HEK293-Zellen

Anzucht und Kultur von HEK293-Zellen

Kryokonservierte HEK293-Zellen (ATCC, Manassas, USA; in HEK-Medium mit 5-10% (V/V) DMSO) wurden aus der Stickstoffkühlung entnommen und durch schnelle Zugabe von einem Milliliter auf 37°C vorgewärmtem HEK-Medium (s. 7.1.) aufgetaut. Die Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit integrierten hydrophoben Filtern in der Schraubkappe ausgesät und mit weiterem HEK-Medium versorgt. Nach einer Kulturzeit von 24 h (bei 37°C, 5% CO₂) wurde das Medium einmal gewechselt, um DMSO-Reste zu entfernen. Die Zellpassage erfolgte je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 bei ca. 95% Konfluenz. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Abspülen des Zellrasens mit Hilfe einer Meßpipette.

Vorbereitung der DNA für die Transfektion

Die AdEasy-Konstrukte wurden, um die invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) frei zu legen und die bakteriellen DNA-Abschnitte (ori, Kan) zu entfernen, mit der Restriktionsendonuclease *Pac I* linearisiert und anschließend das Enzym hitzeinaktiviert (80°C, 20 min). Die DNA-Lösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 6.0 versetzt, die DNA mit drei Volumen kaltem, abs. Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 800 x g, 30 min, 4°C). Das Sediment wurde, um Salzreste zu entfernen, einmal mit Ethanol 70% (V/V) gewaschen und bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Die DNA wurde in sterilem, bidest. Wasser gelöst und photometrisch quantifiziert.

Transfektion

Die mit der Restriktionsendonuclease *Pac I* linearisierten pAdEasy-DNAs (10 µg) wurden mit 30.0 µl/µg DMEM (ohne Antibiotika, ohne FCS) und 6 µl/µg Superfect® (Qiagen, Hilden) gemischt. Nach Inkubation für zehn Minuten bei RT (Mizellbildung) wurden drei Milliliter HEK-Medium (s. 7.1.) zum Transfektionsansatz gegeben. Die Mischung wurde auf HEK293-Zellen einer Konfluenz von 75% in einer 75cm²-Zellkulturflasche gegeben und zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden weitere 20 ml HEK-Medium zugegeben und der Ansatz im Brutschrank für 2-3 Tage inkubiert bis die HEK293-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grüne GFP-Fluoreszenz zeigten (Anregung bei 488 nm, Emission bei 530 nm). Die Expression des GFP war der Indikator für den erfolgreichen Verlauf der Transfektion.

Ernte der Zellen

Die transfizierten HEK293-Zellen wurden im Medium mit einer Meßpipette resuspendiert und abzentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Das Zellsediment wurde einmal mit zehn Millilitern steriler PBS pH 7.45 (s. 7.1.) gewaschen und in 500 µl sterilem 100 mM HEPES pH 7.4 aufgenommen. Die Zellsuspension wurde, um die Zellen aufzubrechen und so den Virus freizusetzen, viermal in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert (91 x g, 4 min, RT) und der virushaltige Überstand für die erste Infektion (s. u.) verwendet bzw. bei -80°C gelagert.

Erste Infektion

HEK293-Zellen wurden in einer 75cm²-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert. Das alte HEK-Medium wurde gegen fünf Milliliter frisches Medium ausgetauscht und die Zellen mit dem gesamten nach Transfektion erhaltenen Virusüberstand (s. o.) infiziert. Die Zellen wurden für zwei Stunden unter der hohen Virus-

konzentration inkubiert (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden 15 ml HEK-Medium zugegeben und die Zellen weiter kultiviert bis einzelne Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grüne GFP-Fluoreszenz zeigten (Anregung bei 488 nm, Emission bei 530 nm). Dies war bei der ersten Infektion nach vier bis sieben Tagen der Fall.

3.10.4. Amplifikation von Viren und Titerbestimmung

Amplifikation des Virus

Die Zellen der ersten Infektion wurden analog dem Verfahren nach der Transfektion geerntet (s. 3.10.3.). Der Virus wurde in drei weiteren Infektionszyklen mit steigenden Zellzahlen amplifiziert. Ein Infektionszyklus dauerte ca. drei Tage. Der fünfte Infektionszyklus diente zur Generierung einer Virusstammlösung. Hierzu wurden in vierundzwanzig 154cm²-Petrischalen HEK293-Zellen einer Konfluenz von 75% mit je 20 µl des virushaltigen Überstandes des vierten Infektionszyklusses infiziert. Nach drei Tagen zeigten alle Zellen eine grüne Fluoreszenz. Die infizierten Zellen wurden mit PBS pH 7.45 gewaschen und in fünf Millilitern 100 mM HEPES pH 7.4 resuspendiert. Die Zellen wurden aufgebrochen, der Virus freigesetzt und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand als Virusstammlösung bezeichnet (s. 3.10.3.). Die Virusstammlösung wurde zur Titerbestimmung verwendet und bei -80°C gelagert.

MOI-Test

Der sogenannte MOI-Test (nach Quantum Biotechnologies, AdEasy Vector System, Application Manual, Version 1.2) diente als schnelle und einfach durchführbare Methode zur vorläufigen Bestimmung von Virustitern. Der Test wurde vor allem zur Titerbestimmung während der Virusamplifikation genutzt, kann eine abschließende genauere Titerbestimmung (s. u.) jedoch nicht ersetzen. In 6er-Multischalen wurden je Kammer 10⁶ H9c2-Zellen (zur Kultur s. 3.10.5.) ausgesät und für zwölf Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in H9c2-Medium kultiviert. Das Medium wurde anschließend entfernt und durch 0.025 bis 0.5 µl Viruslösung in je 500 µl H9c2-Medium ersetzt. Nach einer Infektionszeit von eine Stunde wurden weitere 1.5 ml Medium zugefügt und die Zellen für 72 h im Brutschrank kultiviert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Zellen mitgeführt. Die niedrigste Virusmenge, welche noch einen zytopathischen Effekt (Ablösung des gesamten Zellrasens) erzeugte, entsprach einer MOI von 10-20. Die Negativkontrolle durfte keinen zytopathischen Effekte aufweisen. Durch die Kenntnis des Volumens an Viruslösung und die vorgegebene Zellzahl konnte die Konzentration der infektiösen Viruseinheiten je Volumeneinheit (IU/µl) errechnet werden.

Titerbestimmung

HEK293-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten (96 Kammern) ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70% infiziert. Zur Infektion wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-17} der Virusstammlösung mit HEK-Medium hergestellt und 100 μ l der jeweiligen Verdünnung in die Kammern gegeben. Pro Verdünnung wurden zehn Kammern infiziert. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Zellvitalität wurden je Verdünnung zwei Kammern nicht infiziert. Der Infektionsverlauf wurde täglich über zehn Tage hinweg ausgewertet. Dabei wurde die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen je Kammer und Virusverdünnung ermittelt. In der höchsten Verdünnung, in der noch GFP-Expression auftrat, wurde eine grün fluoreszierende Zelle gleich einer infektiösen Viruseinheit (IU = *infectious unit* (analog zur Bezeichnung: efu = *expression-forming unit*)) gesetzt und der Virustiter als infektiöse Viruseinheiten je Volumeneinheit (IU/ μ l) dargestellt.

3.10.5. Kultur und Infektion von H9c2-Zellen

Anzucht und Kultur von H9c2-Zellen

Kryokonservierte H9c2-Zellen (in H9c2-Medium mit 5% (V/V) DMSO) wurden analog dem Verfahren bei HEK293-Zellen (s. 3.10.3) angezchtet. Die Zellen wurden mit Erreichen einer Konfluenz von 95% je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 gesplittet. Das alte Medium wurde vollständig entfernt und drei Milliliter vorgewärmte 1 x Trypsin/EDTA-Lösung (in PBS pH 7.45 aus 100 x Lösung; Gibco/Life Technologies) je 75cm² Zellrasen zugegeben. Die Zellen wurden für eine Minute unter Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert und anschließend wurde, um die optimale Einwirkzeit feststellen zu können, der weitere Verlauf der Trypsinisierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Spätestens fünf Minuten nach der Trypsinzugabe sollte sich die Mehrzahl der Zellen abgelöst haben und abgerundet in der Trypsinlösung schwimmen. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Medium inaktiviert, die Zellen mit einer Meßpipette suspendiert und erneut in Kulturschalen ausgesät.

Infektion von H9c2-Zellen

H9c2-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% in H9c2-Medium (s. 7.1.) infiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 h nach der Infektion. Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und abzentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Die Aufarbeitung der Proben wurde bereits geschildert: Untersuchungen auf Proteinebene s. 3.4.1., Untersuchungen auf RNA-Ebene s. 3.5.1., Untersuchungen zur Phosphataseaktivität s. 3.7.2..

3.10.6. Kultur und Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Isolierung und Kultur

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit Hilfe des neonatal-cardiomyocyte-isolation-system (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA) basierend auf der Methode nach Toraason et al. (1989) isoliert. Neonatale Ratten (1-3 Tage alt) wurden mit einer Schere dekaptiert. Der Brustraum wurde eröffnet und das Herz entnommen. Das Herz wurde in calcium- und magnesiumfreier Hank's balancierter Salzlösung (CMF HBSS) aufgenommen, noch zweimal gespült und anschließend durch Scherbewegungen mit zwei sterilen Skalpellern zerkleinert. Das zerteilte Herzgewebe wurde in neun Millilitern CMF HBSS aufgenommen und nach Zugabe von einem Milliliter Trypsinlösung (500 µg/ml Trypsin in CMF HBSS) für 16-20 h bei 4°C trypsinisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Milliliter Trypsin-Inhibitor-Lösung (2000 µg/ml Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen in CMF HBSS) bei 37°C gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit fünf Millilitern Collagenaselösung (300 U/ml Collagenase in Leibovitz-L15-Medium) versetzt, 30-45 min bei 37°C inkubiert, zehnmal mit Hilfe einer 10ml-Pipette trituriert und für 3-4 min ruhend belassen. Der Überstand der Zellsuspension wurde über ein mit Leibovitz-Medium gespültes Zellsieb filtriert. Die Zellreste wurden erneut in fünf Millilitern Leibovitz-Medium trituriert und filtriert. Das gesamte Filtrat wurde zentrifugiert (50-100 x g, 5 min, RT) und das Zellsediment in 20 ml DMEM (15% FCS) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine mit 0.15% Collagen-beschichtete 154cm²-Petrischale ausgebracht und für 30 min bei 37°C ruhend belassen, damit sich die Fibroblasten absetzen konnten. Der Überstand wurde abgenommen, zentrifugiert (50-100 x g, 10 min, RT) und das Zellsediment in fünf Millilitern NRC-Medium aufgenommen. Die Zelldichte und Vitalität der Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (0.4%ige Lösung, Life Technologies) bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 12.5×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Die weitere Kultur erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Infektion

Jeweils 10^6 neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit Adenovirus für 24, 48 und 72 h und einer MOI von 12, 24 und 48 in NRC-Medium infiziert. Die Ernte und Homogenisation der Zellen erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben.

3.10.7. Kultur und Infektion von Aortenringen der Maus

Die Aorta thoracica von fünf Monate alten, weiblichen CD-1 Mäusen wurde wie unter 3.1.1. beschrieben entnommen und in kaltem Krebs-Bicarbonat-Puffer (s. 7.1.) feinpräpariert. Durch wiegende Bewegungen mit einem Skalpell wurde die Aorta transversal in zwei Millimeter breite Gefäßringe zerteilt. Die Infektion erfolgte in M199-Medium (s. 7.1.) mit einer Virusmenge von 4.3×10^8 IU/Ring in einem Volumen von 200 μ l/Ring für fünf Stunden. Anschließend wurde das Volumen mit M199-Medium auf 800 μ l/Ring erhöht und die Gefäßringe für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Für die fluoreszenzmikroskopische Photographie wurden die Gefäßringe dreimal mit PBS pH 7.45 gespült und mit 5% Formalin in PBS pH 7.45 fixiert. Die Aufnahme erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm in PBS pH 7.45.

3.11. Statistische Auswertung

Die im Rahmen der Arbeit aufgeführten Werte sind arithmetische Mittelwerte von mehreren unabhängigen Einzelversuchen. Sie werden zusammen mit den zugehörigen Standardfehlern der Mittelwerte (SEM) als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Anzahl der Einzelversuche wird mit n bezeichnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels t-Test nach Student für verbundene bzw. unverbundene Stichproben beurteilt. Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied bewertet und als solcher gekennzeichnet.

3.12. Sicherheitsbestimmungen

Die genetischen Arbeiten erfolgten gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG) vom 16. Dezember 1993 unter Beachtung der in § 7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsstufen und -maßnahmen. Die Genehmigung bzw. Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8, § 9, § 11 und § 12 GenTG.

4. ERGEBNISSE

4.1. Calcium-unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur der Aorta der Maus durch Hemmstoffe der Proteinphosphatasen

4.1.1. Kontraktionskraftmessung an intakten Gefäßringen

Intakte Gefäßringe der Aorta der Maus wurden wie unter Material und Methoden beschrieben entnommen und einzeln in einen Gefäßmyographen eingesetzt (s. 3.1.1. und 3.2.). Der Gefäßring wurde in physiologischer Salzlösung (PSS) äquilibriert und anschließend zweimal durch Zugabe von kaliumhaltiger PSS (K-PSS, 118 mM K⁺) für jeweils 20 min zur Kontraktion gebracht. Nach erneutem Erreichen der Ruhespannung wurden jeweils die Phosphatasehemmstoffe Cantharidin (100 µM) und Microcystin LR (1 µM) zugegeben. Vorversuche mit dem Lösungsmittel DMSO (1% (V/V) in PSS), in dem die Phosphatasehemmstoffe aufgenommen worden waren, zeigten keine lösungsmittelbedingte Änderung der Kontraktionskraft.

Cantharidin führte zu einer schnellen und anhaltenden Zunahme der Kontraktionskraft (Abb. 4.1.). Bereits 20 min nach der Zugabe von Cantharidin konnte eine Zunahme der Kontraktionskraft (1.9 ± 0.8 mN/mm) entsprechend der durch Kalium ausgelösten maximalen Kraftentwicklung (2.0 ± 0.3 mN/mm) beobachtet werden. Der durch 100 µM Cantharidin maximal ausgelöste Effekt (2.9 ± 0.6 mN/mm) wurde nach 40 min erreicht, der t_{50} -Wert als Maß für die Geschwindigkeit dieses Effekts betrug 19 ± 2 min. Auch 180 min nach der Cantharidinzugabe wurde die Ruhespannung nicht wieder erreicht (1.5 ± 0.3 mN/mm). Dies zeigt, daß 100 µM Cantharidin in seiner Wirkung auf die Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur mindestens von vergleichbarer Effektivität wie Kalium ist. Im Gegensatz dazu zeigte 1 µM Microcystin LR innerhalb von 180 min keinen Effekt auf die Kontraktionskraft (Abb. 4.1.). Das Verhalten der Gefäßringe war analog dem Verhalten gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 1% (V/V), n = 3, Daten sind nicht dargestellt).

Zur Bestimmung der MLC₂₀-Phosphorylierung durch eindimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese (s. 4.1.3.) wurden die Ringe am Ende des Experiments umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

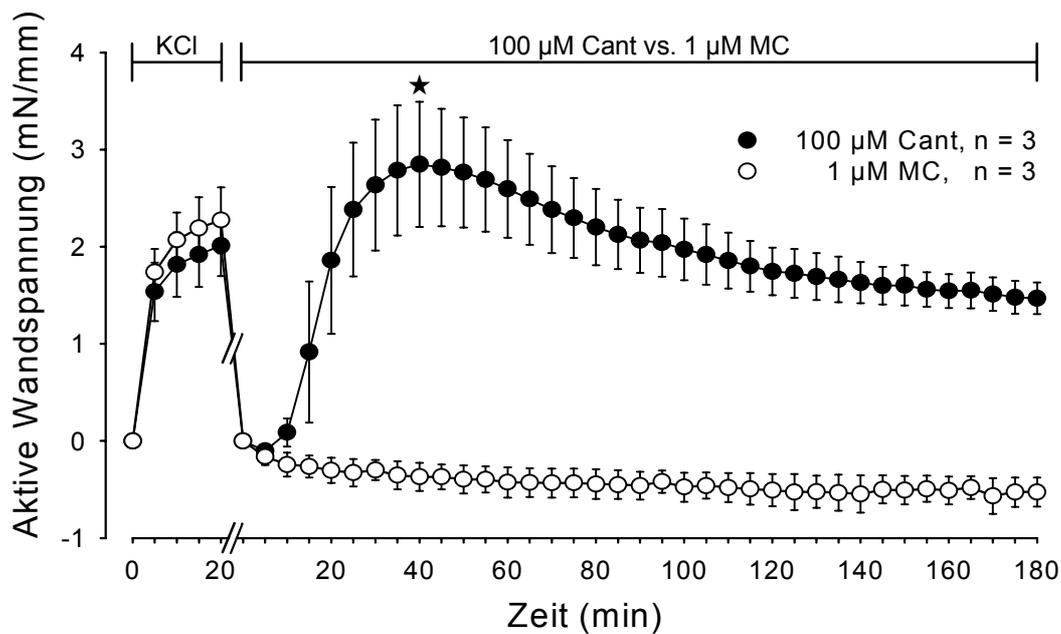


Abb. 4.1.:

Zeitabhängigkeit des Effekts von Cantharidin (Cant) und Microcystin LR (MC) auf die Kontraktionskraft von intakten Aortenringen der Maus

Isolierte intakte Aortenringe der Maus wurden zweimal mit KCl (118 mM) vorkontrahiert (dargestellt ist die 2. Kontraktion). Nach erneutem Erreichen der Ausgangslage, erfolgte die Zugabe von 100 μM Cant oder 1 μM MC. Ordinate: Aktive Wandspannung (mN/mm). ★ Erste signifikante Veränderung vs. 0 min ($p < 0.05$).

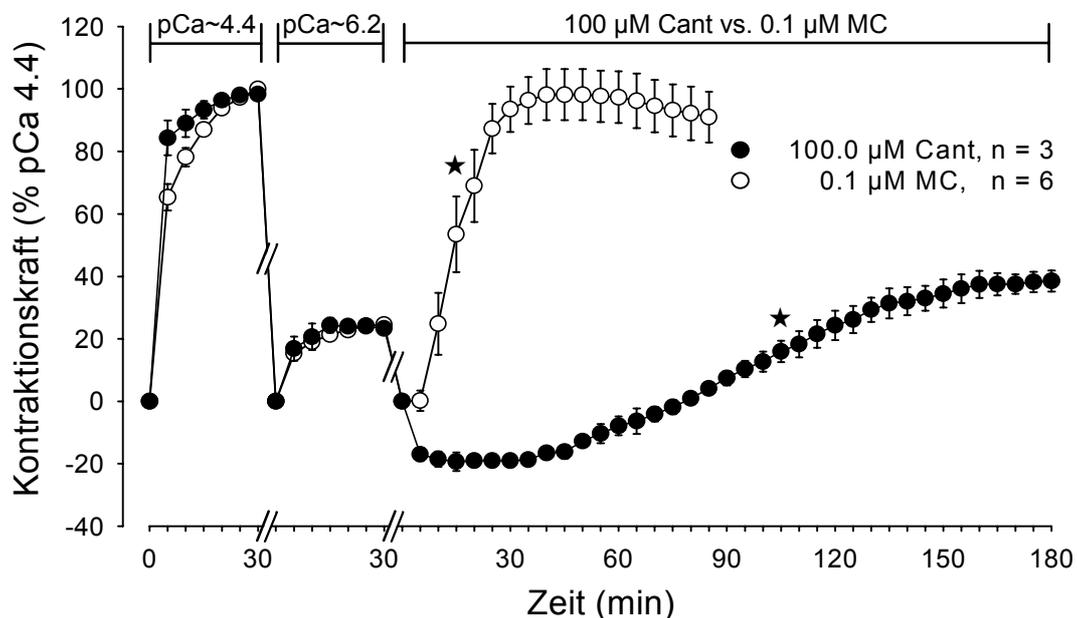


Abb. 4.2.:

Zeitabhängigkeit des Effekts von Cantharidin (Cant) und Microcystin LR (MC) auf die Kontraktionskraft von gehäuteten Muskelfasern der Aorta der Maus

Gehäutete Muskelfasern der Aorta der Maus wurden zweimal mit Ca^{2+} (pCa 4.4 und pCa 6.2) vorkontrahiert. Nach erneutem Erreichen der Ausgangslage, erfolgte die Zugabe von 100 μM Cant oder 0.1 μM MC (pCa > 8.0). Ordinate: Kontraktionskraft in Prozent der durch pCa 4.4 maximal ausgelösten Kraft. ★ Erste signifikante Veränderung vs. 0 min ($p < 0.05$).

4.1.2. Kontraktionskraftmessung an gehäuteten Gefäßmuskelfasern

Die Häutung mit Triton X-100 führt zu einer Permeabilisierung der glatten Muskulatur, durch die alle Membranfunktionen eliminiert werden, die intrazelluläre Calciumspeicherung zerstört wird und die Rezeptorkopplung verloren geht (Arner 1982, Takai et al. 1987). In Experimenten an gehäuteten Fasern kann somit die intrazelluläre Calciumkonzentration vollständig kontrolliert werden. Aus diesem Grund eignet sich diese Methode, um Aussagen über die Beziehung zwischen Calciumionenkonzentration und isometrischer Kraftentwicklung in der glatten Gefäßmuskulatur zu erhalten.

Gehäutete Gefäßmuskelfasern der Aorta der Maus wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, präpariert, zwischen zwei Stahlklammern montiert und in Relaxationslösung äquilibriert (s. 3.1.1. und 3.3.). Anschließend wurden die gehäuteten Fasern zur Kontrolle der Unversehrtheit des kontraktiven Apparates zweimal mit unterschiedlichen Konzentrationen an Calcium (pCa 4.4 und 6.2) zur Kontraktion gebracht. Nach erneutem Erreichen der Ruhespannung (80 μ N) wurden jeweils die PP-Hemmstoffe Cantharidin (100 μ M) und Microcystin LR (0.1 μ M) zugegeben. Versuche mit dem Lösungsmittel DMSO (1% (V/V) in Relaxationslösung) zeigten keine lösungsmittelbedingte Zunahme der Kontraktionskraft.

Zeitabhängigkeit der Kontraktionskraftentwicklung (Cant vs. MC)

Im Gegensatz zu intakten Gefäßringen zeigte sowohl Cantharidin als auch Microcystin LR in gehäuteten Gefäßmuskelfasern eine Zunahme der Kontraktionskraft (Abb. 4.2.). Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der durch 100 μ M Cantharidin ausgelösten Kraftentwicklung war in gehäuteten Gefäßmuskelfasern geringer als in intakten Gefäßringen. Der durch 100 μ M Cantharidin maximal auslösbare Effekt lag am Ende des Experiments nach 180 min bei $38.5 \pm 3.4\%$ der durch pCa 4.4 maximal entwickelten Kontraktionskraft, der t_{50} -Wert dieses Effekts betrug 111 ± 8 min. Zugabe von 0.1 μ M Microcystin LR führte hingegen zu einer schnellen Zunahme der Kontraktionskraft auf das Niveau der durch pCa 4.4 maximal entwickelten Kraft. Der maximal auslösbare Effekt ($98.2 \pm 8.2\%$ pCa 4.4) wurde nach 40 min erreicht, der t_{50} -Wert dieses Effekts betrug 14 ± 2 min.

Zur Bestimmung der MLC₂₀-Phosphorylierung (s. 4.1.3.) wurden die gehäuteten Gefäßmuskelfasern am Ende des Kontraktionskraftexperiments umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Kontraktionskraftentwicklung (MC)

Aufgrund des ausgeprägten Effekts von Microcystin LR 1.0 μM auf die Kontraktionskraft der gehäuteten Gefäßmuskelfasern wurden zusätzliche Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts durchgeführt (Abb. 4.3.). Beginnend bei einer Konzentration von 0.01 μM zeigte Microcystin LR eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme der Kontraktionskraft. Die 60 min nach der Zugabe beobachteten Effekte waren für alle Konzentrationen vergleichbar. Höhere Konzentrationen führten jedoch zu einer schnelleren Zunahme der Kontraktionskraft, wie es sich am jeweils früher beobachteten ersten Unterschied versus 0 min erkennen läßt.

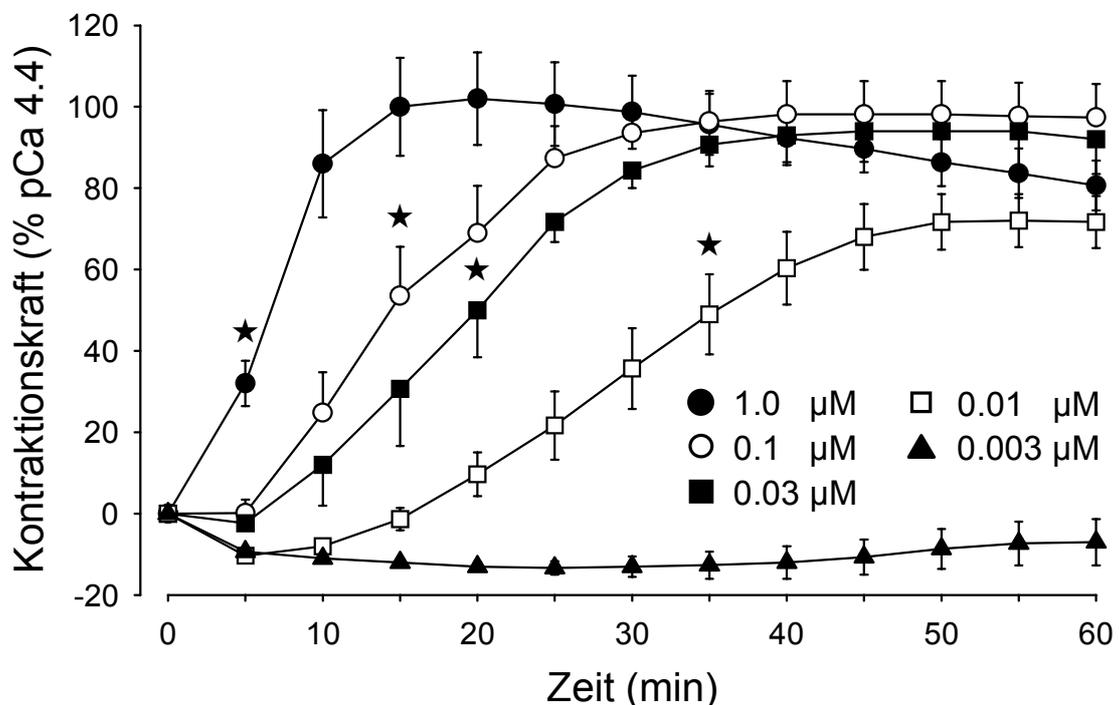


Abb. 4.3.:

Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von Microcystin LR auf die Kontraktionskraft von gehäuteten Muskelfasern der Aorta der Maus

Gehäutete Muskelfasern der Aorta der Maus wurden zweimal mit Ca^{2+} (pCa 4.4 und pCa 6.2) vorkontrahiert. Nach erneutem Erreichen der Ausgangslage erfolgte die Zugabe von 0.003 μM , 0.01 μM , 0.03 μM , 0.1 μM oder 1.0 μM Microcystin LR (in Relaxationslösung, pCa > 8.0). Mindestens drei unabhängige Experimente wurden je Konzentration durchgeführt. Die Sterne kennzeichnen den Zeitpunkt des ersten signifikanten Unterschieds versus 0 Minuten (\star , $p < 0.05$). Ordinate: Kontraktionskraft, dargestellt als Prozent der durch pCa 4.4 maximal ausgelösten Kraft.

Zeit- und Calciumabhängigkeit der Kontraktionskraftentwicklung (Cant)

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die zusätzliche Gabe von Calcium den Zeitverlauf der durch Cantharidin ausgelösten Kraftentwicklung verändert. In Abwesenheit von Calcium lag der t_{50} -Wert der maximalen Kontraktion durch 100 μM Cantharidin bei 111 ± 8 min ($n = 3$). Nach vorheriger Kontraktion mit pCa 5.9 war die Zeit bis zur halbmaximalen Kontraktion durch 100 μM Cantharidin verkürzt ($p < 0.05$) und der dazugehörige t_{50} -Wert lag bei 73 ± 6 min ($n = 3$).

4.1.3. Messung der MLC₂₀-Phosphorylierung

Die in den Kontraktionskraftexperimenten (4.1.1. und 4.1.2.) verwendeten intakten Gefäßringe und gehäuteten Gefäßmuskelfasern wurden wie unter Material und Methoden beschrieben aufgearbeitet (s. 3.4.1.) und die MLC₂₀-Phosphorylierung durch eindimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese bestimmt (s. 3.4.5.). In diesem Verfahren werden Proteine durch die Abwesenheit von SDS nicht nur nach der Masse, sondern zusätzlich nach der Summe der Ladungen des Proteins aufgetrennt. Durch die Phosphorylierung werden weitere negative Ladungen (Phosphatgruppen) in das Protein eingeführt. Dies führt zu einer veränderten Migration der phosphorylierten Formen der MLC₂₀ in der Harnstoff-Gelelektrophorese.

Intakte Gefäßringe

Abb. 4.4.A zeigt repräsentative Einzelexperimente der MLC₂₀-Detektion in intakten Gefäßringen nach Behandlung mit Cantharidin (100 μM), Microcystin LR (1 μM) und dem Lösungsmittel DMSO (1% (V/V)) als Kontrolle sowie die statistische Auswertung des Verhältnisses der MLC₂₀-Formen zueinander ($n = 3-4$). Ausschließlich die Behandlung mit Cantharidin führte zu einer Verschiebung des Verhältnisses der MLC₂₀-Formen von langsamer zu schneller migrierenden MLC₂₀-Formen. Der Anteil der MLC₂₀-Form P_0 zeigte eine Abnahme von $55.0 \pm 2.9\%$ auf $27.7 \pm 4.8\%$ ($n = 3-4$; $p < 0.05$ vs. Ktr) und der Anteil der MLC₂₀-Form P_2 zeigte eine Zunahme von $17.9 \pm 2.9\%$ auf $44.7 \pm 5.7\%$ ($n = 3-4$; $p < 0.05$ vs. Ktr).

Gehäutete Gefäßmuskelfasern

Abb. 4.4.B zeigt entsprechende Experimente mit gehäuteten Gefäßmuskelfasern. Im Gegensatz zu den intakten Gefäßringen zeigten sowohl Cantharidin (100 μM) als auch Microcystin LR (0.1 μM) einen Effekt. Unter der Behandlung mit den jeweiligen

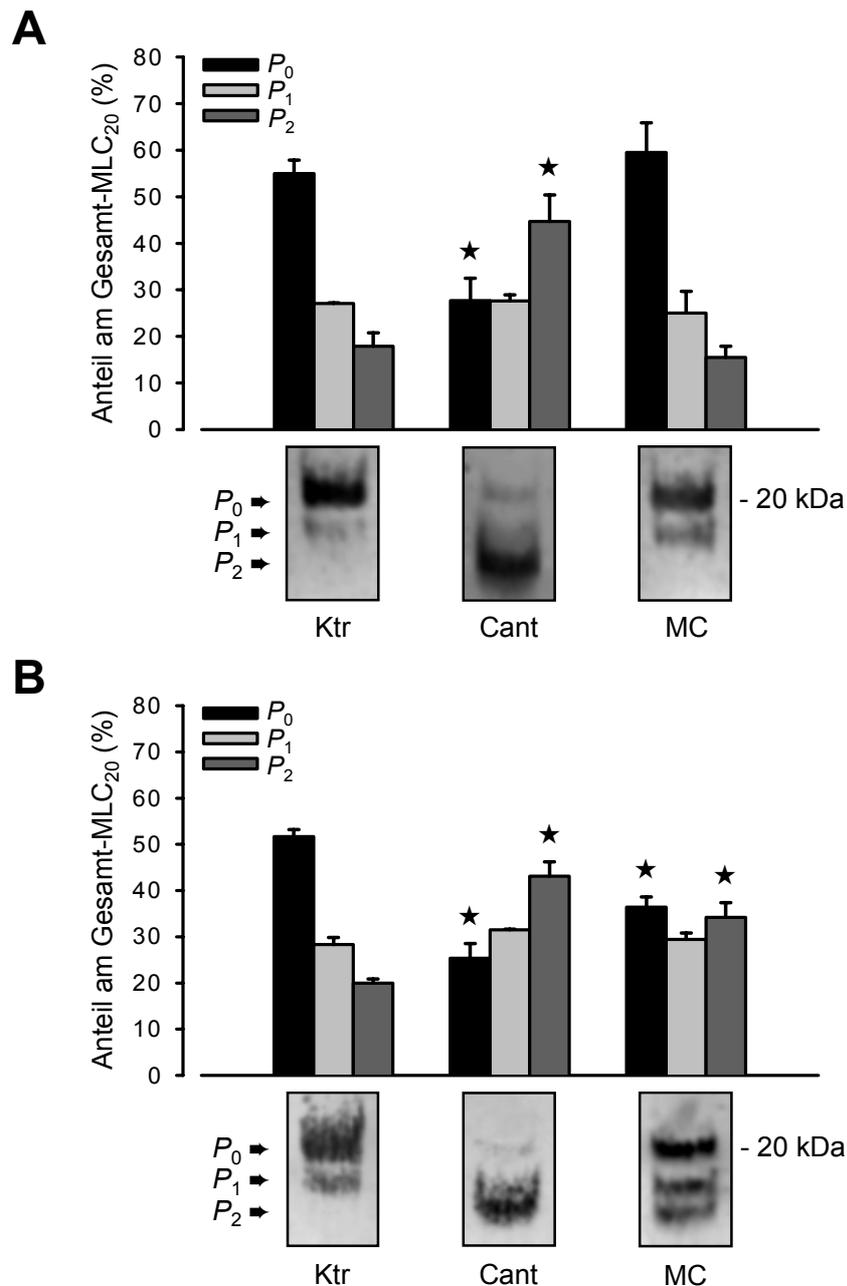
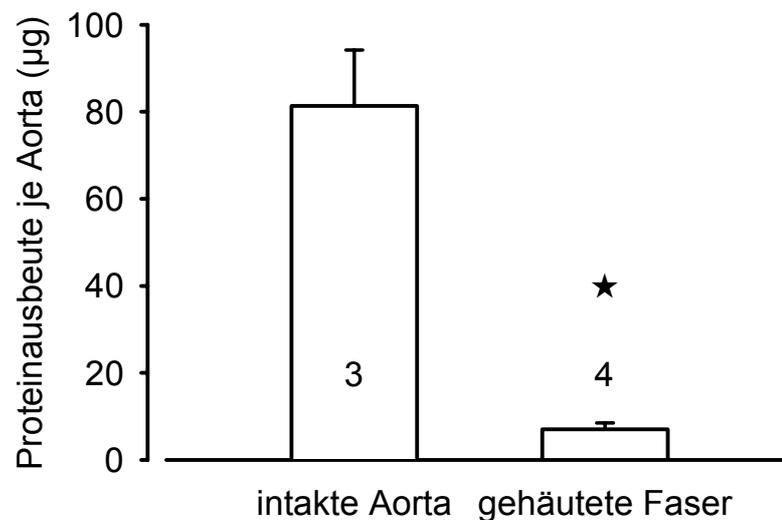


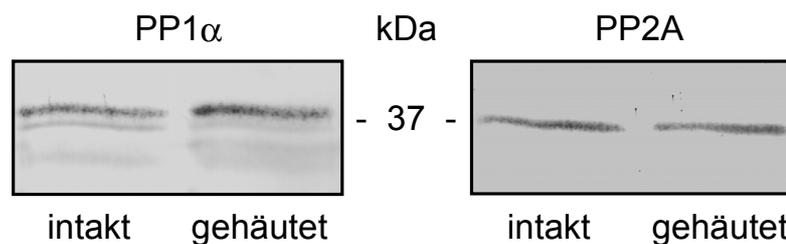
Abb. 4.4.:
MLC₂₀-Phosphorylierung in intakten Ringen und gehäuteten Muskelfasern der Aorta der Maus

(A) Intakte Ringe und (B) gehäutete Muskelfasern der Aorta der Maus wurden mit 100 μM Cantharidin, 1 μM Microcystin LR (intakte Ringe), 0.1 μM Microcystin LR (gehäutete Fasern) oder 1% (V/V) DMSO als Kontrolle behandelt und am Ende des Kontraktionskraftexperiments umgehend eingefroren. Die isolierten Proteine wurden durch eindimensionale Harnstoff-Gelelektrophorese getrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem anti-Myosin (leichte Kette 20 kDa) Antikörper immunologisch nachgewiesen (Detektion AP/ECF). P_0 , P_1 und P_2 stehen jeweils für die unphosphorylierte, einfach und zweifach phosphorylierte MLC₂₀-Form. Je Versuchsansatz wurden 3-4 unabhängige Experimente durchgeführt (n = 3-4). Die Sterne kennzeichnen signifikante Veränderungen gegenüber der jeweiligen MLC₂₀-Form im Kontrollexperiment (★, p < 0.05).

Agenzien kam es zu einer Verschiebung des Verhältnisses der MLC₂₀-Formen hin zu schneller migrierenden MLC₂₀-Formen. Cantharidin führte zu einer Abnahme der MLC₂₀-Form P_0 von $51.7 \pm 1.5\%$ auf $25.4 \pm 43.2\%$ und der Anteil der MLC₂₀-Form P_2 nahm von $20.0 \pm 0.9\%$ auf $43.1 \pm 3.1\%$ zu ($n = 4$; $p < 0.05$ vs. Ktr). Entsprechende Veränderungen wurden unter der Behandlung mit Microcystin LR beobachtet; sie waren jedoch von geringerem Ausmaß: P_0 MC $26.4 \pm 2.2\%$, P_2 MC $34.2 \pm 3.2\%$ ($n = 3-4$; $p < 0.05$ vs. Ktr).

A

★ $p < 0.05$ vs. intakte Aorta

B**Abb. 4.5.:**

Immunologischer Nachweis der PP1 α und PP2A in intakten Ringen und gehäuteten Muskelfasern der Aorta der Maus

Äquivalente Gewebemengen von intakten Aortenringen und gehäuteten Muskelfasern der Aorta der Maus wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet. (A) Der Gesamtproteingehalt je Probe wurde ermittelt. (B) Je Spur wurden 16 μg Gesamtprotein von intakten Ringen oder gehäuteten Fasern geladen und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit anti-PP1 α und anti-PP2A Antikörpern immunologisch nachgewiesen (Detektion AP/ECF).

4.1.4. Immunologischer Nachweis der Proteinphosphatasen in intakten Gefäßringen und gehäuteten Gefäßmuskelfasern

Cantharidin inhibiert die PP2A potenter als die PP1, wohingegen Microcystin LR ein relativ unselektiver Hemmstoff der Proteinphosphatasen ist (s. 1.2.2.). Das unterschiedliche Verhalten von Cantharidin in intakten Gefäßringen im Vergleich zu gehäuteten Gefäßmuskelstreifen könnte auf einer Veränderung des Verhältnisses der Proteinphosphatasen zueinander beruhen. Um beurteilen zu können, ob es bei der Permeabilisierung der Gefäßmuskelfasern mit Triton X-100 zu einem Verlust der Proteinphosphatasen kommt oder sich ihr Verhältnis zueinander ändert, wurde die Expression der PP1 α und PP2A untersucht. Aus äquivalenten Gewebemengen intakter Gefäßringe und gehäuteter Gefäßmuskelfasern wurden, wie unter 3.4.1. beschrieben, die Proteine isoliert. Bei der Quantifizierung zeigte sich eine Abnahme des Proteingehalts in gehäuteten Gefäßmuskelfasern um ca. 90% (Abb. 4.5.A; $81.3 \pm 12.9 \mu\text{g/Aorta}$ versus $7.0 \pm 1.5 \mu\text{g/Aorta}$). Dennoch war, wenn gleiche Mengen Protein in der Western Blot Analyse untersucht wurden, die relative Expression von PP1 α und PP2A in intakten und gehäuteten Präparationen der Aorta vergleichbar (Abb. 4.5.B).

4.2. Expression einer His₆-markierten PP1 α im Baculovirussystem

Die unter 4.1. beschriebenen Ergebnisse zeigten eine mögliche Bedeutung der PPs für die glattmuskuläre Kontraktion auf. Die Funktion der PPs wurde dabei durch eine Hemmung ihrer Aktivität charakterisiert. Es konnte nicht zwischen den unterschiedlichen PPs differenziert werden.

In einem nächsten Schritt sollte die Frage untersucht werden, wie sich die Steigerung der Phosphataseaktivität einzelner PPs in diesem System auf die Kontraktionskraft auswirkt. Zu diesem Zweck sollten die PPs dem System exogen zugeführt werden. Daß es möglich ist, große hydrophile Makromoleküle wie Proteine in mit Triton X-100 gehäutete Fasern (gehäutete Pfortader des Kaninchens) einzuführen, war aus der Literatur bekannt (IgG (150 kDa); Iizuka et al. 1994). Erste Versuche mit nativer aus der Blase des Schweins isolierter PP1 sind beschrieben (Gailly et al. 1996). Die aus natürlichen Quellen zu isolierenden Proteinmengen sind jedoch gering ($< 1 \text{ mg PP}$ aus der Skelettmuskulatur von 4-6 Kaninchen; Zhang et al. 1992). Um für systematische Untersuchungen ausreichende Mengen an PPs definierter PP-Klasse zu erhalten und später die Option der Mutationsanalyse zu haben, sollte daher die PP1 α in einem Expressionssystem erzeugt werden. Bisher wurde von der

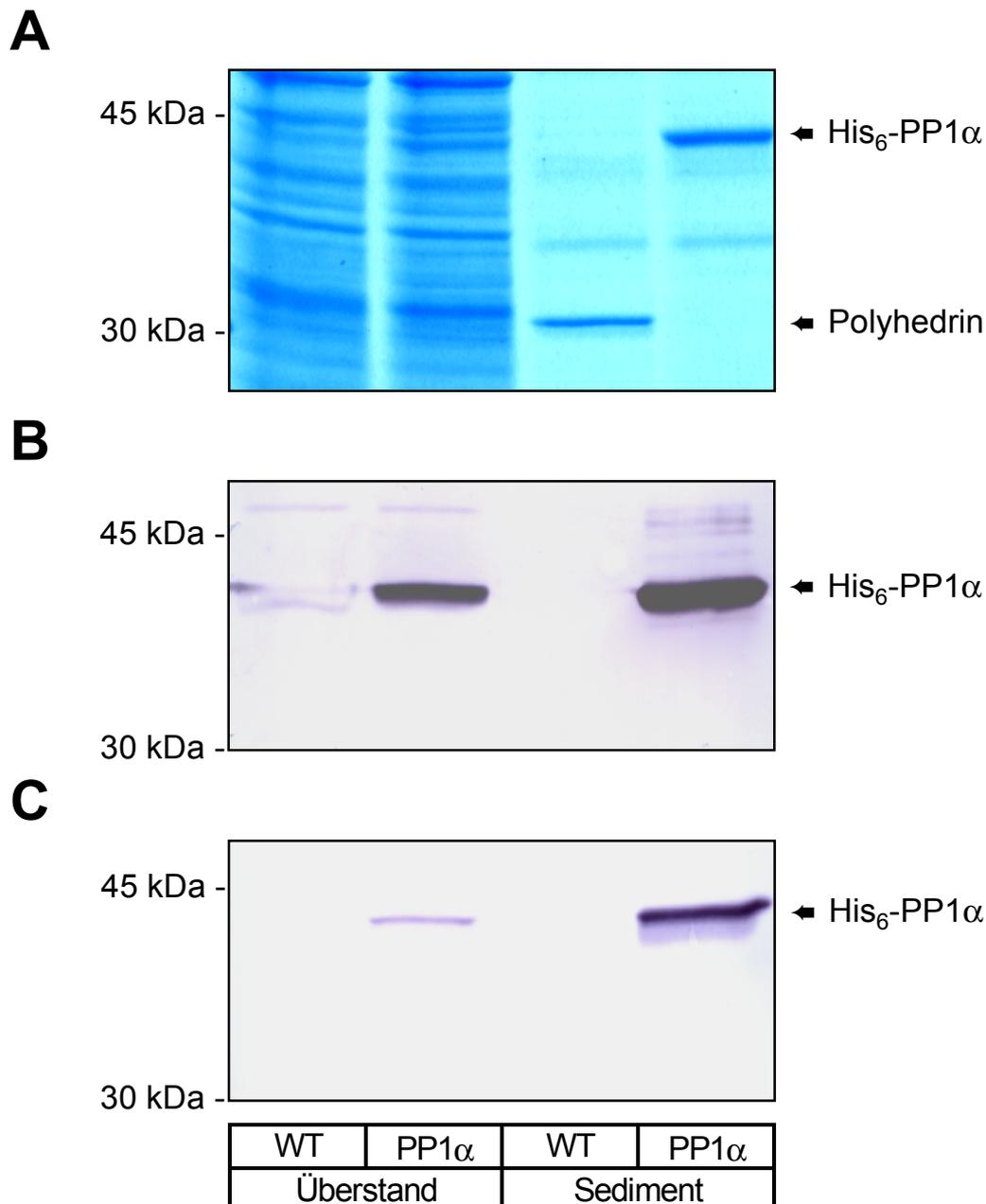
Expression der PP1 α sowie von PP1 α -Mutationen in *E. coli* (z.B.: Alessi et al. 1993, Connor et al. 1999, Huang et al. 1997, Zhang et al. 1992, Zhang et al. 1996) und in Insektenzellen (Berndt und Cohen 1990) berichtet.

Die Expression der PP1 α in *E. coli* bietet im Vergleich zur Expression in Insektenzellen den Vorteil, daß die Proteinphosphatase in diesem System in löslicher Form exprimiert wird. Gleichwohl unterscheidet sich die PP1 α aus *E. coli* in wichtigen Eigenschaften von der nativen PP1: ihre Aktivität ist Mn²⁺-abhängig, sie dephosphoryliert phosphotyrosinhaltige Substrate und ist relativ unsensitiv gegenüber Hemmung durch phospho-DARPP-32 und phospho-I₁ (Alessi et al. 1993, Endo et al. 1997, MacKintosh et al. 1996). In Sf21-Insektenzellen hingegen wird die PP1 α (Sf21 PP1) zu 95% als unlösliches Aggregat exprimiert. Das unlösliche Enzym läßt sich jedoch zu einer von der nativen PP1 nicht unterscheidbaren Spezies reaktivieren (Berndt und Cohen 1990). Aus diesem Grund wurde der Expression in Sf21-Insektenzellen der Vorzug gegeben (zum Baculovirusexpressionssystem s. Einleitung zu 3.8.).

Um die Isolierung und Aufreinigung der rekombinanten PP1 α zu erleichtern sollte das Enzym mit einer N-terminalen His₆-Sequenz versehen werden, welche die Isolierung über Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht. Weiterhin eröffnete die His₆-Markierung die Möglichkeiten der Differenzierung zwischen rekombinanter und nativer Proteinphosphatase der Insektenzellen und der Verbesserung der Löslichkeit des Enzyms durch Einführung weiterer hydrophiler Aminosäuren. Die His₆-Sequenz sollte über eine Thrombinerkennungssequenz nachträglich abspaltbar sein.

4.2.1. Expression der His₆-PP1 α in Sf21-Insektenzellen

Wie unter Material und Methoden (s. 3.8.) beschrieben, wurde ein rekombinanter Baculovirus generiert, in dessen Genom die codierende Sequenz der PP1 α der Ratte anstelle des endogenen Polyhedrin-Gens integriert war. Am 5'-Ende wurde der PP1 α -Sequenz ein DNA-Segment vorangestellt, welches zur Expression der PP1 α als Fusionsprotein mit einer N-terminalen His₆-Sequenz (s. Abb. 3.1.) führen sollte. Die Integrität der Sequenz konnte durch Sequenzierung bestätigt werden.

**Abb. 4.6.:****Expression der His₆-markierten PP1 α in Insektenzellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren**

Insektenzellen wurden mit rekombinantem Baculovirus für His₆-markierte PP1 α (PP1 α) oder Wildtyp-Baculovirus (WT) infiziert. Die infizierten Zellen wurden homogenisiert und zentrifugiert. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand enthielt alle löslichen, das Sediment alle unlöslichen Proteine. **(A)** Photographie eines mit Coomassie-Blau gefärbten Proteingels. Je Spur wurden 50 μ g Protein des Überstandes und 5 μ g des Sediments aufgetragen. **(B)** und **(C)** Photographien der Nitrocellulosemembranen nach dem immunologischen Nachweis (Detektion AP/NBT/BCIP) der PP1 α (anti-PP1 α) sowie der Histidin-Erkennungssequenz (anti-His₄). Je Spur wurden 20 μ g Protein des Überstandes und 2 μ g des Sediments aufgetragen.

Zur Untersuchung der Expression der His₆-markierten PP1 α (His₆-PP1 α) wurden Sf21-Insektenzellen mit rekombinantem His₆-PP1 α -Baculovirus und Wildtyp-Baculovirus als Kontrolle mit einer MOI von sechs infiziert. Die Zellen wurden 50 h p. i. geerntet, lysiert und zentrifugiert. Der Überstand und das Sediment wurden durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf Proteinebene untersucht. Bereits in der Coomassie-Färbung (Abb. 4.6.A) konnte im Sediment von mit rekombinantem Baculovirus infizierten Zellen ein deutliches Signal einer korrespondierenden Größe von 42 kDa detektiert werden. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der His₆-PP1 α , da die native PP1 in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 37 kDa zeigt (Berndt und Cohen 1990, Zhang et al. 1992) und für die fusionierte N-terminale Sequenz ein Molekulargewicht von 5.2 kDa kalkuliert wurde. Im Sediment Wildtyp-Baculovirus infizierter Zellen zeigte sich kein Signal dieser Größe. In diesen Präparationen war hingegen ein eindeutiges Signal bei 31 kDa zu detektieren, welches dem Gewicht des Polyhedrins entspricht (Berndt und Cohen 1990, Fraser 1992). Das Polyhedrin-Signal war, wie erwartet, nicht im Sediment von mit His₆-PP1 α -Baculovirus infizierten Zellen zu finden.

Das Protein mit dem Molekulargewicht von 42 kDa konnte sowohl im Überstand als auch im Sediment mit einem Antikörper gegen PP1 α spezifisch identifiziert werden (Abb. 4.6.B). Der verwendete Antikörper ist gegen den C-Terminus (Aminosäuren 316-330) des Enzyms gerichtet und nach Aussage des Herstellers spezifisch für die PP1-Isoform α . Er zeigt keine Kreuzreaktion mit PP2A oder anderen PPs. Wildtyp-infizierte Insektenzellen zeigten keine immunoreaktiven Proteine. Darüber hinaus zeigte ein gegen eine His₄-Sequenz gerichteter Antikörper ebenfalls sowohl im Überstand als auch im Sediment bei 42 kDa ein einzelnes, spezifisches Signal (Abb. 4.6.C). So wurde das exprimierte Protein der Größe von 42 kDa sowohl vom N-Terminus als auch vom C-Terminus her als die gewünschte His₆-PP1 α identifiziert, und die gesamte Sequenz wurde translatiert. Die Quantifizierung der Signale zeigte, daß ca. 93% des exprimierten Proteins in unlöslicher Form in der Zelle akkumulierte.

Um den optimalen Zeitpunkt für die Ernte der Zellen nach Infektion zu bestimmen, wurde die Expression als Funktion der Zeit untersucht (Abb. 4.7.). Bereits 20 h p. i. konnte His₆-PP1 α mit einem Antikörper gegen PP1 α im Überstand detektiert werden (Abb. 4.7.A). Eine maximale Expression wurde sowohl im Überstand als auch im Sediment (Abb. 4.7.B) bei 40-50 h p. i. erreicht. Dieser Zeitverlauf der Expression entspricht dem des Polyhedrins im Wildtyp-Virus, bei dem eine Expression ab 20 h p. i. beobachtet wurde, die ihr Maximum zwischen 36 und 48 h p. i. erreichte (Fraser

1992). Im weiteren wurden die Insektenzellen 45 h p. i. geerntet. Eine MOI von drei zeigte sich im Vergleich zu einer MOI von sechs als äquieffektiv. Die Viruskonzentration wurde in den nachfolgenden Experimenten dementsprechend abgesenkt.

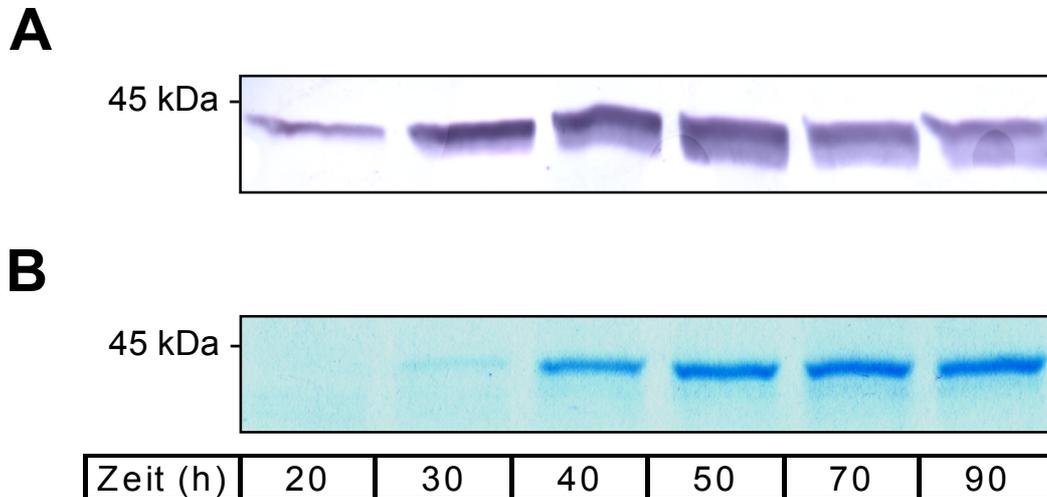


Abb. 4.7.:

Expression rekombinanter His₆-PP1 α in Insektenzellen in Abhängigkeit von der Infektionszeit

Insektenzellen wurden mit rekombinantem Baculovirus für His₆-PP1 α infiziert. Die infizierten Zellen wurden 20, 30, 40, 50, 70 und 90 h nach der Infektion geerntet, homogenisiert und zentrifugiert. **(A)** Photographie der Nitrocellulosemembran nach dem immunologischen Nachweis (Detektion AP/NBT/BCIP) der His₆-PP1 α (anti-PP1 α) in den nach Zentrifugation erhaltenen Überständen. Je Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. **(B)** Photographie eines mit Coomassie-Blau gefärbten Proteingels der nach Zentrifugation erhaltenen unlöslichen Sedimente. Je Spur wurden 3 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

Versuche eine His₆-PP2A in Sf21-Zellen zu exprimieren (Aleth 2002), hatten gezeigt, daß auch bei dieser PP der Großteil des Enzyms in unlöslicher Form exprimiert wurde. Experimente, den Anteil an löslicher His₆-PP2A durch die Verwendung eines schwächeren Promotors oder durch Expression als Sekretionsprotein zu steigern, brachten in diesem Fall nicht den erhofften Erfolg. Aus diesen Erfahrungen mit der His₆-PP2A heraus und der in der Literatur (Berndt und Cohen 1990) beschriebenen Option, die unlösliche Sf21 PP1 zu renaturieren, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf den unlöslichen Anteil der Sf21 His-PP1. Darüber hinaus erleichterte die ansonsten in der präparativen Proteinbiochemie unerwünschte Expression unlöslicher Proteine in diesem speziellen Fall die spätere Aufreinigung des Enzyms, da das Sediment bereits zu einem überwiegenden Anteil aus His₆-PP1 α bestand (Abb. 4.6.A; vgl. PP1 α Überstand vs. PP1 α Sediment).

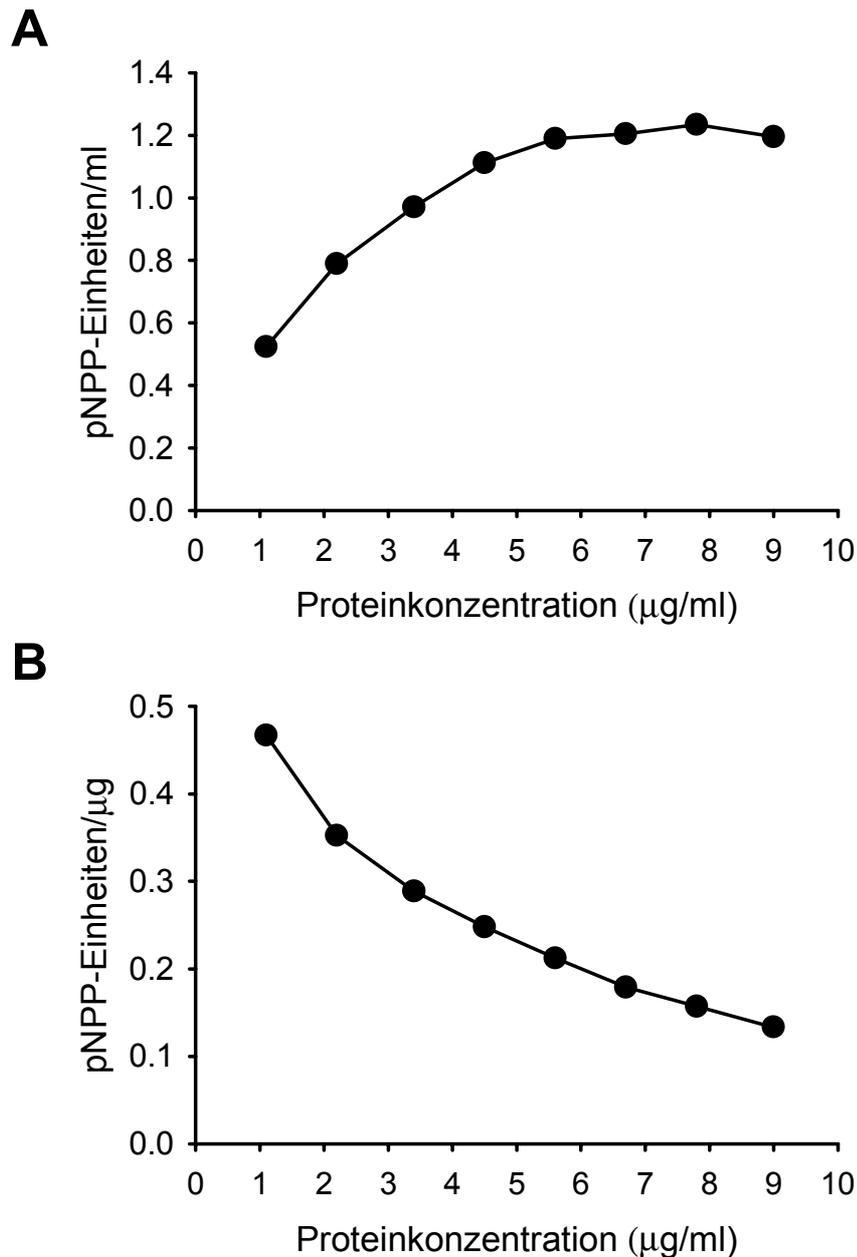


Abb. 4.8.:
Reaktivierbarkeit der His₆-PP1 α aus Guanidiniumlösung in Abhängigkeit von der verwendeten Proteinkonzentration

Insektenzellen wurden mit rekombinantem Baculovirus für His₆-PP1 α infiziert. Die infizierten Zellen wurden homogenisiert und zentrifugiert. Die im Sediment enthaltenen unlöslichen Proteine wurden in 6 M Guanidinium-HCl gelöst. Steigende Proteinmengen wurden durch Zugabe von Renaturierungslösung renaturiert. Die Phosphataseaktivität wurde im pNPP-Assay ermittelt. Abszisse: Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ nach dem Renaturierungsschritt. **(A)** Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration, dargestellt als pNPP-Einheiten/ml Renaturierungslösung. **(B)** Spezifische Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration, dargestellt als pNPP-Einheiten/ μg Protein.

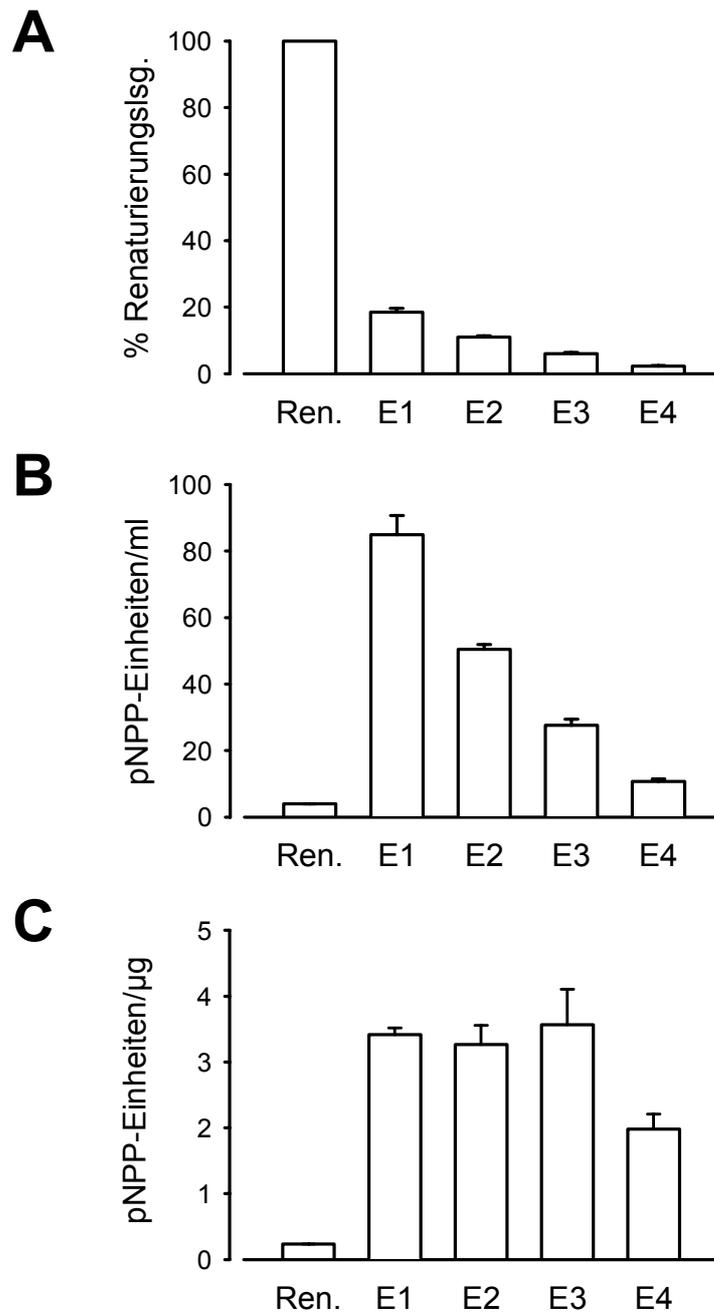
4.2.2. Renaturierung der unlöslichen Sf21 His-PP1

Die mit His₆-PP1 α -Baculovirus infizierten Sf21-Zellen wurden geerntet, lysiert und das Sediment ein weiteres Mal gewaschen. Durch die Verwendung eines Homogenisations-/Waschpuffers, der 1% Triton X-100 und hohe Salzkonzentrationen (NaCl 0.8 M) enthielt, konnte ein Großteil kontaminierender Proteine bereits in diesem Stadium entfernt werden. Das die unlösliche Sf21 His-PP1 enthaltende Sediment konnte unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Guanidiniumpuffer nahezu quantitativ in Lösung gebracht werden.

Für die Reaktivierung der gelösten His₆-PP1 α war die Gegenwart von Manganionen (1 mM) und eine hohe und schnelle Verdünnung der Lösung essentiell. Ohne die Substitution von Manganionen blieb eine Reaktivierung aus. Je mehr Protein in die Reaktion eingesetzt wurde, um so mehr absolute Phosphataseaktivität konnte erhalten werden (Abb. 4.8.A). Umgekehrt nahm jedoch die spezifische Aktivität der Präparation mit höheren Proteinkonzentrationen ab, das heißt, ein zunehmender Anteil an Phosphatase präzipitierte vermutlich erneut und blieb inaktiv (Abb. 4.8.B). 2-Mercaptoethanol und hohe Salzkonzentrationen waren ebenfalls entscheidend für eine erfolgreiche Reaktivierung des Enzyms, blieben jedoch ohne Zugabe von Mangan wirkungslos. Der Effekt der NaCl-Zugabe war konzentrationsabhängig, mit einem optimalen Konzentrationsbereich von 0.4-1.0 M NaCl. Des Weiteren wurden dem Renaturierungspuffer 0.02% Tween-20 zugesetzt, um Aktivitätsverluste durch Proteinadsorption an Gefäßoberflächen zu verhindern. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die unter denaturierenden Bedingungen gelöste His₆-PP1 α unter Minimierung intermolekularer Wechselwirkungen (schnelle, starke Verdünnung bei hoher Salzkonzentration) sowie essentieller Mangansubstitution reaktivierbar war.

4.2.3. Aufreinigung und Konzentrierung der renaturierten Sf21 His-PP1 mittels Metallionen-Affinitätschromatographie

Die His₆-PP1 α lag nach der Reaktivierung in einem für die weitere Verwendung zu großen Volumen vor und enthielt, auch wenn sie Hauptbestandteil des Sediments war, weitere Proteine. Um diesen Einschränkungen entgegenzutreten, sollte die reaktivierte His₆-PP1 α über ihre Histidin-Erkennungssequenz mit Hilfe der Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) einerseits angereichert und andererseits aufgereinigt werden. Es wurde ein Chelatkomplex (Talon-Harz) verwendet, der für die koordinative Bindung des His₆-markierten Enzyms mit Co²⁺ dotiert war (s. 3.8.8.). Die Elution erfolgte mit 150 mM Imidazolösung in vier Fraktionen.

**Abb. 4.9.:****Aufreinigung und Anreicherung der renaturierten His₆-PP1 α mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Unlösliche His₆-PP1 α aus Insektenzellen wurde in Guanidinium-HCl gelöst und durch Zugabe von Renaturierungslösung renaturiert (Ren.). Die Histidin-Erkennungssequenz ermöglichte die Aufreinigung mittels IMAC. Die Elution erfolgte mit 150 mM Imidazolösung in vier Fraktionen (E1 - E4). Die Phosphataseaktivität wurde im pNPP-Assay ermittelt (Mn²⁺-Endkonzentration 0.33 mM). In die Auswertung gingen drei unabhängige Elutionsversuche ein. **(A)** Absolute Phosphataseaktivität als Maß für die Wiederfindung, dargestellt als Prozent der im Renaturierungsschritt erhaltenen Aktivität. **(B)** Volumenaktivität als Maß für die Anreicherung, dargestellt als pNPP-Einheiten je ml Lösungsvolumen. **(C)** Spezifische Phosphataseaktivität als Maß für die Reinheit der Proteinpräparation, dargestellt als pNPP-Einheiten je μ g Protein.

Insgesamt konnten $38 \pm 1\%$ (in Einzelfällen auch bis zu 50%) der eingesetzten Phosphataseaktivität nach Bindung an das Harz erneut eluiert werden, wobei $49 \pm 2\%$ davon bereits mit der ersten Fraktion eluiert wurden (Abb. 4.9.A, $n = 3$). Die erste Fraktion zeigte eine Volumenaktivität von 85.0 ± 5.7 pNPP-Einheiten/ml, was einer Anreicherung gegenüber der Renaturierungslösung (4.0 ± 0.1 pNPP-Einheiten/ml) um mehr als das 21fache entsprach (Abb. 4.9.B, $n = 3$). Die spezifische Phosphataseaktivität als Maß für die Reinheit der Proteinpräparation lag in den ersten drei Fraktionen durchschnittlich bei 3.42 ± 0.09 pNPP-Einheiten/ μg Protein (Abb. 4.9.C, $n = 3$), was eine Aufreinigung im Vergleich zur eingesetzten Renaturierungslösung (0.23 ± 0.00 pNPP-Einheiten/ μg Protein) um den Faktor 17 darstellte. Erst wieder in der vierten Fraktion nahm die spezifische Aktivität signifikant ($p < 0.05$) um $41.6 \pm 8.2\%$ auf 1.98 ± 0.23 pNPP-Einheiten/ μg Protein ab.

4.2.4. Charakterisierung der renaturierten und gereinigten Sf21 His-PP1

Um die isolierte PP1 α weiter zu charakterisieren, sollte der inhibitorische Effekt von Cantharidin (s. 1.2.2.) auf die PP-Aktivität des Enzyms untersucht werden. Dazu wurde gereinigte His₆-PP1 α mit steigenden Konzentrationen Cantharidin für 20 min bei 30°C vorinkubiert und anschließend die PP-Aktivität im pNPP-Assay ermittelt (Abb. 4.10., $n = 3$). Die PP-Aktivität war konzentrationsabhängig hemmbar. Ein erster inhibitorischer Effekt zeigte sich bei einer Cantharidinkonzentration von 100 nM, mit 10 μM Cantharidin konnte die PP-Aktivität nahezu vollständig gehemmt werden und der IC₅₀-Wert lag bei 450 nM Cantharidin. In der Literatur wird für Cantharidin gegenüber nativer PP1 ein IC₅₀-Wert von 500 nM beschrieben. Im Vergleich dazu ist Cantharidin gegenüber PP2A potenter und zeigt einen IC₅₀-Wert von 40 nM (s. 1.2.2.).

Gemäß dem ursprünglichen Ziel wurde die Enzympräparation mit Relaxationslösung (R-Lösung, s. 7.1.) verdünnt, um ihre Wirkung auf gehäutete Gefäßmuskelfasern untersuchen zu können. Dabei zeigte sich ein vollständiger Verlust der Phosphataseaktivität im Organbad. In weiteren Experimenten konnte beobachtet werden, daß die Verdünnung mit hochohmigem Wasser infolge der Reduktion der Konzentrationen an Mn²⁺ und NaCl bereits zu einer starken Abnahme der Phosphataseaktivität führte. Eine vollständige Entfernung von Mn²⁺ durch Chelatbildner (R-Lösung: 5.0 mM EGTA) führte zum Verlust jeglicher Aktivität. Umgekehrt konnte die Phosphataseaktivität durch Zugabe von Mn²⁺ weiter gesteigert werden (Abb. 4.11.).

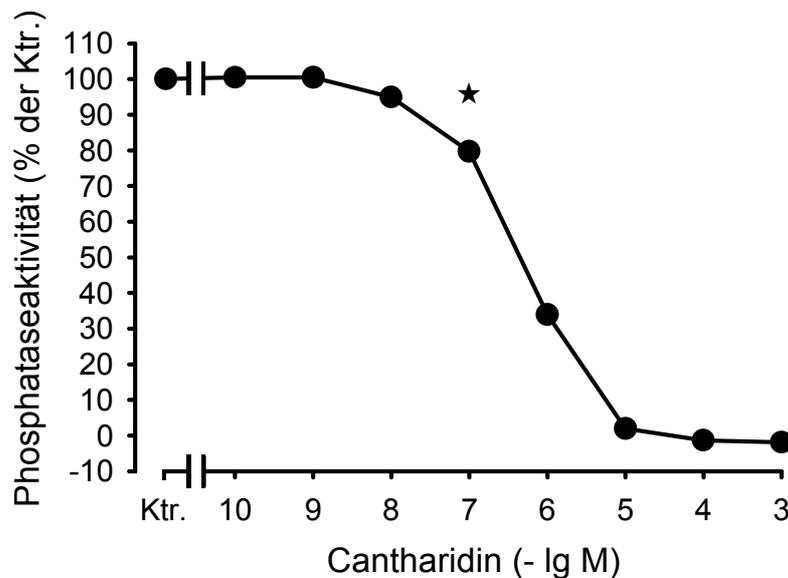


Abb. 4.10.:
Hemmung der Phosphataseaktivität renaturierter His₆-PP1 α durch Cantharidin

Renaturierte und gereinigte His₆-PP1 α aus Insektenzellen wurde mit steigenden Konzentrationen Cantharidin vorinkubiert. Anschließend wurde die Phosphataseaktivität im pNPP-Assay ermittelt. Der Stern kennzeichnet den ersten signifikanten Unterschied (★, $p < 0.05$, $n = 3$) vs. Lösungsmittelkontrolle (Ktr.). Streuung kleiner als die Symbole. Ordinate: Phosphataseaktivität, dargestellt als Prozent der Kontrolle.

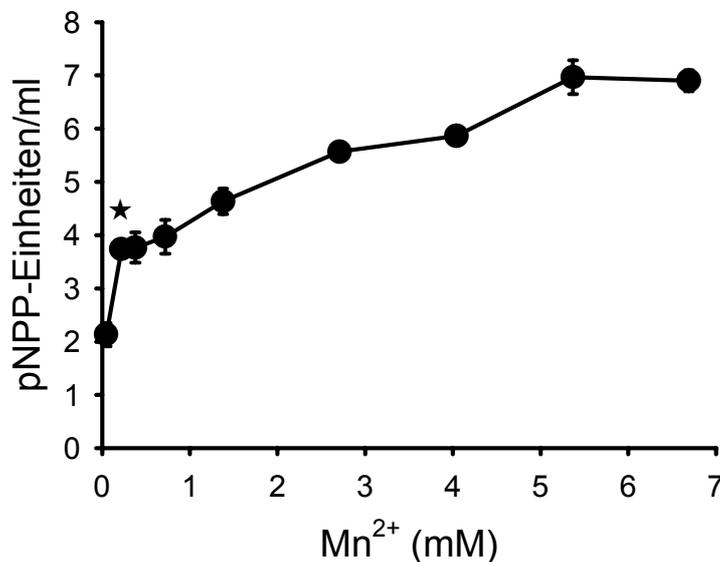


Abb. 4.11.:
Abhängigkeit der Phosphataseaktivität der His₆-PP1 α von der Mangan-
konzentration

Renaturierte und gereinigte His₆-PP1 α aus Insektenzellen wurde mit Manganlösungen steigender Konzentration verdünnt. Anschließend wurde die Phosphataseaktivität im pNPP-Assay ermittelt. Die Endkonzentrationen im Assay umfaßten 0.05 - 6.7 mM Mn²⁺. Der Stern kennzeichnet den ersten signifikanten Unterschied (★, $p < 0.05$, $n = 3$) vs. 0.05 mM Mn²⁺. Ordinate: Phosphataseaktivität, dargestellt als pNPP-Einheiten/ml.

Aufgrund dieser Einschränkungen konnte die renaturierte Sf21 His-PP1 nicht in Kontraktionskraftexperimenten mit gehäuteten Gefäßmuskelfasern verwendet werden. Eine Substitution von Manganionen zum Organbad war nicht möglich: sobald die Kapazität des EGTA's (5.0 mM in R-Lösung) erschöpft war, wurde durch Manganionen eine Erhöhung der Kontraktionskraft ausgelöst (Abb. 4.12.).

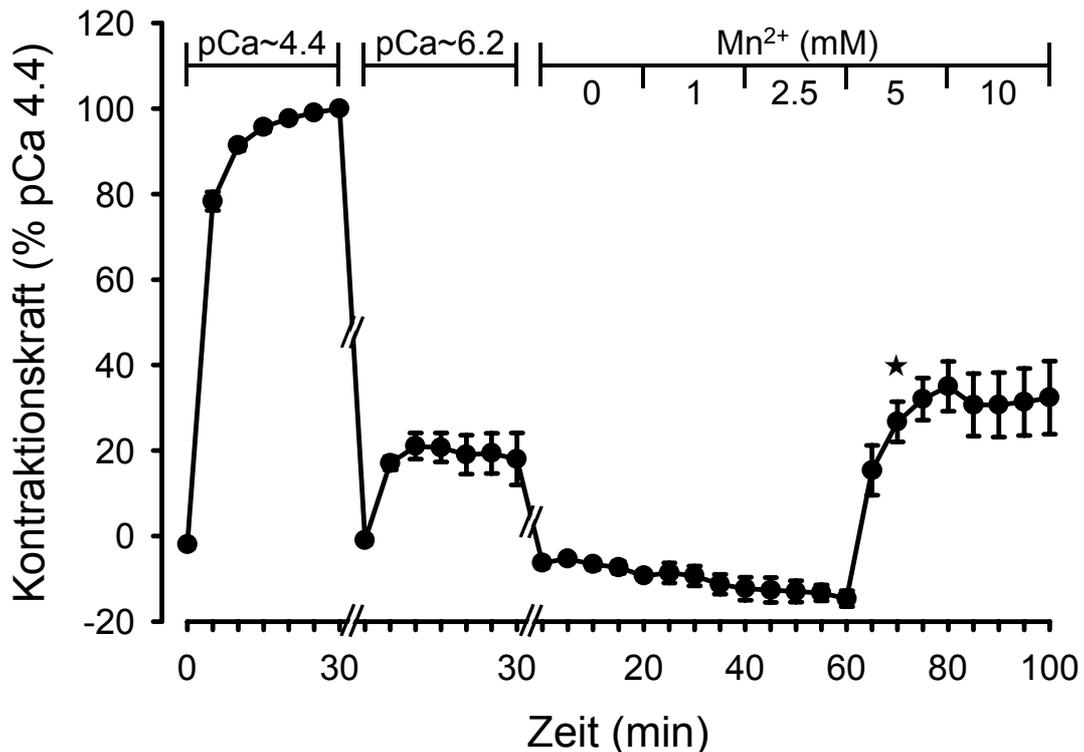


Abb. 4.12.:

Einfluß von Mangan (Mn^{2+}) auf die Kontraktionskraft von gehäuteten Gefäßmuskelfasern der Aorta der Maus

Gehäutete Gefäßmuskelfasern der Aorta der Maus wurden zweimal mit Ca^{2+} (pCa 4.4 und pCa 6.2) vorkontrahiert. Nach erneutem Erreichen der Ausgangslage, erfolgte die Zugabe von steigenden Mengen Mangan (0 - 10 mM $MnCl_2$ in Relaxierungslösung, pCa > 8.0). In die Auswertung gingen drei unabhängige Experimente ein (n = 3). Der Stern kennzeichnet den ersten signifikanten Unterschied vs. 0 min (★, p < 0.05). Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Kontraktionskraft, dargestellt als Prozent der durch pCa 4.4 maximal ausgelösten Kraft.

4.3. Generierung transgener Mäuse zur glattmuskelspezifischen Überexpression der PP1 α

Um die Auswirkungen einer erhöhten Phosphataseaktivität auf das kardiovaskuläre System untersuchen zu können, wurden transgene Mäuse generiert. Bei den Tieren sollte eine Überexpression der Proteinphosphatase 1 α (PP1 α) in der vaskulären glatten Muskulatur erreicht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Expressionskassette kloniert, in der die codierende Sequenz der PP1 α der Ratte unter der Kontrolle des murinen minimalen Promotorfragments des SM22 α -Gens stand (Li et al. 1996b, Moessler et al. 1996, Solway et al. 1995). Der SM22-Promotor ist während der Embryogenese (ab Tag E8.5) zunächst in kardialer, skelettaler und arterieller glatter Muskulatur transkriptional aktiv. Die Promotoraktivität wird anschließend ab dem Tag E14.5 der Embryogenese bis in das Erwachsenenalter hinein spezifisch für die arterielle glatte Muskulatur (Li et al. 1996b). Die DNA-Sequenz der Expressionskassette wurde durch Sequenzierung überprüft und bestätigt.

4.3.1. Charakterisierung des Genotyps

Die Fremd-DNA wurde durch Mikroinjektion der Expressionskassette in befruchtete Eizellen zur Integration in das Mausgenom gebracht (s. 3.9.1.). Nach drei Injektionszyklen mit insgesamt 28 Jungtieren, konnten zwei genetisch veränderte Mäuse (F0) identifiziert und als transgene (TG) Mauslinien etabliert werden (TG 1 und TG 2). Das Transgen wurde geschlechtsunabhängig und nach den Mendel-Gesetzen stabil weitervererbt. Der Nachweis des Transgens erfolgte aus genomischer DNA mit Hilfe von PCR- und Southern Blot-Technik (s. 3.9.2.).

Bei der Genotypisierung mit Hilfe der PCR-Technik konnte das Transgen durch Primer, die einerseits im SM22-Promotor (fp) und andererseits in der codierenden Sequenz der PP1 α (rp) banden, spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 4.13.A). In der Agarosegelelektrophorese der PCR-Ansätze wurde in beiden Mauslinien jeweils ein einzelnes DNA-Fragment detektiert, dessen Größe der kalkulierten Länge von 410 bp entsprach. Wildtyp-Mäuse zeigten hingegen keine Signale (Abb. 4.13.C).

Mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten PCR-Sonde konnten im Southern Blot fragmentierter genomischer DNA beider transgener Mauslinien spezifische Signale detektiert werden, wohingegen Wildtyp-Mäuse keine Signale zeigten (Abb. 4.13.B). Die Fragmentierung der genomischen DNA durch die Restriktionsendonuclease

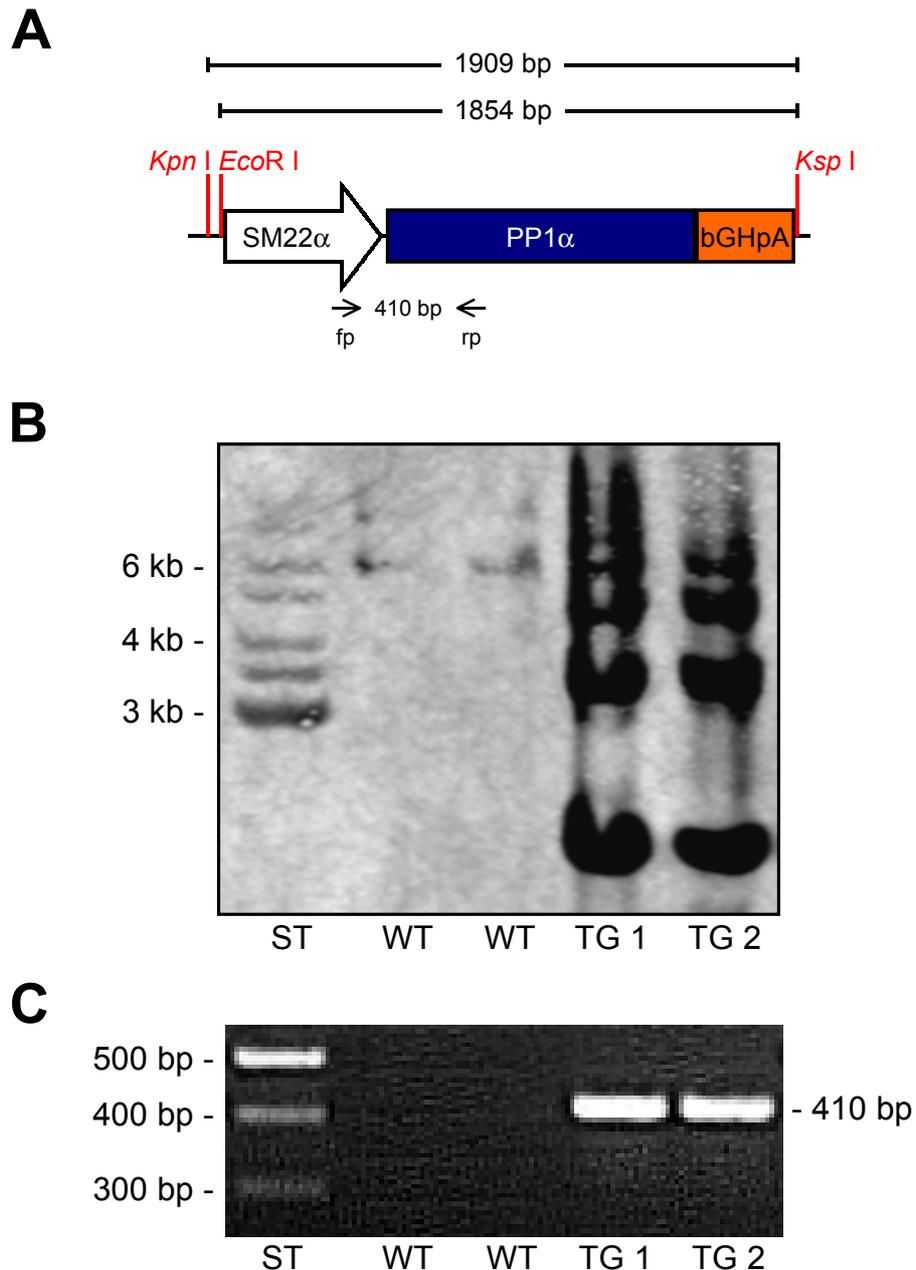


Abb. 4.13.:
Genotypisierung transgener SM22-PP1 α -Mäuse

(A) Schematische Darstellung des SM22-PP1 α -Konstrukts. (B) Photographie eines Southern Blots. Aus der Schwanzspitze der Maus isolierte genomische DNA wurde durch die Restriktionsendonuclease *EcoR I* fragmentiert. Die DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis des Transgens erfolgte mit Hilfe einer PCR-Sonde (siehe schematische Darstellung), die unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem dUTP hergestellt wurde. Zur Detektion wurde alkalische Phosphatase konjugierter anti-Digoxigenin Antikörper und ECF als Fluoreszenzsubstrat verwendet. (C) Nachweis des Transgens durch PCR aus genomischer DNA. bGHpA: bovines Wachstumshormon Polyadenylierungssignal, fp: *forward*-Primer, rp: *reverse*-Primer, ST: DNA-Größenstandard, WT: Wildtyp-Maus, TG 1/TG 2: transgene Mauslinie 1 bzw. 2.

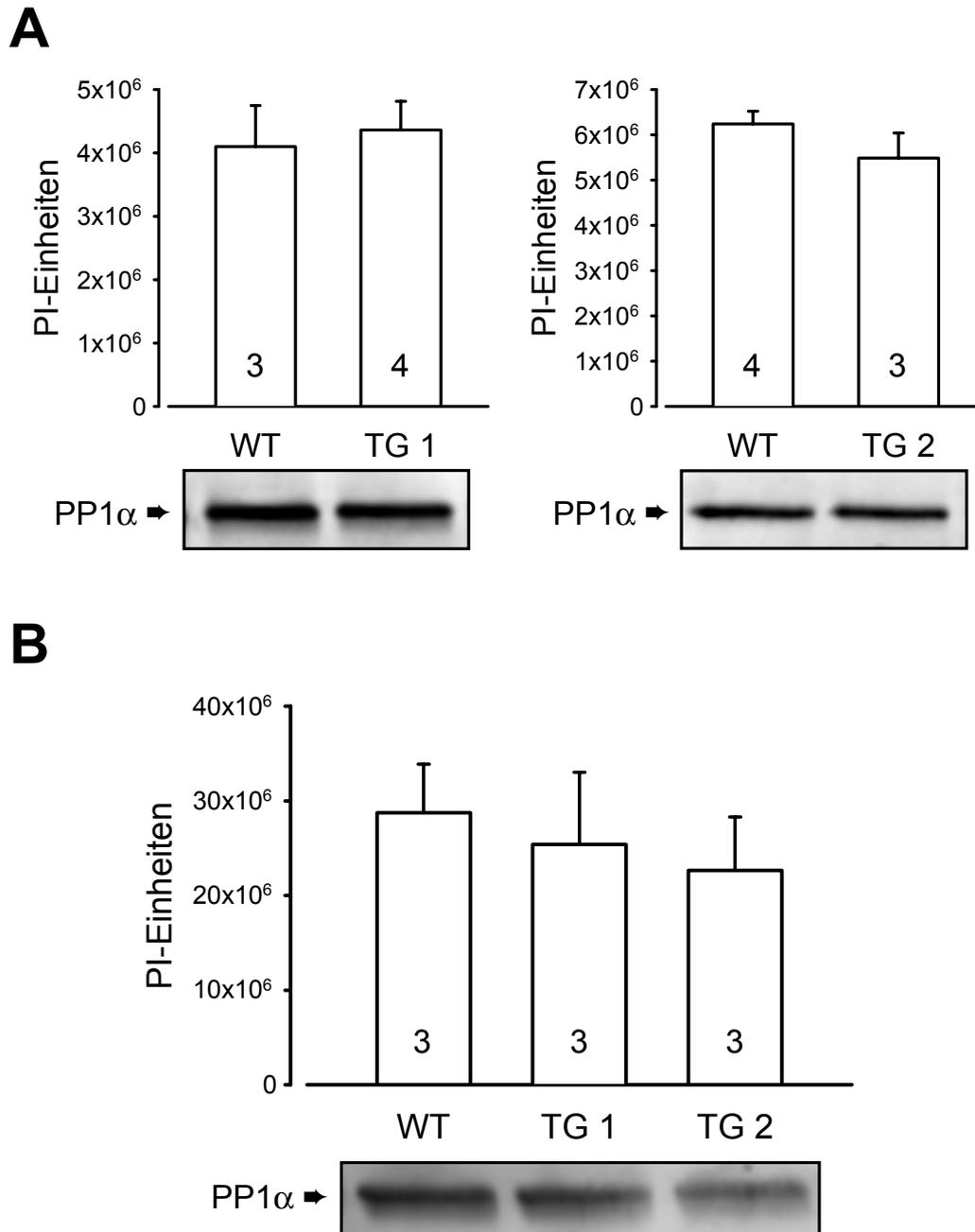


Abb. 4.14.:
Proteinexpression der PP1 α in der Aorta transgener SM22-PP1 α Mäuse

Dargestellt sind die Photographien (repräsentative Versuche; Detektion AP/ECF) sowie die Quantifizierung des immunologischen Nachweises von PP1 α in der Aorta von Wildtyp-Mäusen (WT), transgenen SM22-PP1 α Mäusen der Linie 1 (TG 1) und transgenen SM22-PP1 α Mäusen der Linie 2 (TG 2) im Alter von (A) sechs Wochen und (B) zwölf Wochen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm 860) und der ImageQuant-Software und wurde auf der Ordinate in Phosphorimager-Einheiten (PI-Einheiten) angegeben.

EcoR I, deren Schnittstelle in der Expressionskassette einmal vorhanden war (Abb. 4.13.A), erbrachte im Southern Blot mehrere klar abgrenzbare Signale. Das kleinste detektierte Fragment war kleiner drei Kilobasenpaare und könnte damit der Segmentlänge der Kassette von 1909 bp entsprechen. Das Muster der detektierten Signale war für beide Tierlinien identisch. Wurden Restriktionsendonucleasen für die Fragmentierung verwendet, die keine Schnittstelle in der Expressionskassette besaßen (z.B. *Hind* III, Ergebnisse nicht dargestellt), so konnten in transgenen Tieren nur Fragmente größer zehn Kilobasenpaare detektiert werden, die nicht mehr als Einzelsignale aufgelöst wurden.

4.3.2. Charakterisierung des Phänotyps

Die transgenen Tiere beider Mauslinien zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keinerlei Auffälligkeiten im Verhalten, beim Körpergewicht oder in der Sterblichkeit. Die beiden Tierlinien wurden im Alter von sechs (Abb. 4.14.A) und zwölf Wochen (Abb. 4.14.B) immunologisch charakterisiert. Beim Nachweis der PP1 α in Homogenaten der Aorta von transgenen und Wildtyp-Mäusen (s. 3.4.) konnte in allen Gruppen und Altersklassen ein Signal der Größe von 37 kDa detektiert werden. Dies entsprach dem erwarteten Molekulargewicht der PP1 α (Berndt und Cohen 1990, Zhang et al. 1992). Die PP1 α -Expression war in transgenen und Wildtyp-Tieren nicht signifikant verschieden.

Zusammenfassend konnten zwei Mauslinien etabliert werden, bei denen die vollständige Fremd-DNA-Sequenz stabil in das Genom integriert vorlag, jedoch auf Proteinebene keine Überexpression des Fremdgens erfolgte.

4.4. Generierung rekombinanter Adenoviren zur Expression der PP1 α

4.4.1. Generierung der rekombinanten Adenoviren Ad-PP1 und Ad-His-PP1

Die rekombinanten Adenoviren wurden, wie unter 3.10. beschrieben, in Anlehnung an das Verfahren nach He et al. (1998) generiert. Die PP1 α -Sequenzen wurden in den Transfervektor pAdTrack-CMV inkloniert und in *E. coli* mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) zur homologen Rekombination gebracht. Rekombinationspositive Klone konnten durch PCRs gegen PP1 α - und pAdEasy-Sequenzen sowie *Pac* I-Restriktionsanalyse identifiziert werden. Die rekombinanten adenoviralen Genome enthielten zwei unabhängige Expressionskassetten, in denen die Transkription jeweils unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stand. Die erste Kassette enthielt

die jeweiligen PP1 α -Sequenzen und die zweite Kassette die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter gen (s. Abb. 3.4.). Die Unversehrtheit der Expressionskassetten konnte durch Sequenzierung bestätigt werden.

Es wurden zunächst zwei rekombinante Adenoviren zur Expression der PP1 α generiert (s. Abb. 3.5.). Der eine enthielt die reine codierende Sequenz der PP1 α (Ad-PP1). Der andere, analog der Sf21-His-PP1 (vgl. 3.8. und 4.2.), die N-terminal um die His₆-Sequenz verlängerte codierende Sequenz der PP1 α (Ad-His-PP1). Ziel der Markierung war es, anhand des Größenunterschiedes und der Detektion mit anti-His₄ Antikörpern besser zwischen exogener und endogener PP1 α differenzieren zu können (vgl. 4.2.1.). Auf dem Hintergrund der bisher beobachteten starken Expression der PP1 α in Säugerzellen (vgl. Abb. 4.14.), sollten hierdurch auch kleine Unterschiede im Expressionsniveau und die subzelluläre Lokalisation der über-exprimierten PP1 α besser erfaßt werden.

Nach Transfektion in HEK293-Zellen zeigte ein Großteil der Zellen nach 2-3 Tagen eine grüne Fluoreszenz. Im ersten Infektionszyklus wiesen dagegen nur einige Zellen eine grüne Fluoreszenz auf und der Infektionsverlauf war relativ langsam (4-7 Tage). Mit steigender Anzahl von Infektionszyklen nahm die Geschwindigkeit des Infektionsverlaufs und die Zahl direkt infizierter Zellen stetig zu. Auch wurde die Bildung von Plaques fluoreszierender Zellen in der Umgebung lysierter, infizierter Zellen beobachtet. Das Infektionsverhalten der beiden rekombinanten Virusgenome (Ad-PP1 und Ad-His-PP1) war im Verlauf der Generierung der Viren identisch.

4.4.2. Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren Ad-PP1 und Ad-His-PP1

Zur näheren Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren wurden H9c2-Zellen (s. 3.1.2.) mit einer MOI von 10 bzw. 20 infiziert. Nicht infizierte (NI) und Kontroll-Virus-infizierte (Ad-Ktr.) Zellen dienten als Kontrolle. Alle Virus-behandelten Zellkulturen wiesen im Gegensatz zu nicht infizierten Zellkulturen grün fluoreszierende Zellen auf. Die Zellen wurden nach 48 h p. i. (bzw. in Kultur) geerntet, homogenisiert und auf Protein- und RNA-Ebene charakterisiert.

Proteinexpression

In allen Virus-behandelten Zellpräparationen konnte GFP mit einem anti-GFP Antikörper immunologisch im Western Blot-Verfahren nachgewiesen werden (Proteingröße ca. 28 kDa). Dabei korrelierte das Ausmaß der Expression mit der zur Infektion eingesetzten Virusmenge (MOI 10 und 20). Nicht infizierte Zellen zeigten hingegen kein GFP-Signal (Daten nicht dargestellt).

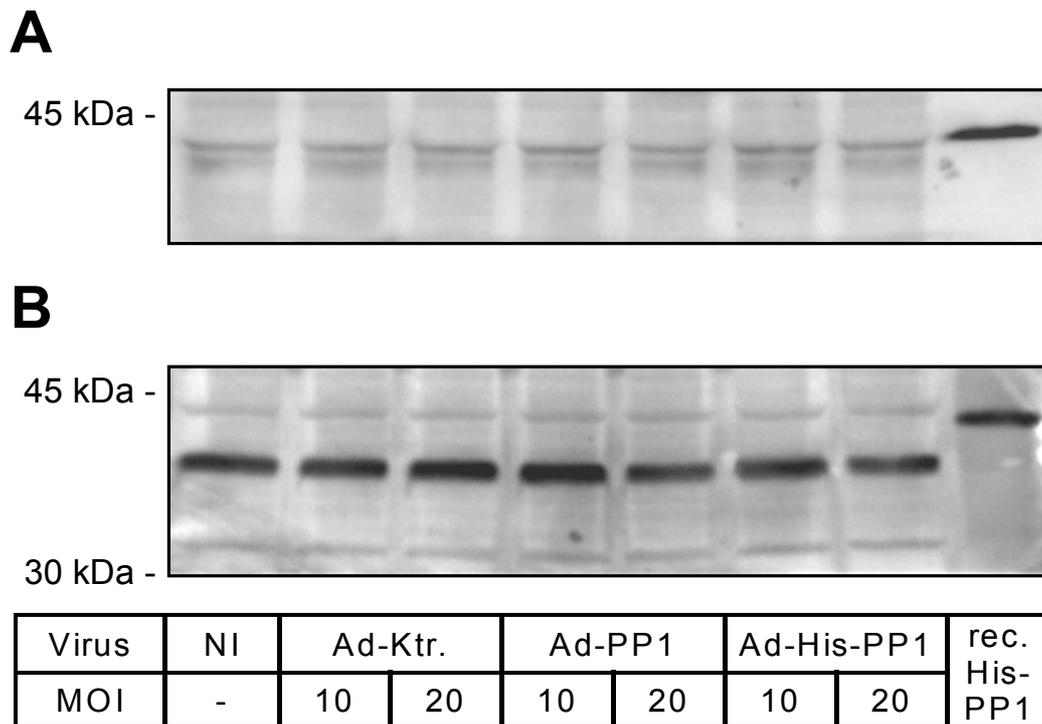


Abb. 4.15.:
Expression der PP1 α in adenoviral infizierten H9c2-Zellen

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr., Ad-PP1 und Ad-His-PP1) für 48 Stunden mit einer MOI von 10 bzw. 20 infiziert. Nicht infizierte Zellen (NI) dienten als zusätzliche Kontrolle. Die Zellen wurden geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 100 μ g Gesamtprotein geladen und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit **(A)** anti-His₄ und **(B)** anti-PP1 α Antikörpern immunologisch nachgewiesen (Detektion AP/ECF). In Insektenzellen generiert rekombinante His₆-PP1 α diente als Positivkontrolle (0.1 μ g Protein/Spur).

Der immunologische Nachweis der PP1 α zeigte ein einzelnes Signal der Größe von 37 kDa, das in allen sieben Zellpräparationen von gleicher Ausprägung war. Auch in Ad-His-PP1-infizierten Zellen konnte kein weiteres Signal identifiziert werden, das entsprechend der rekombinanten His-PP1 aus Insektenzellen bei einer Größe von ca. 42 kDa erwartet wurde (Abb. 4.15.B). Dementsprechend konnte beim

immunologischen Nachweis der His-Markierung in den Zellpräparationen kein Signal detektiert werden, wohingegen die als Positivkontrolle mitgeführte rekombinante His-PP1 reagierte (Abb. 4.15.A). Neben H9c2-Zellen, wurden auch HEK293-Zellen, A7r5-Zellen und neonatale Rattenkardiomyozyten infiziert. In keiner der Zellkulturen konnte jedoch eine Überexpression des PP1 α -Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

RNA-Expression

Um zu überprüfen, ob die fehlende PP1 α -Expression auf einer Störung der Translation oder einer unterbliebenen Transkription beruhte, wurden parallel infizierte H9c2-Zellen (s. o.) auf RNA-Ebene charakterisiert.

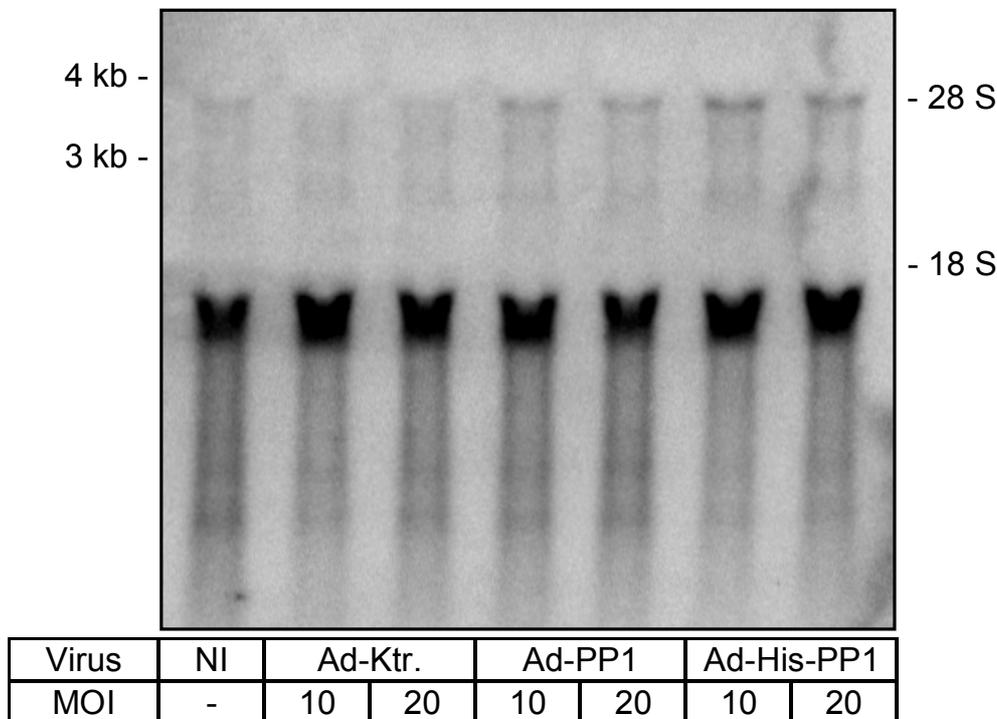


Abb. 4.16.:
RNA-Expression der PP1 α in adenoviral infizierten H9c2-Zellen

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr., Ad-PP1 und Ad-His-PP1) für 48 h mit einer MOI von 10 bzw. 20 infiziert. Die Zellen wurden geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Je Spur wurden 24 μ g Gesamt-RNA geladen, durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die codierende Sequenz der PP1 α wurde denaturiert und mit Zufallshexameren hybridisiert, die als Primer einer DNA-Polymerase (Klenow Fragment) dienen. Die Markierung erfolgte durch Verwendung von [³²P]-markierten Nucleotiden. Die so gewonnene radioaktive DNA-Sonde wurde zur Detektion der PP1 α verwendet. Nicht infizierte Zellen (NI) dienten als zusätzliche Kontrolle. Zum Größenvergleich ist die Lage der rRNA (28 S und 18 S) angegeben.

Bei der Hybridisierung eines Northern Blots mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen die codierende Sequenz der PP1 α wurde in allen Zellpräparationen ein einzelnes Signal kurz unterhalb der 18 S ribosomalen RNA gefunden (Abb. 4.16.). Dieses Signal entspricht dem im Herz (Lüss et al. 2000) und im vaskulären glatten Muskelgewebe (Knapp et al. 1998) gefundenen Signal der endogenen PP1 α -mRNA (PP1 α -mRNA ca. 1.6-1.8 kb; 18 S rRNA ca. 1.9 kb). Weitere Signale oder eine Zunahme der Signalstärke in PP1 α -Virus-infizierten Zellen vs. Ad-Ktr.-infizierten Zellen wurden nicht beobachtet.

Der Einsatz einer radioaktiv markierten Sonde gegen die His₆-Markierungssequenz zeigte im Northern Blot aller Zellpräparationen keinerlei Signale. Ein als Positivkontrolle mitgeführter Dot-Blot von pAdTrack-CMV-His-PP1-Plasmid bewies hingegen die Spezifität und Effektivität der Sonde (Daten nicht dargestellt). Auch in infizierten HEK293- und A7r5-Zellen konnte auf RNA-Ebene keine Überexpression der PP1 α nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

4.4.3. Charakterisierung von pAdEasy-PP1-UTR-Klonen

Da untranslatierte Regionen (UTR) einen großen Einfluß auf die Stabilität und Translation von mRNA haben können, sollte ein weiterer PP1 α -Adenovirus mit zusätzlichen UTR-Sequenzen generiert werden. Die Herstellung folgte dem bei den beiden Vorgängerviren verwendeten Verfahren (s. 4.4.1.). Im Fall des Ad-PP1-UTR-Virusgenoms wurden jedoch zusätzlich zu der codierenden Sequenz der PP1 α 68 bp der PP1 α -5'-UTR und 357 bp der PP1 α -3'-UTR in die erste Expressionskassette inkloniert (vgl. Abb. 3.5.).

Nach homologer Rekombination in *E. coli* konnten fünf pAdEasy-PP1-UTR-Klone isoliert werden. Alle fünf Klone (1-5) zeigten in PCRs gegen PP1 α - (Abb. 4.17.C) und AdEasy-Sequenzen (Abb. 4.17.B) das jeweils erwartete Signal (vgl. 7.4.). Die *Pac* I-Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide zeigte nach erfolgreicher homologer Rekombination ein großes DNA-Fragment (> 33.4 kb) und zusätzlich jeweils ein kleineres Fragment von 3.0 oder 4.5 kb (Abb. 4.17.A). Bei der alternativen homologen Rekombination des Replikationsursprungs an Stelle des linken Arms, trat in drei von fünf Fällen ein 4.5 kb anstatt eines 3.0 kb DNA-Fragments auf, da durch die Rekombinationsvariante eine zweite *Pac* I-Erkennungssequenz eingebracht wurde. Dieses Phänomen war für die weitere Verwendung der Virus-DNA jedoch unproblematisch, da nach Spaltung mit *Pac* I in beiden Fällen identische DNA-Fragmente (> 33.4 kb) entstehen, die allein für die Transfektion relevant sind.

Die Transfektion in HEK293-Zellen führte in einem Großteil der Zellen zu einer Expression von GFP. Nach Ernte der Zellen und Infektion weiterer HEK293-Zellen, zeigten im ersten „Infektionszyklus“ nur sehr wenige Zellen eine grüne Fluoreszenz. Im zweiten „Infektionszyklus“ traten keine weiteren grün fluoreszierenden Zellen auf. Teilweise lysierten die in der ersten „Infektion“ vorgefundenen Fluoreszenz-positiven Einzelzellen. Es kam jedoch in keinem der Fälle zu einer anschließenden Bildung von Plaques fluoreszierender Zellen, wie sie bei Ad-PP1 und Ad-His-PP1 beobachtet worden war. Das beschriebene Verhalten wurde bei der Transfektion/Infektion aller fünf Ad-PP1-UTR-Genome beobachtet.

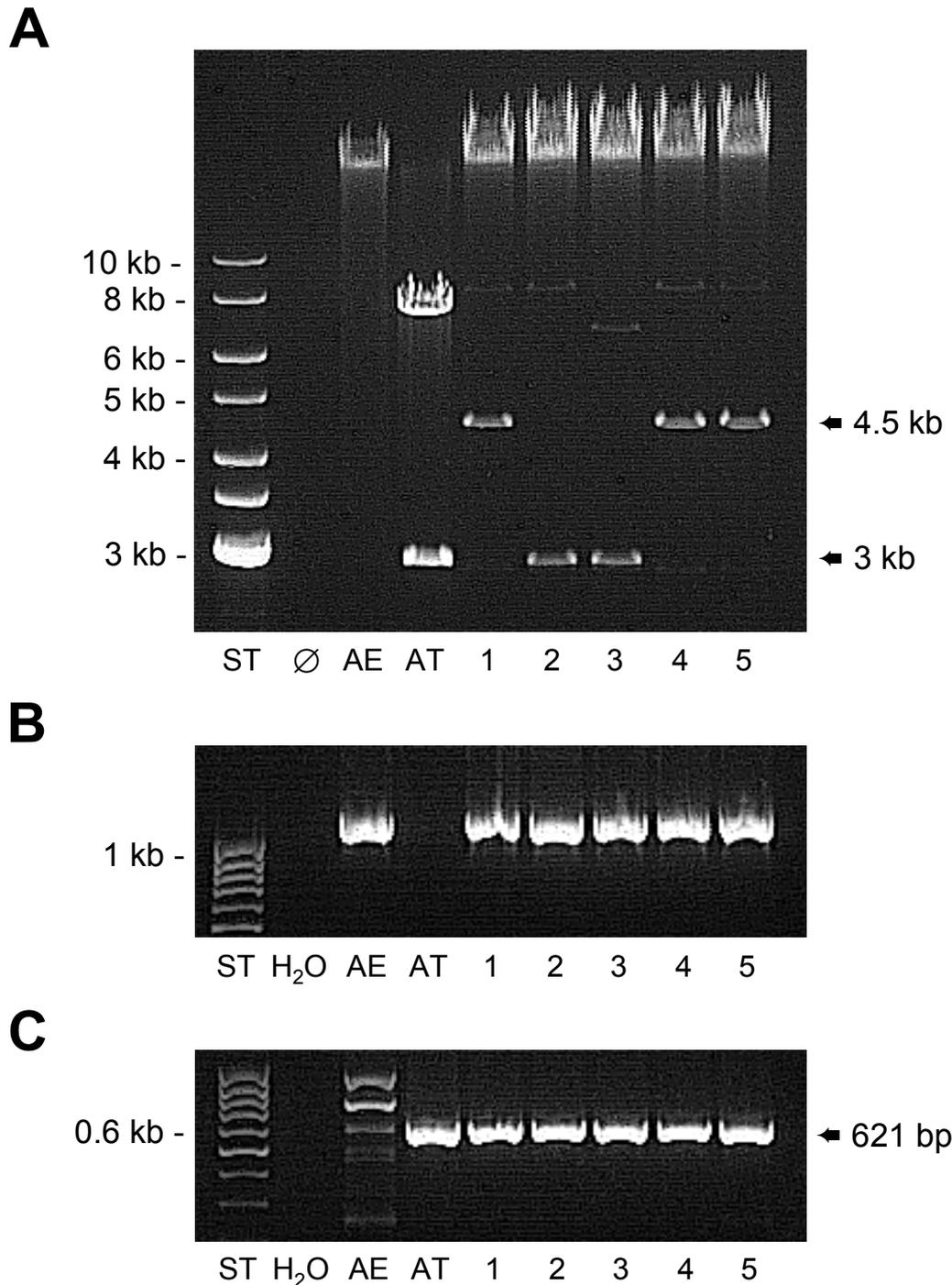


Abb. 4.17.:
Charakterisierung der nach homologer Rekombination erhaltenen pAdEasy-PP1-UTR-Klone

pAdEasy-PP1-UTR wurde durch homologe Rekombination von pAdEasy-1 (AE) und rekombinantem pAdTrack-PP1-UTR (AT) in Bakterienzellen generiert. Fünf positive Klone (1-5) konnten isoliert und charakterisiert werden. **(A)** Photographie der *Pac* I-Restriktionsanalyse. Zum Größenvergleich wurde ein 1 kb DNA-Größenstandard (ST) aufgetragen. **(B)** PCR gegen AdEasy-Sequenz. Zum Größenvergleich wurde ein 100 bp DNA-Größenstandard (ST) aufgetragen. **(C)** PCR gegen PP1 α -Sequenz. Zum Größenvergleich wurde ein 100 bp DNA-Größenstandard (ST) aufgetragen.

4.5. Generierung eines rekombinanten Adenovirus zur Expression des I₂ der PP1

4.5.1. Generierung des Ad-I₂

Der rekombinante Adenovirus Ad-I₂ wurde wie unter 3.10. beschrieben und entsprechend den PP1-Adenoviren generiert. Die Expressionskassette enthielt die humane codierende Sequenz des I₂ zuzüglich 209 bp der I₂-3'-UTR (Helps et al. 1994). Die Unversehrtheit der Expressionskassette konnte durch Sequenzierung bestätigt werden. Die Beobachtungen im Verlauf der Herstellung entsprachen den mit den PP1-Viren (Ad-PP1 und Ad-His-PP1) gemachten Erfahrungen (vgl. 4.4.1.). Es wurden in HEK293-Zellen replikationsfähige, infektiöse Adenoviren erhalten. Infizierte Zellen zeigten die grüne Fluoreszenz des GFP.

4.5.2. Untersuchung der Proteinexpression

Expression des I₂ in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden H9c2-Zellen mit steigenden Virusmengen an Ad-I₂- bzw. Ad-Ktr.-Virus für 72 h infiziert. In beiden Gruppen (Ad-Ktr. und Ad-I₂) nahm die unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtete grüne Fluoreszenz mit steigender Viruskonzentration zu. Als zusätzliche Kontrolle mitgeführte nicht infizierte Zellen (NI) zeigten keine Fluoreszenz.

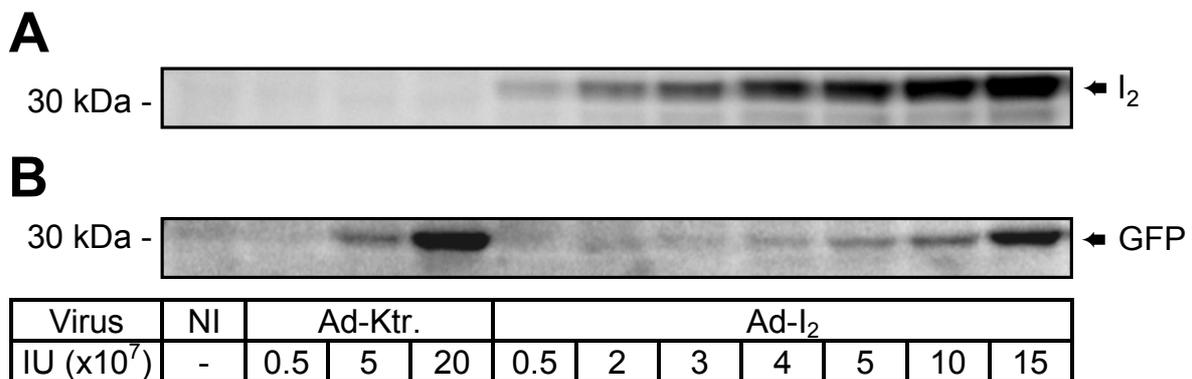


Abb. 4.18.:

Expression von I₂ und GFP in H9c2-Zellen infiziert mit Ad-I₂ in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 72 h mit steigenden Viruskonzentrationen infiziert. Die Zellen wurden geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 95 µg Gesamtprotein geladen und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit anti-I₂ (**A**) und anti-GFP (**B**) Antikörpern immunologisch nachgewiesen (AP/ECF). Nicht infizierte Zellen (NI) dienten als zusätzliche Kontrolle. Die verwendeten Virusmengen sind als infektiöse Viruseinheiten (IU) angegeben.

GFP konnte sowohl in Ad-Ktr. als auch in Ad-I₂ mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 4.18.B). Das Signal wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa detektiert, was der für GFP publizierten Masse entspricht (Chalfie et al. 1994, Cormack et al. 1996, Prasher et al. 1992). Die Signalstärke nahm für beide Viren mit der Virusmenge zu. NI zeigte kein GFP-Signal. I₂ konnte mit einem gegen die Aminosäuren 1-144 des humanen I₂ gerichteten monoklonalen Antikörper ausschließlich in Ad-I₂ infizierten Zellen detektiert werden (Abb. 4.18.A). Das Molekulargewicht des Signals von ca. 31 kDa entspricht den Literaturangaben für I₂ (Helps et al. 1994, Roach et al. 1985). Die I₂-Expression erfolgte in Abhängigkeit von der eingesetzten Virusmenge.

Verdrängung des I₂-Signals in Western Blots

Um die Spezifität des I₂-Signals zu testen, wurden in der Western Blot-Analyse zusätzlich Verdrängungsexperimente mit rekombinantem I₂ aus *E. coli* (rl₂; von sigma, Steinheim) durchgeführt. In Vorversuchen konnte das in Ad-I₂ infizierten Zellen detektierte Signal konzentrationsabhängig durch Präinkubation des I₂-Antikörpers mit steigenden Mengen an rl₂ unterdrückt werden (Abb. 4.19.). Der in *E. coli* exprimierte humane rl₂ zeigte im Gegensatz zum in H9c2-Zellen exprimierten humanen I₂ zwei weitere Signale direkt oberhalb und unterhalb des bisher beobachteten Signals.

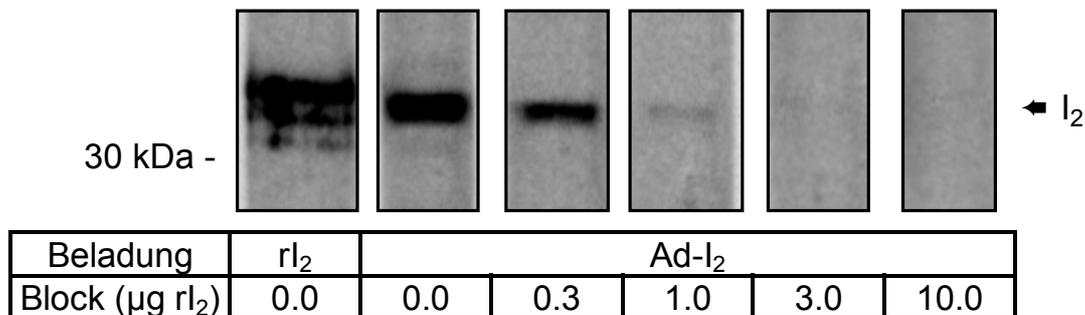


Abb. 4.19.:

Verdrängung des I₂-Signals in Western Blots von Ad-I₂ infizierten H9c2-Zellen in Abhängigkeit von der rl₂-Zugabe

H9c2-Zellen wurden mit rekombinantem Ad-I₂-Adenovirus (7.4×10^7 IU) für 72 h infiziert. Die Zellen wurden geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 110 µg Gesamtprotein geladen und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die einzelnen Spuren ausgeschnitten. Der anti-I₂-Antikörper wurde mit steigenden Mengen von rekombinantem I₂ aus *E. coli* (rl₂) für sechs Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert (Verdrängungsexperiment) und für den immunologischen Nachweis verwendet (Detektion AP/ECF). Als Positivkontrolle wurde rekombinanter I₂ aus *E. coli* mitgeführt.

Es wurden Homogenate von NI, Ad-Ktr.- und Ad-I₂-infizierten Zellen der Western Blot-Analyse unterzogen (Abb. 4.20.). Die Detektion erfolgte entweder mit dem unbehandelten Antikörper (-rI₂) oder mit rI₂-vorinkubiertem Antikörper (+rI₂). Das nur in Ad-I₂-infizierten Zellen detektierte Signal des Molekulargewichts von ca. 31 kDa konnte durch rI₂-Präinkubation unterdrückt werden. In allen drei Präparationen traten zwei zusätzliche Signale bei ca. 37 und 45 kDa auf, die ebenfalls unterdrückt werden konnten. Die Identität dieser zusätzlichen, unabhängig von der Virusinfektion in H9c2-Zellen auftretenden Signale konnte nicht geklärt werden.

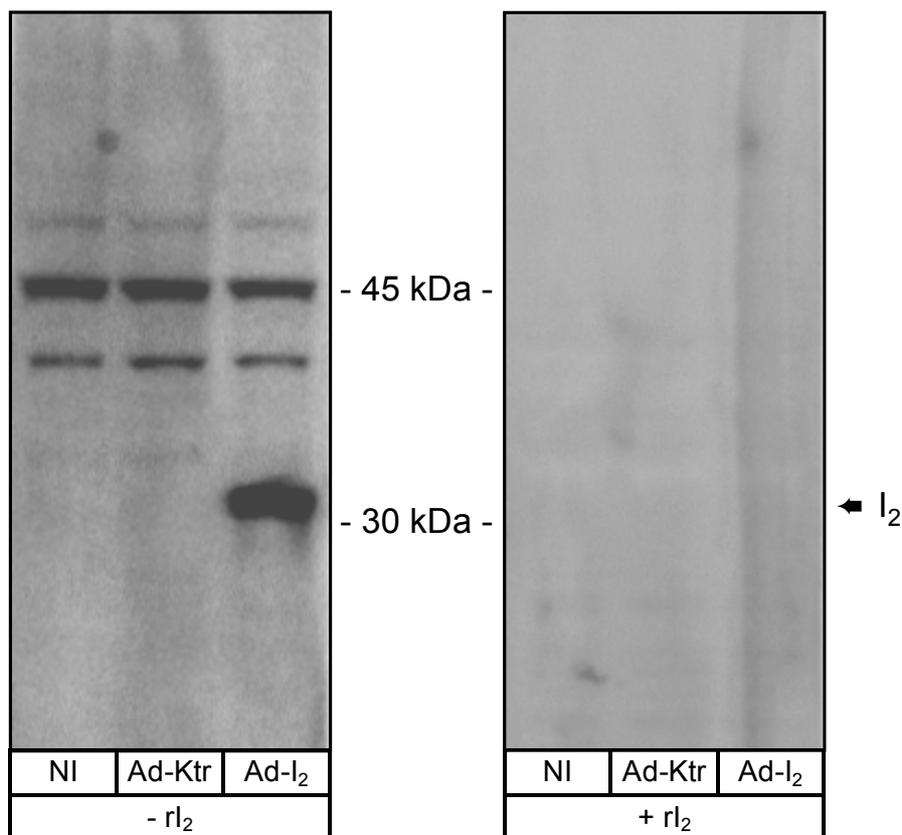


Abb. 4.20.:
Verdrängung des I₂-Signals in Western Blots von Ad-I₂ infizierten H9c2-Zellen

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 72 h infiziert. Die Zellen wurden geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 110 µg Gesamtprotein geladen und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulosemembran übertragen und der Blot in zwei Hälften geschnitten. Der anti-I₂-Antikörper wurde mit und ohne Zusatz von 4 µg rekombinantem I₂ aus *E. coli* (rI₂) für sechs Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert (Verdrängungsexperiment) und für den immunologischen Nachweis verwendet (Detektion AP/ECF). Als zusätzliche Kontrolle dienten nicht infizierte H9c2-Zellen (NI).

Quantifizierung der Proteinexpression

In einem nächsten Schritt wurde die Expression von I₂ und GFP in mit einer MOI von 70 infizierten H9c2-Zellen nach Western Blot-Analyse quantifiziert (Abb. 4.21.). Es bestätigte sich die starke Expression des I₂ in Ad-I₂-Zellen, wohingegen in NI und Ad-Ktr. keine I₂-Expression nachweisbar war (Abb. 4.21.A). In Ad-Ktr. und Ad-I₂ konnte GFP-Expression nachgewiesen werden. Dabei war die Expression in Ad-Ktr. vs. Ad-I₂ um den Faktor 3 verstärkt (Abb. 4.21.B). NI zeigte keine GFP-Expression.

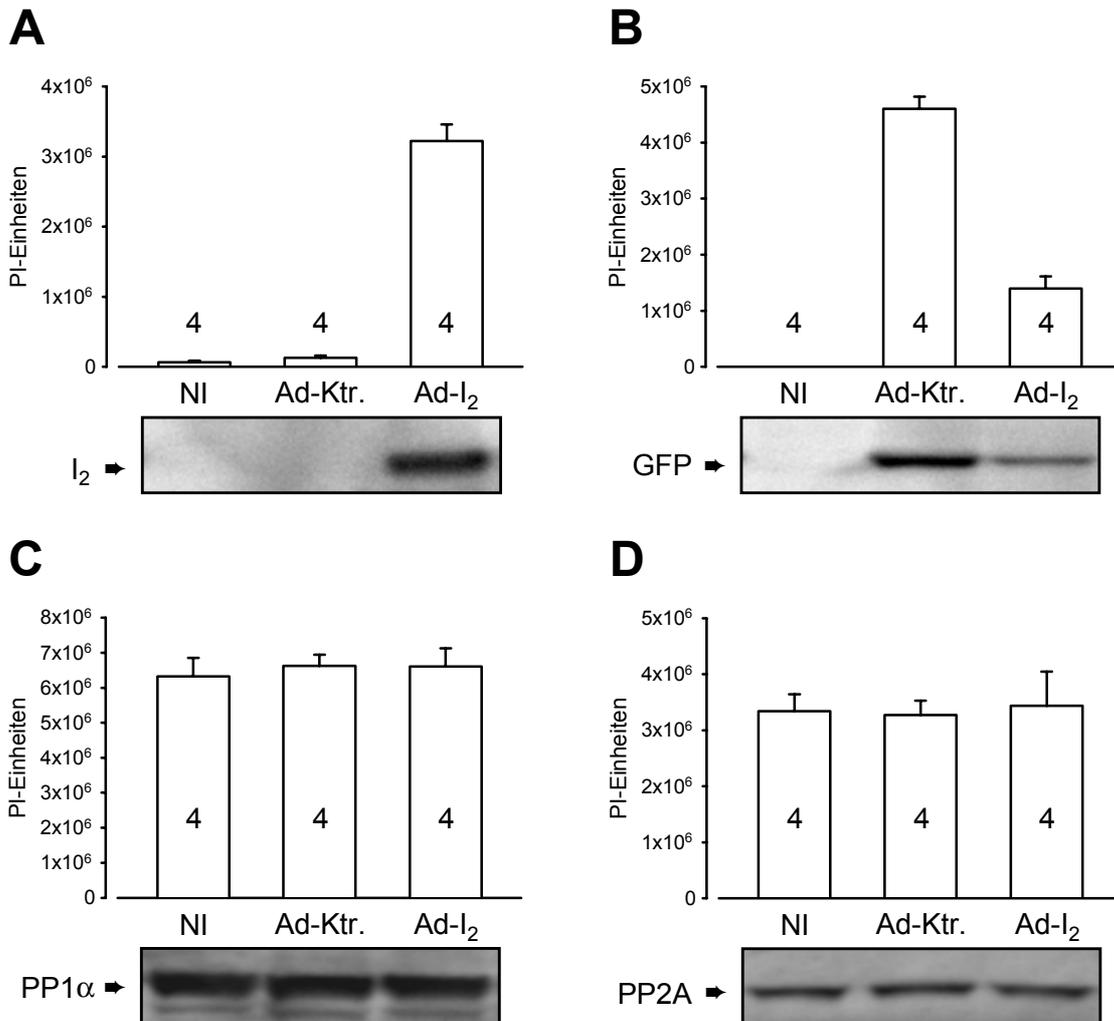


Abb. 4.21.:
Expression von I₂, GFP, PP1α und PP2A in Ad-I₂ infizierten H9c2-Zellen

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 72 h mit einer MOI von 70 infiziert. Die Zellen wurden geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 100 µg Gesamtprotein geladen und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulosemembran übertragen. Dargestellt sind die Photographien (repräsentative Versuche) sowie die Quantifizierung des immunologischen Signals (n = 4) von I₂ (**A**), GFP (**B**), PP1α (**C**) und PP2A (**D**). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm 860) und der ImageQuant-Software und wurde auf der Ordinate in Phosphorimager-Einheiten (PI-Einheiten) angegeben. Nicht infizierte Zellen (NI) dienten als zusätzliche Kontrolle.

Um zu überprüfen, inwieweit die I₂-Überexpression bzw. die adenovirale Infektion die Zusammensetzung der zellulären PPs beeinflusst, wurde die Proteinexpression mit spezifischen Antikörpern gegen die PP1 α (Abb. 4.21.C) und die PP2A (Abb. 4.21.D) analysiert. Sowohl für PP1 α als auch für PP2A konnte auf Proteinebene keine signifikante Veränderung infolge der I₂-Überexpression oder der viralen Infektion nachgewiesen werden.

Nach einer Verdopplung der Viruskonzentrationen (MOI 140) war die I₂- und GFP-Expression im Vergleich zur MOI 70-Infektion in den entsprechenden Gruppen nur geringfügig erhöht. Das relative Verhältnis der Expression zwischen den drei Gruppen für I₂, GFP, PP1 α und PP2A änderte sich nicht (Daten nicht dargestellt).

4.5.3. Untersuchung des I₂-Effekts

Nach der Analyse der Expression des I₂ auf Proteinebene wurde der inhibitorische Effekt des exprimierten Proteins untersucht. Hierzu wurden erneut H9c2-Zellen mit den rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 72 h mit einer MOI von 70 infiziert. Zur Inaktivierung endogener Phosphatasen wurden die Zellhomogenate hitzebehandelt. Der I₂ bleibt nach dieser Behandlung als thermostabiles Protein effektiv. Der inhibitorische Effekt der so behandelten Homogenate gegenüber rekombinanter PP1 α aus *E. coli* (rPP1 α) wurde durch Dephosphorylierung von [³²P]-markierter Phosphorylase a ermittelt (s. 3.7.2.). Das freigesetzte [³²P]-markierte Phosphat wurde quantifiziert. Die hitzeinaktivierten Zellhomogenate aller drei Präparationen besaßen per se einen inhibitorischen Effekt auf die rPP1 α -Aktivität verglichen mit reiner (zellfrei verwendeter) rPP1 α (Daten nicht dargestellt).

Ad-Ktr. (Ad-Ktr. $115 \pm 3.7\%$ vs. NI $100 \pm 5.1\%$ rPP1 α -Aktivität) zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die Phosphataseaktivität (Abb. 4.22.). In Homogenaten von Ad-I₂ war der inhibitorische Effekt hingegen erhöht ($p < 0.05$ vs. NI und Ad-Ktr., $n = 4$), was sich in einer Hemmung der rPP1 α -Aktivität auf $36 \pm 3.5\%$ der in NI gemessenen rPP1 α -Aktivität ausdrückte. Eine weitere Erhöhung der Viruskonzentrationen (MOI 140) erbrachte entsprechend den Beobachtungen auf Proteinebene (s. o.) keine weitere Steigerung des inhibitorischen Effekts von Ad-I₂ (Daten nicht dargestellt).

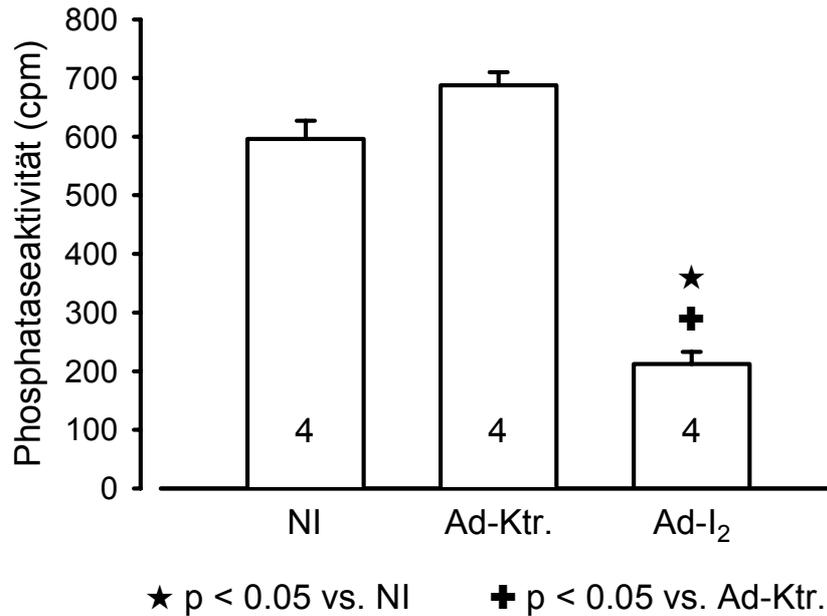
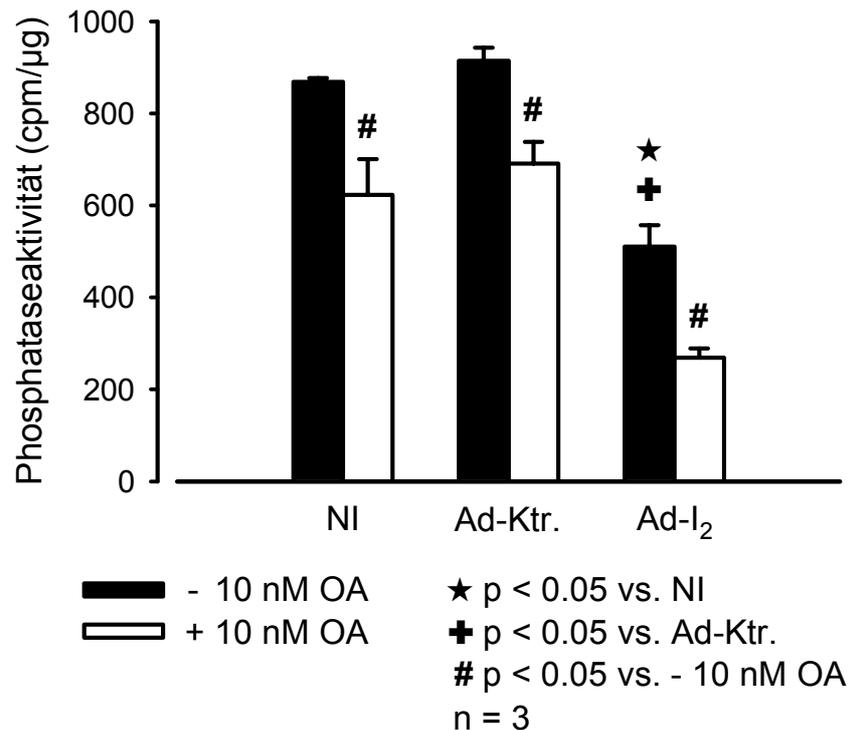


Abb. 4.22.:
Inhibitorischer Effekt hitzeinaktivierter Zellhomogenate von Ad-I₂-infizierten H9c2-Zellen gegenüber rekombinanter PP1 α

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 72 h mit einer MOI von 70 infiziert. Die Zellen wurden geerntet, homogenisiert und die Phosphatasen durch Erhitzen der Proben auf 95°C inaktiviert. Der Überstand der Homogenate wurde im Verhältnis 1:1000 gegen HEPES 50 mM dialysiert. Der inhibitorische Effekt der dialysierten Proben gegenüber rekombinanter PP1 α aus *E. coli* wurde durch Dephosphorylierung von [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat gemessen. Eingesetzt wurden jeweils 1.0 μ g Gesamtprotein der dialysierten Proben und 2.5 ng rekombinante PP1 α . Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht infizierte H9c2-Zellen mitgeführt (NI). Ordinate: Phosphataseaktivität gemessen als radioaktive Zählereinheiten pro Minute (cpm).

4.5.4. Untersuchung der Phosphataseaktivität im Gesamtextrakt

Um den Einfluß einer Überexpression des I₂ auf die endogene PP-Aktivität der Zelle beurteilen zu können, wurden H9c2-Zellen mit den rekombinanten Adenoviren infiziert (MOI 70, 72 h). Die gesamte endogene PP-Aktivität wurde direkt, d. h. ohne vorherige Hitzebehandlung und ohne Zugabe exogener rPP1 α , im Phosphorylase a-Assay (s. 3.7.2.) bestimmt (Abb. 4.23., geschlossene Balken). In NI- und Ad-Ktr.-Homogenaten war die PP-Aktivität nicht verändert (100 \pm 1.0% vs. 105 \pm 3.3%, n = 3). Im Gegensatz dazu war die PP-Aktivität in Ad-I₂-infizierten Zellen auf 59 \pm 5.4% (p < 0.05 vs. NI und Ad-Ktr., n = 3) erniedrigt.

**Abb. 4.23.:****Phosphataseaktivität in Zellhomogenaten von Ad-I₂-infizierten H9c2-Zellen und der Einfluß von 10 nM Okadasäure (OA)**

H9c2-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 72 h mit einer MOI von 70 infiziert. Die Zellen wurden geerntet, homogenisiert und zentrifugiert. Die Phosphataseaktivität der Überstände wurde durch Dephosphorylierung von [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat gemessen. Ebenso wurde die Hemmung der Phosphataseaktivität durch 10 nM Okadasäure gemessen. Als zusätzliche Kontrolle dienten nicht infizierte H9c2-Zellen (NI). Ordinate: Phosphataseaktivität gemessen als radioaktive Zählereinheiten pro Minute, bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Proben (cpm/µg).

In einem nächsten Schritt wurde die Zusammensetzung der endogenen PP-Aktivität näher charakterisiert. Zur Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität wurden die Homogenate mit 10 nM Okadasäure (OA) vorinkubiert und erneut die PP-Aktivität im Phosphorylase a-Assay bestimmt (Abb. 4.23., offene Balken). Unter 10 nM OA nahm die PP-Aktivität in allen drei Präparationen ab (p < 0.05 vs. - 10 nM OA, n = 3). Das Verhältnis der Aktivität in den drei Präparationen zueinander verblieb ähnlich dem in Abwesenheit von OA beobachteten Bild. Ad-Ktr. zeigte vs. NI keine signifikante Veränderung (111 ± 7.6% vs. 100 ± 12.6%, n = 3), wohingegen in Ad-I₂ die PP-Aktivität auf 43 ± 3.1% (p < 0.05 vs. NI und Ad-Ktr., n = 3) erniedrigt war. Die absolute Erniedrigung der PP-Aktivität durch 10 nM OA betrug in NI 246 cpm/µg, in Ad-Ktr. 224 cpm/µg, und in Ad-I₂ 241 cpm/µg und war zwischen den drei Gruppen nicht verändert.

4.5.5. Infektion von Primärkulturen

Die Eigenschaften des Ad-I₂ Virus wurden zunächst in H9c2-Zellen beschrieben, d. h. in einer kontinuierlich wachsenden klonalen Zelllinie von unbegrenzter Lebensdauer. In einem nächsten Schritt sollte die Eignung des Ad-I₂ zum Einsatz in physiologischen Experimenten mit differenzierten Zellsystemen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden primäre Zell- und Organkulturen infiziert.

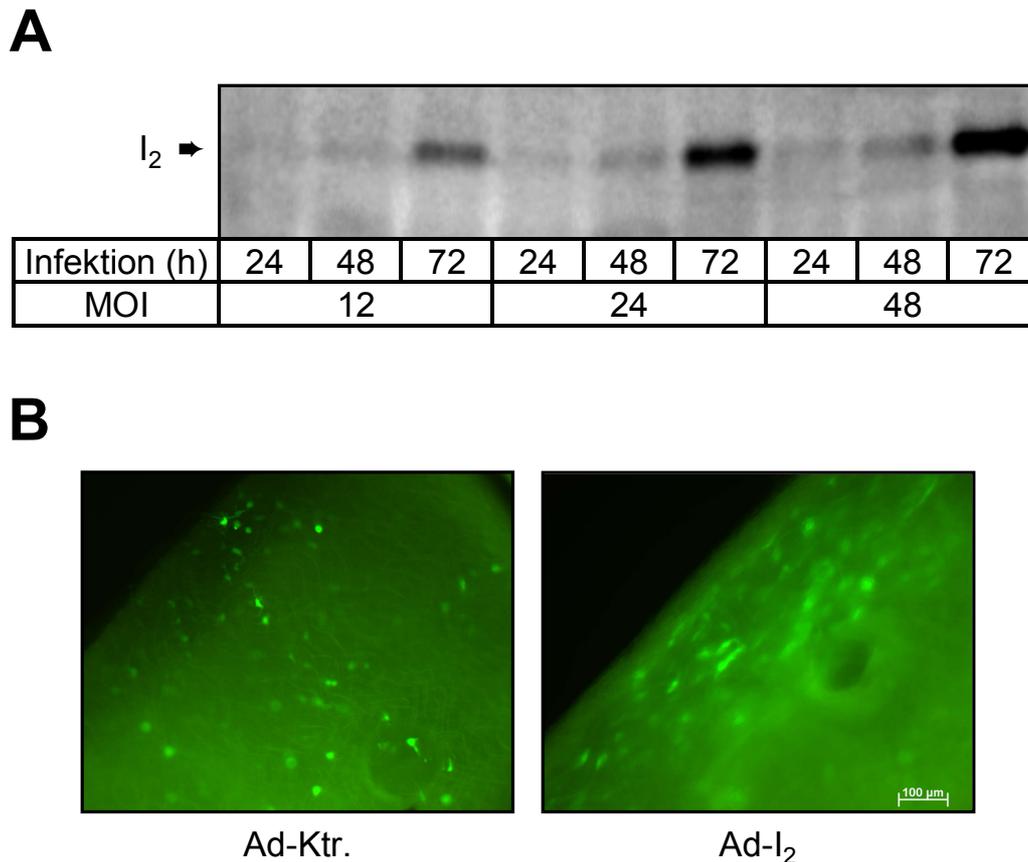


Abb. 4.24.:
Infektion von Primärkulturen mit Ad-I₂

(A) Zellkultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Herzen von neonatalen Ratten wurden entnommen, mechanisch zerkleinert und in Dissoziationslösung (Trypsin/Collagenase) inkubiert. Die vereinzelt Kardiomyozyten wurden für einen Tag bis zum Anwachsen kultiviert. Die Zellen wurden mit Ad-I₂ Adenovirus für 24, 48 und 72 h und einer MOI von 12, 24 und 48 infiziert, geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 100 µg Gesamtprotein geladen. Photographie des immunologischen Nachweises (Detektion AP/ECF) des I₂. (B) Organkultur von Gefäßringen der Aorta der Maus. CD-1 Wildtyp-Mäusen wurde die Aorta thoracica entnommen und in zwei Millimeter breite Ringe geschnitten. Die Ringe wurden mit Adenoviren (Ad-Ktr. und Ad-I₂) für 48 h mit einer Virusmenge von 4.3×10^8 IU/Ring infiziert. Die Abbildungen zeigen fluoreszenzmikroskopische Photographien von infizierten Aorten (Anregung bei 488 nm, Emission bei 530 nm).

Zellkultur neonataler Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden, wie unter 3.10.6. beschrieben, isoliert. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 h und mit einer MOI von 12, 24 und 48 infiziert. Die Zellen wurden homogenisiert und der Western Blot-Analyse zugeführt. Der immunologische Nachweis des I₂ zeigte eine von der Infektionszeit und der Viruskonzentration abhängige Expression des I₂ in Ad-I₂ infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Abb. 4.24.A). Zur Kontrolle mitgeführte NI und Ad-Ktr. infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten zeigten keine I₂-Expression (Daten nicht dargestellt). In Ad-Ktr. und Ad-I₂ wurde fluoreszenzmikroskopisch und immunologisch eine GFP-Expression nachgewiesen. NI zeigte keine GFP-Expression.

Organkultur von Gefäßringen der Aorta der Maus

CD-1 Wildtyp-Mäusen wurde die Aorta thoracica entnommen und in zwei Millimeter breite Gefäßringe zerteilt (s. 3.10.7.). Die Gefäßringe wurden mit 4.3×10^8 IU Ad-I₂ bzw. Ad-Ktr. je Ring für 48 h infiziert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte nach 48 h einzelne grün fluoreszierende Zellen in der Oberfläche der Ad-Ktr. bzw. Ad-I₂ infizierten Aortenringe (Abb. 4.24.B).

5. DISKUSSION

5.1. Calcium-unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur durch Hemmstoffe der Proteinphosphatasen

5.1.1. Zielsetzung

Die kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur wird primär durch die intrazelluläre freie Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ kontrolliert. Kontraktile Stimulation der glatten Muskulatur mit Agonisten führt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, Ca^{2+} -Calmodulin-abhängiger Aktivierung der Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK), Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC_{20}), Querbrückenzyklus und Kraftentwicklung (s. 1.3.1.). Umgekehrt erfolgt durch die Dephosphorylierung der MLC_{20} durch die Proteinphosphatase (PP) der leichten Kette des Myosins (MLCP) eine Relaxation. Seit beobachtet wurde, daß die Aktivität der MLCP unabhängig von $[Ca^{2+}]_i$ reguliert wird, wurde den Mechanismen der Kontraktion der glatten Muskulatur, die unabhängig von einer Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ und ohne Aktivierung der MLCK ablaufen, zunehmend mehr Aufmerksamkeit geschenkt (Erdödi et al. 1996, Hartshorne et al. 1998, Somlyo und Somlyo 1994, 2000). Die Untersuchungen zur Bedeutung der MLCP wurden dabei durch die Verfügbarkeit von PP-Hemmstoffen erleichtert (s. 1.2.2.).

Die PP-Hemmstoffe führten sowohl in viszeraler glatter Muskulatur als auch in verschiedenen arteriellen Präparationen, z.B. menschlichen Koronararterien (Knapp et al. 1999b) oder Aorta der Ratte (Knapp et al. 2000), zu einer Steigerung der Kontraktionskraft. Diese kontraktile Effekte wurden von einer erhöhten Phosphorylierung der MLC_{20} in intakten Gefäßringen begleitet. Des Weiteren konnte in kultivierten glatten Muskelzellen und Endothelzellen gezeigt werden, daß eine Erhöhung der MLC_{20} -Phosphorylierung durch PP-Hemmstoffe nicht von einer Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ begleitet wird (Knapp et al. 1998, 1999a). Kraftmessung an kultivierten Zellen ist jedoch nicht ganz trivial, und ein direkter Vergleich von intaktem arteriellem Gewebe und kultivierten Zellen nicht ohne weiteres möglich. Um den Mechanismus der Ca^{2+} -unabhängigen Steigerung der Kontraktionskraft in arteriellen Gefäßen besser zu charakterisieren, sollten die Effekte von PP-Hemmstoffen auf intakte Gefäße, in Gegenwart von Calciumionen, und auf gehäutete Gefäßmuskelfasern, in Abwesenheit von Calciumionen, näher untersucht werden.

Die Methode der Kontraktionskraftmessung an gehäuteten Muskelfasern bietet sich für diese Fragestellung an, da die Häutung mit Triton X-100 zu einer umfassenden Permeabilisierung führt, bei der alle Membranfunktionen eliminiert werden, die Rezeptorkopplung verloren geht und die Calciumspeicher zerstört werden (Arner 1982, Takai et al. 1987). Dies ermöglicht eine exakte Kontrolle der $[Ca^{2+}]$ und liefert Informationen über die Beziehung von $[Ca^{2+}]$ und Kraftentwicklung. Da Daten zum Effekt der PP-Hemmstoffe auf die vaskuläre glatte Muskulatur der Maus bisher fehlen und die Generierung transgener Mäuse in der Forschung große Bedeutung erlangt hat (Sutliff und Paul 1998), wurde Gewebe dieser Spezies verwendet. Als PP-Hemmstoffe (s. 1.2.2.) dienten der unspezifische, aber hoch potente, hydrophile Hemmstoff Microcystin LR (MC) und der spezifische, lipophile Hemmstoff Cantharidin (Cant).

5.1.2. Wirkung von Hemmstoffen der Proteinphosphatasen auf die Kontraktionskraft intakter Gefäßringe der Maus

In intakten Gefäßringen führte Cant zu einer schnellen und anhaltenden Zunahme der Kontraktionskraft, wobei 100 μ M Cant eine mindestens vergleichbare Effektivität wie Kalium (118 mM) zeigte. Der Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} nahm gleichzeitig zu. Im Gegensatz dazu zeigte MC keinen Effekt. MC kann als cyclisches Heptapeptid aufgrund seines hydrophilen Charakters nicht in intaktes Gewebe eindringen. Eine Ausnahme bilden Hepatozyten, in die MC unter Nutzung des multispezifischen Transportsystems für Gallensäuren eindringen kann (Eriksson et al. 1990, Runnegar et al. 1993). Die Unwirksamkeit von MC in intakten Gefäßringen zeigt, daß ein aktives Transportsystem, wie für Hepatozyten beschrieben, in der vaskulären glatten Muskulatur der Maus nicht existiert oder ein starker Auswärtstransport vorliegt.

5.1.3. Wirkung von Hemmstoffen der Proteinphosphatasen auf die Kontraktionskraft gehäuteter Gefäßmuskelfasern der Maus

Im Gegensatz zu intakten Gefäßringen konnten sowohl Cant als auch MC in gehäuteten Gefäßmuskelstreifen eine Zunahme der Kontraktionskraft auslösen, die ebenfalls von einem Anstieg der MLC_{20} -Phosphorylierung begleitet wurde. Die Wirksamkeit von MC in gehäuteten Fasern bekräftigt die These, daß die Unwirksamkeit am intakten Gefäß auf Permeabilitätsprobleme zurückzuführen ist.

Die Muskelkontraktion und die Erhöhung der MLC₂₀-Phosphorylierung wurde durch die PP-Hemmstoffe in Abwesenheit von Calciumionen erzeugt. Dies bestätigt die Befunde in kultivierten glatten Muskelzellen, in denen eine Erhöhung der MLC₂₀-Phosphorylierung durch PP-Hemmstoffe nicht von einer Veränderung der [Ca²⁺] begleitet wurde (Knapp et al. 1998). Die Hypothese, daß eine Kontraktion der glatten Muskulatur durch PP-Hemmstoffe ausschließlich durch die PP-Hemmung, unabhängig von der [Ca²⁺] und damit ohne Aktivierung der MLCK ausgelöst werden kann, konnte somit gefestigt werden.

Ist die MLCK in Abwesenheit von Calciumionen jedoch nicht mehr aktiv, so muß über weitere Mechanismen der Phosphorylierung der MLC₂₀ diskutiert werden, denn die PP-Hemmung selbst erhält nur den gegebenen Status einer MLC₂₀-Phosphorylierung. Daher müssen eine erhöhte Phosphorylierung der MLC₂₀ und die Kontraktion in Abhängigkeit von PP-Hemmstoffen das Ergebnis der basalen Aktivität einer Ca²⁺-unabhängigen MLCK sein. Vorausgesetzt, die Aktivität dieser Ca²⁺-unabhängigen MLCK ist unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen konstant, so sollte das Ausmaß der Kraftentwicklung nur von der PP-Hemmung abhängen. Zu dieser Annahme passend wird die Reihenfolge der inhibitorischen Potenz der PP-Hemmstoffe (MC>Cant; s. 1.2.2.) durch die Kontraktionskraftexperimente an gehäuteten Fasern wiedergespiegelt.

Analoge Befunde wurden von Weber et al. (1999) für Triton X-100 gehäutete Fasern der Kaudalarterie der Ratte beschrieben. Auch in diesem Gewebe konnte durch MC die Aktivität einer Ca²⁺-unabhängigen MLCK demaskiert werden. Diese Kinase war mit den Myofilamenten assoziiert. Sie konnte von der Ca²⁺-abhängigen MLCK separiert werden und phosphoryliert die MLC₂₀ an den Aminosäuren Serin-19 und/oder Threonin-18, wohingegen die Ca²⁺-abhängige MLCK primär Serin-19 phosphoryliert (Weber et al. 1999). Bei den aktuellen Bemühungen um die Frage der Identität der Ca²⁺-unabhängigen Kinase wurden zwei Enzyme identifiziert, die für die Ca²⁺-unabhängige MLC₂₀-Phosphorylierung und Kontraktion der glatten Muskulatur verantwortlich sein sollen: die ZIP-Kinase (*zipper-interacting protein kinase*; Niiro und Ikebe 2001) und die IL-Kinase (*integrin-linked kinase*; Deng et al. 2001, 2002).

5.1.4. Wirkung von Cantharidin auf intakte und gehäutete Gefäßpräparationen im Vergleich

Im Vergleich der beiden Modelle waren Ausmaß und Geschwindigkeit der durch Cant ausgelösten Kraftentwicklung in gehäuteten Gefäßmuskelfasern viel geringer, als in intakten Gefäßringen. Dies ist überraschend, da die Entfernung der Zellmembran die Penetration der Zelle durch Cant erleichtern und somit die Geschwindigkeit der Verfügbarkeit und die Konzentration am Wirkort erhöht sein sollten. Gleichzeitig zeigen Versuche zur Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von MC, daß eine schnelle Zunahme der Kontraktionskraft auf das Niveau der durch pCa 4.4 entwickelten Kraft in gehäuteten Fasern möglich ist und Konzentrationsunterschiede des Hemmstoffs in erster Linie die Geschwindigkeit der Kraftentwicklung und nicht das Ausmaß beeinflussen.

Diese Diskrepanz könnte durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen erklärt werden. In Versuchen mit intakten Ringen wurde Ca^{2+} -haltige physiologische Salzlösung verwendet, die Gefäßringe sollten daher maximal mit Calciumionen beladen sein. Die Phosphorylierung der MLC_{20} könnte somit in intakten Gefäßringen auch unter relaxierenden Bedingungen zusätzlich durch eine Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen MLCK bewirkt werden, wohingegen die Kontraktion der gehäuteten Fasern nur durch die basale Aktivität der Ca^{2+} -unabhängigen Kinasen erzeugt wird. Indem die durch Cant bewirkte Kontraktion gehäuteter Fasern in Gegenwart von Calciumionen schneller erfolgte als in Abwesenheit von Calciumzusätzen, konnte diese Hypothese erhärtet werden.

Die unterschiedliche Wirkung von Cant in intakten Gefäßringen im Vergleich zu gehäuteten Gefäßmuskelseifen könnte auch auf einer Veränderung des Verhältnisses der PP's zueinander beruhen. Takai et al. (1989) untersuchten die PP-Aktivität in mit Triton X-100 gehäuteter intestinaler glatter Muskulatur des Meerschweinchens. Die PP-Aktivität der Gewebeextrakte wurde dabei in mehrere Fraktionen eingeteilt: eine I_2 -sensible Typ 1-Fraktion, eine Mg^{2+} -abhängige und Okadasäure-unsensible Typ 2C-Fraktion und zwei Typ 2A-ähnliche Okadasäure-sensible Fraktionen. Nach Häutung mit Triton X-100 stieg der Anteil der einen der beiden Typ 2A-ähnlichen Fraktionen von 30% auf 90% der Gesamtaktivität an, wohingegen die Aktivität der anderen Fraktionen nahezu vollständig verloren ging. Es wurde daher über eine feste Bindung der PP2A an die kontraktilen Proteine spekuliert.

Biochemische Untersuchungen zur Proteinexpression von PP1 und PP2A in intakten Ringen und gehäuteten Fasern der Aorta der Maus sollten daher mögliche Veränderung des Verhältnisses der PPs zueinander aufklären. Nach Behandlung mit Triton X-100 zeigte sich eine starke Abnahme des Gesamtproteingehalts in gehäuteten Gefäßmuskelfasern um ca. 90%. Ähnliche Befunde zum Verlust von zytosolischen Proteinen durch Häutung wurden von Iizuka et al. (1994) beschrieben. Das Häuten der Pfortader des Kaninchens mit Triton X-100 resultierte dort in einem Verlust an Lactatdehydrogenase von ungefähr 73%. Gleichzeitig werden bei der Häutung mit Triton X-100 keine Verluste von Strukturproteinen wie Myosin, Actin, Caldesmon oder von gebundenen regulatorischen Proteinen wie MLCK beobachtet (Iizuka et al. 1994, Tansey et al. 1994). Des Weiteren verglich van Heijst et al. (2000) unterschiedlich stringente Häutungsmethoden an der Oberschenkelarterie des Kaninchens. Unter allen getesteten Bedingungen konnte kein Verlust der PP-induzierbaren Kontraktion der isolierten Gewebe verzeichnet werden.

Trotz des beobachteten starken Proteinverlusts während des Häutungsprozesses blieb die relative Expression von PP1 α und PP2A in intaktem und gehäutetem Gewebe beim Vergleich äquivalenter Proteinmengen unverändert. Ein selektiver Verlust der PP1 oder PP2A konnte somit als Grund für die verschiedenartige Antwort von Cant ausgeschlossen werden. Vielmehr scheinen beide PPs fest an kontraktile und/oder strukturelle Proteine gebunden zu sein. Aufgrund dieser immunologischen Daten muß eine mechanistische Erklärung der kontraktile Effekte von Cant auf gehäutete Fasern eine Hemmung beider PPs in die Überlegungen einschließen. Demzufolge könnte der verschiedenartige Effekt von Cant in den beiden Modellen und die schwächere Wirkung im Vergleich zu MC in gehäuteten Fasern auch auf die unterschiedliche Spezifität des Hemmstoffs gegenüber der PP1 und PP2A zurückzuführen sein.

Cant inhibiert in niedrigen Konzentrationen PP2A spezifischer als PP1, wohingegen MC ein unselektiver Hemmstoff der PPs ist (s. 1.2.2.). Eine vollständige Hemmung der PP1-Aktivität kann nur durch Konzentrationen größer 10 μ M Cant erreicht werden (Honkanen 1993, Knapp et al. 1998). Daher sollten in unseren Experimenten theoretisch sowohl die PP1- als auch die PP2A-Aktivität gehemmt sein. Diese Werte gelten jedoch für *in vitro*-Versuche. Bei intakten Präparaten bleibt die intrazelluläre Konzentration der PP-Hemmstoffe unbekannt und ihre Potenz erscheint oft um das 10-100fache erniedrigt (Cohen et al. 1989, Erdödi et al. 1996). Daher kann aufgrund der höheren Spezifität von Cant gegenüber der PP2A darüber spekuliert werden, ob

der PP2A im intakten Gefäß zusätzliche Bedeutung für die Kraftentwicklung zukommt. Welche Angriffspunkte der PP2A dies im intakten Gefäß sind und warum sie in gehäuteten Fasern ihre Relevanz für die Kraftentwicklung verlieren, kann nur durch weitere biochemische Untersuchungen ergründet werden.

Zusammenfassend konnten wir in der Aorta der Maus einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus der glattmuskulären Kontraktion aufzeigen, der eine Hemmung der PP1- und/oder PP2A-Aktivität einschließt und die basale Aktivität Ca^{2+} -unabhängiger Kinasen der MLC_{20} demaskiert.

5.2. Expression der PP1 α im Baculovirussystem

5.2.1. Zielsetzung

In den bisher dargestellten Untersuchungen an intakten Gefäßringen und gehäuteten Gefäßmuskelfasern der Maus wurde die Funktion der PPs in der Regulation der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur über eine Hemmung ihrer Aktivität durch Hemmstoffe der PPs charakterisiert. Da die verfügbaren Hemmstoffe nicht spezifisch sind, ließen sich die beobachteten Effekte jedoch nicht einer einzelnen PP-Klasse zuordnen. Es stellte sich daher die Frage, wie sich eine Steigerung der Phosphataseaktivität auf die Kontraktionskraft auswirkt und ob dabei Unterschiede zwischen den einzelnen PP-Klassen aufzuzeigen sind.

Im Gegensatz zu den PP-Hemmstoffen stehen bisher praktisch keine spezifischen PP-Aktivatoren zu diesem Zweck zur Verfügung. So erhöht zum Beispiel 2,3-Butandionmonoxim sowohl die Aktivität des Holoenzym der PP1 als auch der PP2A (Waurick et al. 1999, Zimmermann et al. 1996) und blockiert darüber hinaus Ionenkanäle (Allen et al. 1998, Einfeld et al. 1997, Schlichter et al. 1992, Smith et al. 1994). Ziel weiterer Untersuchungen war es daher, die Phosphataseaktivität durch direkte Erhöhung der Enzymkonzentration im Modell zu steigern. Als erstes Modell für die Untersuchung der Auswirkungen einer Erhöhung der Phosphataseaktivität auf die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur sollte das bereits etablierte System der gehäuteten Gefäßmuskelfasern dienen. Denn es ist möglich, große, hydrophile Makromoleküle wie Proteine in gehäutete Fasern einzuführen (Gailly et al. 1996, Iizuka et al. 1994).

Mehr als 90% der Phosphataseaktivität in Säugetierzellen beruht auf den PPs vom Typ 1 und 2A (Cohen 1989, DePaoli-Roach et al. 1994, MacDougall et al. 1991). Beide Phosphatasen konnten auf Protein- und RNA-Ebene sowohl im Herzen (Lüss

et al. 2000, Neumann et al. 1999) als auch im vaskulären glatten Muskelgewebe (Erdödi et al. 1996, Knapp et al. 1998, 1999b) nachgewiesen werden. Inzwischen wird generell angenommen, daß es sich bei der Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) in der glatten Muskulatur um eine PP des Typs 1 handelt (Erdödi et al. 1996, Hartshorne et al. 1998). Im Gewebehomogenat von Koronararterien wurden die PP1-Isoformen PP1 α , PP1 β und PP1 γ gefunden (Knapp et al. 1998, 1999b). Alle Isoformen der PP1 besitzen die Fähigkeit, mit dem myofibrillär-regulatorischen (M_{130/133}) Komplex der glatten Muskulatur zu interagieren (Alessi et al. 1993). Es wird vermutet, daß die β -Isoform mit dem MLCP-Holoenzym assoziiert ist, da bei der Isolierung des Holoenzym vornehmlich diese Isoform nachgewiesen wurde (Alessi et al. 1992, Okubo et al. 1994, Shimizu et al. 1994). Jedoch zeigte die durch Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelte Verteilung der PP1-Isoformen in glattmuskulären Zellen, daß die PP1 β hauptsächlich im Nukleus und in fokalen Adhäsionen zu finden ist, wohingegen die PP1 α mit der M₁₃₀-Untereinheit kolokalisiert (Murata et al. 1997). Das MLCP-Holoenzym könnte daher sowohl die α - als auch die β -Isoform enthalten und die Assoziation der β -Isoform mit der M₁₃₀-Untereinheit in Präparationen auf einem Isoformenaustausch während der Isolierung zurückzuführen sein (Murata et al. 1997). Ebenso enthält die myofibrilläre Fraktion im Herzen hauptsächlich die α -Isoform (Chu et al. 1994). Daher wurde die α -Isoform der PP1 für die Untersuchungen ausgewählt. In einem parallel laufenden Projekt wurde die Funktion der PP2A α untersucht (Aleth 2002).

Die aus Gewebe zu isolierenden Phosphatasemengen sind gering (< 1 mg PP aus der Skelettmuskulatur von 4-6 Kaninchen; Zhang et al. 1992) und es wird ein schwer auftrennbares Gemisch von Isoformen erhalten (Bai et al. 1988, Tung et al. 1984). Um für systematische Untersuchungen ausreichende Mengen an PP1 definierter Isoform zu erhalten und die Option anschließender Mutationsanalysen zu eröffnen, wurde die PP1 α in Sf21-Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems überexprimiert (s. 4.2.). Die in Insektenzellen (Eukaryoten) exprimierten Proteine unterliegen vielen der eukariotischen Proteinmodifikationen, auf die in bakteriellen Expressionssystemen verzichtet werden muß. Des weiteren bleiben die Proteine in der Mehrzahl der Fälle in der Zelle gelöst, was ebenfalls in bakteriellen Systemen größere Schwierigkeiten bereitet (s. 3.8.). Um die Isolierung und Aufreinigung der rekombinanten PP1 α zu erleichtern und gleichzeitig ihre Löslichkeit zu verbessern, wurde das Enzym mit einer N-terminalen His₆-Sequenz versehen (Sf21 His-PP1).

5.2.2. Expression der Sf21 His-PP1 als unlösliches Aggregat

Mit Hilfe des rekombinanten Baculovirus konnte die Sf21 His-PP1 in Sf21-Zellen exprimiert werden. Die Menge an exprimiertem Protein war dabei so groß, daß bereits in der Coomassie-Färbung ein deutliches Signal der Sf21 His-PP1 klar detektiert wurde. Allerdings sammelten sich mehr als 93% des gebildeten Enzyms in unlöslicher Form in der Zelle an. Ein ähnliches Verhalten ist bereits 1990 für die Expression der nicht Histidin-markierten PP1 α in Sf21-Zellen (Sf21 PP1) von Berndt und Cohen beschrieben worden. Durch die zusätzliche Histidin-Sequenz konnte der Anteil an löslicher PP1 α nicht weiter gesteigert werden. Ebenso wurden bei der Expression der PP2A, die auf Proteinebene zu 42% homolog zur PP1 ist, und einer His-PP2A in Sf21-Zellen die Enzyme zu 95% als unlösliche Proteine exprimiert (Aleth 2002). Im Gegensatz zu diesen PPs konnte die PP2B δ (Homologie < 37%) in Sf9-Zellen und die PP7 (Homologie < 35%) in Sf21-Zellen in löslicher, aktiver Form exprimiert werden (Huang und Honkanen 1998, Perrino et al. 1992).

Eine Expression der PP1 α in *E. coli* unter der Kontrolle des T7-Promotors führte zunächst ebenfalls zur Expression der PP1 α in unlöslicher Form. Der Wechsel zu einem schwächeren Promotor (*trp-lac* Hybridpromotor) ermöglichte anschließend zwar die Expression einer löslichen PP1 α in *E. coli*, das exprimierte Enzym war jedoch inaktiv und benötigte für die Enzymaktivität die Substitution von Mangan (Zhang et al. 1992). Dieses Verhalten der PP1 α aus *E. coli* steht im Gegensatz zur Charakteristik der nativen PP1 (Endo et al. 1997, Silberman et al. 1984). Die lösliche Expression der PP1 α in *E. coli* ist ungewöhnlich, da in Insektenzellen Proteine in der Regel eher löslich exprimiert werden als in Bakterienzellen (Kashima et al. 1999).

Probleme mit der Löslichkeit der PP1 sind jedoch nicht erst seit den ersten Expressionsversuchen bekannt. Versuche, die aus Gewebe isolierte native PP1 (Gratecos et al. 1977) anzureichern, führten zu einem drastischen Verlust an Protein und auch die PP1 α aus *E. coli* ließ sich nicht im Mengenbereich von mg/ml aufkonzentrieren (Zhang et al. 1992). Dies ist nicht überraschend, da die katalytische Untereinheit der PP1 selten frei in der Zelle auftreten sollte, sondern vielmehr an inhibitorische und regulatorische Untereinheiten gebunden ist, die ihr die nötige Enzymspezifität und Regulation verleihen. Als Untereinheit von verschiedenen Holoenzymen sollte die PP1 Oberflächenstrukturen hydrophober Natur besitzen, die es ihr ermöglichen, Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Untereinheiten einzugehen. In Abwesenheit anderer Untereinheiten könnte es zu einer kompetitiven Reaktion zwischen der Faltung des naszierenden Polypeptids in eine (relativ

instabile) aktive Tertiärstruktur und der Aggregation zu unlöslichem inaktivem Material kommen. Dieser Wettbewerb würde unter Bedingungen einer Anreicherung des Enzyms (Aufkonzentrierung oder starke Überexpression) zugunsten der Ausfällung des Polypeptids verzerrt (Kiefhaber et al. 1991). Die gefundenen Bedingungen bei der späteren Renaturierung der aggregierten Sf21 His-PP1 scheinen diese These retrospektiv zusätzlich zu stützen: Erstens war ein schneller Wechsel von denaturierenden zu nativen Konditionen essentiell, zweitens förderte eine hohe Ionenstärke (0.8M NaCl) die Renaturierung und drittens war eine sehr niedrige Proteinkonzentration für die Ausbildung der aktiven Konformation entscheidend.

Optionen zur Verbesserung der Löslichkeit unlöslich exprimierter Proteine

1. Senkung der Expressionsrate: In *E. coli* konnte der Faltungsprozeß durch eine langsamere Syntheserate positiv beeinflusst werden. Hierzu wurde einerseits ein schwächerer Promotor verwendet (s. o.) und andererseits die Wachstumsbedingungen durch eine niedrigere Kulturtemperatur (26-27°C, anstelle von 37°C) verlangsamt (Zhang et al. 1992). Die PP1 α aus *E. coli* blieb jedoch, wie bereits erwähnt, Mn²⁺-abhängig. Ein Wechsel vom starken Polyhedrin-Promotor hin zum AcNPV basic-Promotor moderater Aktivität ist auch im Baculovirus-Expressionssystem möglich. Dabei sollen in Insektenzellen vor allem die post-translationalen Modifikationen der Proteine leichter vervollständigt werden, da die viral bedingten hohen Expressionsraten möglicherweise die Kapazität der Zelle überschreiten (Bonning et al. 1994, Hill-Perkins und Possee 1990).

2. Chaperone zur Unterstützung einer korrekten Tertiärstruktur: Möglicherweise ist für eine korrekte Faltung der PP1 *in vivo* die Anwesenheit sog. Chaperone notwendig. Dies sind Proteine, die den gerade entstehenden Polypeptiden zu einer korrekten Faltung der Tertiärstruktur verhelfen, ohne selbst Teil dieser Proteine zu werden (Ellis und Hemmingsen 1989, Fink 1999). In diesem Zusammenhang wurde über den I₂ als natives Chaperon der PP1 spekuliert (Alessi et al. 1993, MacKintosh et al. 1996). So konnte Mn²⁺-abhängige PP1 aus *E. coli* mit I₂ einen Komplex bilden, der durch GSK-3-katalysierte Phosphorylierung des I₂ zu einer Mn²⁺-unabhängig aktiven PP1 reaktiviert werden konnte (vgl. 1.2.1.).

Der Weg über die unlösliche Form der Sf21 His-PP1

In der vorliegenden Arbeit wurde für das weitere Vorgehen jedoch nicht der Weg über eine Erhöhung des Anteils an löslicher Sf21 His-PP1 gewählt, sondern versucht, durch Renaturierung der unlöslichen PP1 aus dem Sediment aktive Sf21 His-PP1 zu

erlangen. Der Hauptgrund für diese Entscheidung war, daß sich einerseits durch die großen Mengen an sehr reiner Sf21 His-PP1 die Arbeit aus dem Sediment anbot und andererseits für die unlösliche Sf21 PP1 bereits eine Methode zur Renaturierung beschrieben worden war, die auf direktem Weg zu Mn^{2+} -unabhängiger Sf21 PP1 führte (Berndt und Cohen 1990).

Ein weiterer Grund, den Weg über die Renaturierung der unlöslichen Sf21 His-PP1 zu gehen, waren die Erfahrungen mit einer Sf21 PP2A (Aleth 2002). Versuche, den löslichen Anteil dieses in Insektenzellen ebenfalls in unlöslicher Form exprimierten Enzyms durch Verwendung eines schwächeren Promotors (AcNPV basic-Promotor) oder die Koexpression mit PP2A-Untereinheiten bzw. Hitzeschockproteinen zu steigern, brachten nur leichte Verbesserungen, die für eine Gewinnung des Enzyms im präparativen Maßstab nicht ausreichend waren. Aufgrund der hohen Homologie der Proteinsequenzen von PP1 α (Ratte) und PP2A α (Maus), die in den zentralen katalytischen Domänen (PP1 α AS 41-273; PP2A α AS 34-266) bis zu 50% beträgt, schienen vergleichbare Versuche mit der Sf21 His-PP1 wenig Erfolg versprechend.

5.2.3. Renaturierung der unlöslichen Sf21 His-PP1

Entsprechend den Ergebnissen für die Sf21 PP1 war es auch bei der Sf21 His-PP1 möglich, das unlösliche Enzym unter denaturierenden Bedingungen in 6M Guanidinium nahezu quantitativ in Lösung zu bringen und unter Minimierung intermolekularer Wechselwirkungen (schnelle, starke Verdünnung bei hoher Salzkonzentration) sowie essentieller Mangansubstitution zu reaktivieren. Es sei angemerkt, daß unlösliche PP1 α aus *E. coli* (Expression unter T7-Promotor) unter vergleichbaren Renaturierungsbedingungen wie bei der Sf21 PP1 ebenfalls reaktivierbar war, aber keine vollständige Renaturierung (nur 5%) erreicht werden konnte und die renaturierte PP1 α aus *E. coli* Mn^{2+} -abhängig blieb (Zhang et al. 1992). Dieser Unterschied stellt einen weiteren Hinweis dar, daß es sich bei PP1 α aus *E. coli* und Sf21-Zellen um nicht miteinander vergleichbare Enzympräparation handelt, was möglicherweise auf den in *E. coli* fehlenden post-translationalen Proteinmodifikationen beruht.

Die meisten Berichte über PP1-Präparationen aus natürlichen Quellen sprechen von einem Enzym, das für die volle Aktivität nicht auf die Substitution von Metallionen angewiesen ist (Brandt et al. 1975, Endo et al. 1997, Gratecos et al. 1977, Silberman et al. 1984, Stralfors et al. 1985). Wie jedoch seit langem bekannt ist, kann die PP1-

Aktivität durch Mangan beeinflusst werden (Yan und Graves 1982). Zum Beispiel verliert das native Enzym bei der Lagerung langsam an Aktivität und kann durch Präinkubation mit Mangan reaktiviert werden (Brautigan et al. 1982, Endo et al. 1997). Andererseits wird die undegradierete PP1 durch Mangan inhibiert (Brandt et al. 1975, Endo et al. 1997, Silberman et al. 1984). Ein weiteres Beispiel für Mn^{2+} -aktivierte PP-Formen ist der Komplex der PP1 mit ihrem I_2 , in dem die PP einer Konformationsänderung unterworfen ist, die zu einer inaktiven PP1-Form führt (s. 1.2.1.). Die Behandlung dieses Komplexes mit Trypsin degradiert den I_2 und es wird eine inaktive PP1 erhalten, die durch Mangan reaktiviert werden kann (Ballou et al. 1983, Brautigan et al. 1982). Ebenso führt die physikalische Trennung des Komplexes zu einer Mn^{2+} -reaktivierbaren PP1 (Villa-Moruzzi et al. 1984). Dies zeigt, daß es eine durch Konformationsänderung inaktive PP1-Form gibt, die durch Mangan wieder zur aktiven Form interkonvertiert werden kann. Dabei legen die relativ hohen Mangankonzentrationen (1 mM) nahe, daß dieses Ion in der Renaturierung eher für die Stabilisierung einer intermediären Konformation als für eine stöchiometrische Bindung an das Enzym entscheidend ist.

Die Kristallstrukturanalyse der PP1 α aus *E. coli* (PP1 γ_1 /WO₄: Egloff et al. 1995, PP1 γ_1 /G_M[63-75]: Egloff et al. 1997, PP1 α /MC: Goldberg et al. 1995) zeigte jedoch, daß diese Enzymklasse zwei Metallionen im Zentrum eines konservierten Phospho-esterasemotivs enthält. In der PP1 aus *E. coli* scheinen dies Fe²⁺ und Mn²⁺ zu sein. In der nativen PP1 ist die Identität der beiden Ionen ungeklärt. Studien mit den verwandten PPs PP2A und PP2B legen jedoch Fe²⁺ und Zn²⁺ als Kandidaten nahe (Griffith et al. 1995, King und Huang 1984, Nishito et al. 1999). Der Austausch von Mn²⁺ gegen Zn²⁺ in der PP1 aus *E. coli* könnte auf die Substitution von Mn²⁺ während der Expression in Kultur zurückzuführen sein, ohne die es zur Aggregation des Enzyms in der Zelle kommt (Alessi et al. 1993, Egloff et al. 1995, Zhang et al. 1992).

5.2.4. Manganabhängigkeit der reaktivierten Sf21 His-PP1

Nach der Reaktivierung durch Mangan ist die Sf21 PP1 anschließend wieder Mn^{2+} -unabhängig. Die Sf21 His-PP1 blieb jedoch nach der Reaktivierung Mn^{2+} -abhängig, ist also nicht zu einer spontanen Konversion von der Mn^{2+} -abhängigen zur Mn^{2+} -unabhängigen Konformation fähig. Die Sf21 His-PP1 nimmt somit eine Zwischenstellung zwischen den beiden bisher bekannten Expressionsformen der PP1 ein: einerseits wird sie wie die SF21 PP1 als unlösliches Aggregat exprimiert, ist aber vollständig zu reaktivieren und andererseits bleibt sie wie die löslich exprimierte

PP1 α aus *E. coli* Mn²⁺-abhängig. Dies ist überraschend, da davon ausgegangen wurde, daß die Manganabhängigkeit der PP1 α aus *E. coli* auf fehlende post-translationale Modifikation des Enzyms zurückzuführen sei.

Die Sf9 PP1

Auf den ersten Blick scheint es, als ob die Histidin-Markierung der PP1 die anhaltende Manganabhängigkeit nach sich zog. Möglicherweise könnte diese Markierung, welche die native Proteinsequenz N-terminal um 48 AS (15%) verlängert, zu einer Konformationsänderung des Enzyms führen. Mittlerweile wurde jedoch die Expression einer PP1 in Sf9-Insektenzellen beschrieben, die es unwahrscheinlich erscheinen läßt, daß die Histidin-Markierung allein für die Manganabhängigkeit der Sf21 His-PP1 verantwortlich ist (Watanabe et al. 2001). In dieser Arbeit wurde das Enzym zu 50% in löslicher Form exprimiert und war Mn²⁺-unabhängig voll aktiv. Die PP1 α (Kaninchen) war auf zwei Weisen N-terminal markiert: einerseits mit einer Sequenz aus sechs Histidinmolekülen, gefolgt von einer TEV-Protease-Erkennungssequenz (His-TEV-) und andererseits mit einer Sequenz aus His-TEV-GST-TEV-FLAG-. Das heißt, die PP1 war im ersten Fall ähnlich der Sf21 His-PP1 markiert und im zweiten Fall sogar mit einer sehr viel längeren N-terminalen Sequenz (> 22 kDa) versehen. Eine Beeinflussung der PP1-Aktivität durch N-terminale voluminöse Markierungen scheint somit nicht zu bestehen und sollte daher nicht der Grund für die veränderten Eigenschaften der Sf21 His-PP1 sein.

Abgesehen von der in der His-TEV-Version der Sf9 PP1 um 50% kürzeren Markierung (22 AS) ist im Vergleich zur Sf21 His-PP1 (bzw. Sf21 PP1) kein Unterschied in der Methodik zu erkennen. Die einzige Veränderung besteht im Wechsel der zur Expression verwendeten Zelllinie von Sf21- zu Sf9-Insektenzellen. Beide Zelllinien leiten sich von der ursprünglichen Zelllinie IPLB-SF-21 ab, die aus Ovarienzellen der amerikanischen Schmetterlingsart *Spodoptera frugiperda* erzeugt wurde (O'Reilly et al. 1992, Smith et al. 1985, Summers und Smith 1987, Vaughn et al. 1977). Die Sf9-Zelllinie ist eine monoklonale Zelllinie, deren Zellen im Vergleich zu Sf21-Zellen kleiner und von einheitlicher Größe sind. Aufgrund des gemeinsamen Ursprungs der Zelllinien wäre anzunehmen, daß sie vergleichbare Eigenschaften besitzen. In Studien der letzten Jahre wurden jedoch Unterschiede aufgezeigt.

Der auffälligste ist die häufig schwächere Proteinexpression in Sf9-Zellen im Vergleich zu anderen Insektenzelllinien (Heitz et al. 1997, Hink et al. 1991, Kulakosky und Klinge 2003, Mukherjee et al. 1995). Auch bei der Sf9 PP1 zeigte sich eine

schwächere Proteinexpression ($< 20 \mu\text{g}/10^7$ Zellen), wohingegen die Expression bei Sf21 His-PP1 und Sf21 PP1 vergleichbar und sehr stark war ($> 100 \mu\text{g}/10^7$ Zellen), obwohl niedrigere Infektionsraten verwendet wurden (MOI 3 (Sf21 His-PP1) und 1 (Sf21 PP1) vs. MOI 5-10 (Sf9 PP1)). Wie unter 5.2.2. diskutiert, könnte eine niedrigere Proteinexpression die korrekte Faltung des naszierenden Polypeptids in eine aktive, lösliche Tertiärstruktur fördern und den höheren Anteil an löslicher Sf9 PP1 (50% löslich) im Vergleich zu den Versuchen in Sf21-Zellen (ca. 90% unlöslich) erklären. Gleichzeitig würde eine schwächere Proteinexpression in Sf9-Zellen das Enzymsystem der Zellen nicht so stark belasten und eine unvollständige post-translationale Modifikation der Enzyme würde vermieden.

Darüber hinaus erfolgt die ohnehin schwächere Expression in Sf9-Zellen langsamer als in Sf21-Zellen. So wird für die Sf9 PP1 ein Expressionsmaximum bei 48-72 h (für Sf9 PP2B bei 72-80 h (Perrino et al. 1992)) angegeben, wohingegen das Maximum in Sf21-Zellen bei 45 h (Sf21 His-PP1) bzw. 42 h (Sf21 PP1) liegt. Diese langsamere Expression, bedeutet mehr Zeit für eine korrekte Faltung und post-translationale Modifikation des Polypeptids und damit für den Erhalt der nativen Eigenschaften.

Auch könnten unterschiedliche Muster post-translationaler Modifikation (Davis et al. 1993) sowie veränderte proteolytische Aktivität (Heitz et al. 1997) der Zelllinien die verschiedenen Eigenschaften der Sf9 PP1 und Sf21 His-PP1 erklären. Ungeklärt bleibt hingegen die Frage, warum die Sf21 His-PP1 analog zur PP1 α aus *E. coli* und im Gegensatz zur Sf21 PP1 nach der Renaturierung nicht von der Mn²⁺-abhängigen zur Mn²⁺-unabhängigen Form konvertierbar war und ob, wenn nicht im aktiv exprimierten Enzym (vgl. Sf9 PP1), so doch im Renaturierungsschritt die Histidin-Sequenz dabei ausschlaggebend ist (vgl. Modell bei Villa-Moruzzi et al. 1984). Ebenso könnte die unterschiedliche Methodik der Charakterisierung der Sf21 PP1 und der Sf21 His-PP1 mit dem Phosphorylase a- bzw. pNPP-Assay eine Rolle spielen (Ballou et al. 1983, Endo et al. 1997).

Zusammenfassend stellte sich die PP1 α als Metalloenzym dar, das als Monomer zu hydrophoben Protein-Protein-Wechselwirkungen neigt und bei dem die exakte Tertiärstruktur für die feste Bindung der Metallionen im aktiven Zentrum essentiell erscheint.

5.3. Glattmuskelspezifische Überexpression der PP1 α in transgenen Mäusen

5.3.1. Zielsetzung

Es konnte bisher ein Mechanismus der Ca²⁺-unabhängigen glattmuskulären Kontraktion aufgezeigt werden, der eine Hemmung der PP1- und/oder PP2A-Aktivität einschließt (5.1.). Untersuchungen zu den Auswirkungen einer Steigerung der PP-Aktivität in den verwendeten Modellen waren aufgrund der starken Manganabhängigkeit der in Insektenzellen exprimierten PP1 α jedoch nicht möglich (5.2.). Um dennoch die Folgen einer Erhöhung der PP-Aktivität in der vaskulären glatten Muskulatur gezielt untersuchen zu können, sollte, anstelle der Expression der PP1 α in einem artifiziellen System (Invertebraten, virales Transfektionssystem) und der Untersuchung in *ex vivo*-Modellen, in einem nächsten Schritt der Versuch unternommen werden, die PP1 α gewebespezifisch direkt in Säugetieren zu exprimieren und *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten transgene Mäuse generiert werden.

Die Generierung von Mäusen mit einer Überexpression der PP1 α in der vaskulären, glatten Muskulatur erfordert einen murinen Promotor, der die Transkription des Fremdgens gewebespezifisch regulieren kann. Hierfür wurde das minimale Promotorfragment (bp -445 bis +62) des SM22 α -Gens verwendet (Li et al. 1996b, Moessler et al. 1996, Solway et al. 1995). SM22 α (syn.: Transgelin, WS3-10, p27) ist ein 22 kDa schweres Protein des Zytoskeletts. Es wird postnatal spezifisch in vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen exprimiert (Li et al. 1996a, Zhang et al. 2001). Die genaue Funktion von SM22 ist unbekannt.

Das minimale Promotorfragment von SM22 ist ab dem Tag E8.5 der Embryogenese zunächst in kardialer, skelettaler und arterieller glatter Muskulatur transkriptional aktiv. Ab Tag E14.5 bis in das Erwachsenenalter hinein ist die Aktivität jedoch auf die arterielle glatte Muskulatur beschränkt, und auch in venösen und viszeralen glatten Muskelzellen tritt, im Gegensatz zur Expression des endogenen SM22-Proteins, keine Promotoraktivität auf. (Li et al. 1996b, Moessler et al. 1996, Xu et al. 2003).

5.3.2. Genotyp ohne Phänotyp

Wie unter 4.3. beschrieben, konnten zwei transgene Mauslinien etabliert werden, die das Transgen stabil weitervererbten. Die geschlechtsunabhängige Vererbung des Transgens nach den Mendel-Gesetzen legt dabei eine Integration in ein einzelnes

Chromosom nahe. Die Sequenz der Expressionskassette entsprach den Erwartungen und enthielt alle für eine erfolgreiche Expression notwendigen Elemente. Im Southern Blot konnten Fragmente genomischer DNA detektiert werden, deren Größe der Länge der Expressionskassette entsprachen. Dieser Befund weist auf eine multiple Integration der Expressionskassette hin, die in einem Cluster von in Kopf-zu-Schwanz-Orientierung verketteten Kassetteneinheiten erfolgte. Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, daß die Expressionskassette unversehrt, vollständig und in mehreren Kopien in das Mausgenom integriert wurde. Dennoch ließ sich auf Proteinebene keine veränderte Expression der PP1 α im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen feststellen und beide transgenen Mauslinien zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Mauslinien besaßen somit einen veränderten Genotyp ohne ein entsprechendes Korrelat im Phänotyp zu zeigen.

Die Gründe für dieses Phänomen können vielseitig sein, und eine eindeutige Erklärung ist aufgrund des komplexen Modells der transgenen Maus schwer zu finden. Dennoch sollen im folgenden verschiedene Hypothesen auf den Ebenen der Transkription und der Translation diskutiert werden.

5.3.3. Transkription

Nach Mikroinjektion in den Vorkern einer fertilisierten Eizelle (Ein-Zell-Embryo) integriert die Fremd-DNA meist in mehreren, direkt gekoppelten Kopien (10-1000). Die Integration in die Chromosomen erfolgt dabei an einem willkürlichen Ort im Genom durch irreguläre Rekombination. Auf diese Weise integrierte Fremdgene sind häufig chromosomalen Positionseffekten ausgesetzt, die das Expressionsniveau negativ beeinflussen können (Bishop 1996).

Es konnte gezeigt werden, daß die Kombination der SM22-Promotorsequenz mit Verstärker-Sequenzen (*Enhancer*) anderer Promotoren die *in vitro*-Expression von Zielgenen steigern konnte (Ribault et al. 2001). Umgekehrt können zufällig am Integrationsort vorhandene, gegenteilig wirkende Sequenzen (*Silencer*) die Transkription abschwächen. Integriert das Transgen in eine transkriptional inaktive Heterochromatinregion, kommt es zu keiner Expression des Fremdgens. Als Heterochromatin wurden ursprünglich die Teile von Chromosomen bezeichnet, die während der Interphase kondensiert bleiben. Diese Bereiche sind von sehr niedriger Gendichte (Dillon und Festenstein 2002, Henikoff 2000, Hennig 1999).

In letzter Zeit wurden neue Hypothesen zur Initiation einer Unterdrückung der transkriptionalen Aktivität in einzelnen DNA-Abschnitten oder ganzer Chromosomen (z. B. X-Chromosom) durch Heterochromatin entwickelt. Sequenzwiederholungen können dabei eine Heterochromatinisierung provozieren. Diese DNA-Sequenzen haben allein keine *Silencer*-Funktion (sog. *Protosilencer*), können jedoch interagieren und gemeinsam eine Heterochromatindomäne begründen. Isolierte oder in geringer Wiederholungszahl vorliegende *Protosilencer*-Sequenzen wurden ebenfalls in Promotorregionen gefunden, wo sie an der transkriptionalen Aktivierung beteiligt sind (Fourel et al. 2002).

Bei der Generierung transgener Mäuse werden mehrere Kopien von promotorhaltigen Expressionskassetten verkettet und in das Genom integriert (Bishop 1996). Die Überschreitung eines Schwellenwerts an gekoppelten *Protosilencern* würde der Hypothese nach einen Zusammenschluß dieser neutralen oder transaktivierenden Elemente zu heterochromatinisierenden Domänen bewirken und zur transkriptionalen Inaktivierung des Fremdgens führen (Fourel et al. 2002, Henikoff 1998). Dementsprechend konnte gezeigt werden, daß eine Reduktion der Kopienzahl eines Transgens in einer transkriptional inaktiven Mauslinie zu einer Expression des Fremdgens führte (Garrick et al. 1998). Dieser Mechanismus transkriptionaler Inaktivierung (*silencing*) von (Fremd)genen scheint nicht direkt an die Eigenschaften des Gens oder des Promotors gebunden zu sein. Somit stellt das bei den SM22-PP1 α -Mäusen beobachtete Phänomen (Genotyp ohne Phänotyp) ein generelles Problem der Methodik der zufälligen DNA-Integration nach Mikroinjektion dar.

5.3.4. Translation

Carr et al. (2002) konnten eine transgene Mauslinie generieren, in der die PP1 α herzspezifisch dreifach überexprimiert war. Die Expression stand in diesen Tieren unter der Kontrolle des Promotors der kardialen α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α MHC). In die Expressionskassette der SM22-PP1 α -Maus wurde die reine codierende Sequenz der PP1 α integriert. Die Expressionskassette der α MHC-PP1 α -Maus enthielt zusätzlich zur codierenden Sequenz Teile untranslatierter Regionen (UTR). Genaue Angaben über die verwendeten UTRs und ob es sich dabei um 5'- und/oder 3'-UTRs handelt, werden in der Publikation nicht gemacht. Die verwendeten PP1 α Sequenzen umfassen jedoch 1.8 kb, während die reine codierende Sequenz 993 bp groß ist.

Seit längerem ist bekannt, daß 5'- und 3'-UTRs einen großen Einfluß auf die Translation und Stabilität von mRNAs haben. Die Integration dieser Regionen in die Expressionskassette könnte für die erfolgreiche Expression des PP1 α -Proteins entscheidend sein. Weitere Erkenntnisse zur Bedeutung der UTRs der PP1 α für die Expression wurden mit rekombinanten Adenoviren gewonnen und werden unter 5.4. diskutiert.

5.4. Adenovirale Expression der PP1 α

5.4.1. Zielsetzung

Zur funktionellen Genanalyse der PP1 α in verschiedenen Zell- und Gewebekulturen sollten in einem nächsten Schritt replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren generiert werden. Rekombinante Adenoviren können unabhängig von der Zellteilung nahezu alle Arten von Säugetierzellen infizieren und sind innerhalb weniger Monate herzustellen. Sie sind somit im Vergleich zu transgenen Mäusen ein flexibleres und schneller zugängliches transgenes *in vivo*-Modellsystem. Es lag daher nahe, aufgrund der im Modell der transgenen Maus aufgetretenen Expressionsprobleme, zum einfacher überschaubaren und schneller umzusetzenden Modell der rekombinanten Adenoviren zu wechseln. Neben den methodischen Vorteilen der rekombinanten Adenoviren bietet ihre Verwendung darüber hinaus die Option des späteren Einsatzes in gentherapeutischen Experimenten.

5.4.2. Ad-PP1 und Ad-His-PP1

Die rekombinanten adenoviralen Genome Ad-PP1 und Ad-His-PP1 waren beide befähigt, in HEK293-Zellen replikationsfähige rekombinante Adenoviren zu bilden. Verschiedene Zellkulturen konnten infiziert werden und beide Viren exprimierten das Reportergen GFP in Abhängigkeit von der eingesetzten Viruskonzentration. Dennoch blieb eine Expression der PP1 α bzw. der His₆-PP1 α aus und auch auf RNA-Ebene konnten keine PP1-Transkripte detektiert werden. Dies ist überraschend, da das adenovirale Genom nicht in das Säuger genom integriert, sondern extrachromosomal verbleibt. Eine Hemmung der Transkription durch Einflüsse des Integrationsortes oder der Integrationsform, wie unter 5.3.3. für transgene Mäuse diskutiert, kann somit ausgeschlossen werden. Vielmehr ist im *in vitro* generierten adenoviralen Genom die vollständige Kontrolle der Umgebung der Expressionskassette gegeben.

Gleichzeitig zeigt die Expression von GFP die Effizienz des rekombinanten Genoms im allgemeinen und der Expressionsbausteine CMV-Promotor und pA im speziellen. Aufgrund des identischen Aufbaus der GFP-Expressionskassette und der PP1- bzw. His-PP1-Expressionskassetten, sollte die fehlende Expression daher auf die Eigenschaften der PP-Sequenzen *per se* zurückzuführen sein. Ein Fehler in der PP1-Sequenz ist dabei auszuschließen, da durch Sequenzierung ihre Unversehrtheit bestätigt werden konnte. Des Weiteren konnte für die His-PP1-Sequenz die Fähigkeit zur Expression der PP1 bereits im Baculovirussystem und damit zumindest in Invertebratenzellen nachgewiesen werden.

Die codierende Sequenz an sich hat in der Regel keinen Einfluß auf die Regulation der Genexpression. Statt dessen können die untranslatierten Regionen (UTR) der mRNA über eine Vielzahl von Mechanismen in die post-transkriptionale Genregulation hemmend wie fördernd involviert sein. Hieran sind sowohl die 5'- als auch die 3'-UTRs beteiligt. Protein-vermittelt kommt es zwischen der 5'- und der 3'-UTR zu einer Interaktion, die in der Formierung einer internen mRNA-Schleife resultiert. Dieser Kurzschluß reguliert die Initiation der Translation und stellt einen Schutz vor Translation degradierter RNA dar (Mazumder et al. 2003). Die Expression der His₆-PP1 α in Insektenzellen könnte auf einer geringeren Bedeutung der UTRs in Invertebraten beruhen. Die durchschnittliche 3'-UTR-Länge in Invertebraten liegt bei ~280 nt, in Pilzen bei ~200 nt und in Nagetieren bei 420 nt. Die 3'-UTR-Länge nimmt folglich mit dem Organisationsgrad der Spezies zu (Pesole et al. 2002).

Im Fall der rekombinanten PP1-Adenoviren konnte keine mRNA detektiert werden. Diese Beobachtung könnte durch zwei der bisher bekannten Mechanismen post-transkriptionaler Expressionskontrolle bedingt sein:

1. Beschleunigter Zerfall des Transkripts durch verminderte mRNA-Stabilität (Hollams et al. 2002, Misquitta et al. 2001).
2. Durch doppelsträngige RNA (dsRNA) induzierte RNA-Interferenz (RNAi), die zum Abbau homologer (transgener) mRNA zu ~22 nt langen Fragmenten führt (Hannon 2002, Saunders und Barber 2003, Waterhouse et al. 2001).

5.4.3. Ad-PP1-UTR

Um die Hypothese der Relevanz von UTRs (vgl. 5.3.4. und 5.4.2.) für eine erfolgreiche Expression der PP1 zu prüfen, wurde ein rekombinantes adenovirales Genom generiert, in dem zusätzlich zur codierenden Sequenz der PP1 α 68 bp der PP1 α -5'-

UTR und 357 bp der PP1 α -3'-UTR integriert waren. Die 3'-UTR-Sequenz beinhaltete beide endogenen pAs und sollte hierdurch die Präsenz aller in diesem Bereich relevanten endogenen UTR-Sequenzen garantieren.

Nach Transfektion des Ad-PP1-UTR-Genoms zeigte ein Großteil der HEK293-Zellen eine GFP-Expression. In den nachfolgenden Infektionszyklen konnten jedoch keine infektiösen Adenoviren erhalten werden. Die im ersten Infektionszyklus vereinzelt auftretenden fluoreszierenden Zellen lösten auch nach Lyse nicht die Bildung viraler Plaques aus, wie es zuvor bei den PP1-Viren regelmäßig zu beobachten war (s. 4.4.1.). Das Auftreten einzelner fluoreszierender Zellen in der ersten Infektion scheint insofern eher auf eine zufällige Absorption von unverhüllter, aus der Transfektion verschleppter, adenoviraler DNA zurückzuführen zu sein, als daß es sich um eine echte Infektion handelte.

Warum das Ad-PP1-UTR-Genom im Vergleich zu den beiden Vorgänger-Viren nicht die Fähigkeit besaß in HEK293-Zellen replikationsfähige Adenoviren zu bilden konnte abschließend nicht geklärt werden. Es sind jedoch mehrere direkte Wechselwirkungen zwischen viraler Transkription bzw. viralen Proteinen und PPs bekannt. Hierzu zählen z. B. von PP1 modulierte anti-virale Mechanismen (Tan et al. 2002), die PP1 regulierte Transkription des HIV-1 (Ammosova et al. 2003) und die durch Interaktion von PP2A mit viralen Proteinen von Adenoviren und Simian-Virus ausgelöste Apoptose (Van Hoof und Goris 2003). Diese Beobachtungen in anderen viralen Systemen könnten Erklärungsansätze dafür bieten, wie eine Expression der PP1 der Bildung replikationsfähiger, infektiöser Adenoviren entgegenwirkt. Inwiefern die 3'-UTR für die PP1 α -Expression funktionelle Bedeutung hat und ob dies die Bildung von Adenoviren verhindert bleibt jedoch Spekulation.

5.5. Adenovirale Expression des I₂ der PP1

5.5.1. Zielsetzung

Die bisherigen Versuche, die PP1 α im Baculovirussystem (5.2.), in transgenen Mäusen (5.3.) oder adenoviral (5.4.) überzuexprimieren, gestalteten sich schwierig. Ob es sich dabei um einen ausgeprägten zellulären Kontrollmechanismus der PP1 α -Expression oder Abwehrmechanismen gegen Fremd-DNA handelte, konnte nicht geklärt werden. Gleichmaßen ist die Überexpression eines solchen für eine Vielzahl zellulärer Regulationsmechanismen wichtigen Enzyms möglicherweise schwer mit dem Leben vereinbar. Aus diesem Grund sollte es eher möglich sein, anstelle des Effektors selbst, ein Protein, das an der Regulation der PP1 beteiligt ist überzuexprimieren. Über diesen Weg könnten ebenfalls weitere Erkenntnisse zur Funktion der PP1 und ihrer Regulation erhalten werden.

In einem ersten Schritt sollte der Inhibitor 2 der PP1 (I₂) in einem adenoviralen Expressionssystem überexprimiert werden. Die Hemmung der PP-Aktivität durch den I₂ hätte dabei gegenüber der exogenen Zugabe von relativ unselektiven Hemmstoffen wie z. B. Cantharidin den entscheidenden Vorteil einer hochselektiven Hemmung der PP1. Die Überexpression des I₂ in intakten Zell- oder Organsystemen, wie z. B. in den bereits beschriebenen Kontraktionskraftexperimenten mit Gefäßringen der Aorta (5.1.), würde eine eindeutigere Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Funktionen in der Zelle ermöglichen.

5.5.2. Expression und inhibitorischer Effekt des I₂

Das rekombinante adenovirale Genom Ad-I₂ bildete in HEK293-Zellen replikationsfähige Adenoviren. Der generierte Virus infizierte H9c2-Zellen und exprimierte sowohl das Reporter-gen GFP als auch das Zielgen I₂ erfolgreich. Die Expression des I₂ deutet mit Blick auf die PP1 α -Viren (s. 5.4.) darauf hin, daß ein methodisches Problem bei der Generierung der PP1 α -Viren als Grund für die fehlende Expression der PP1 α wahrscheinlich auszuschließen ist.

Sowohl die Expression des GFP als auch des I₂ war von der eingesetzten Viruskonzentration abhängig. Bei der Infektion von H9c2-Zellen mit Ad-Ktr. und Ad-I₂ war jedoch die Expression von GFP in Ad-Ktr. gegenüber Ad-I₂ um den Faktor Drei erhöht. Die anfängliche Vermutung eines Fehlers bei der Bestimmung der Virustiter konnte durch eine erneute Titerbestimmung ausgeräumt werden. Indes zeigte sich bei Einsatz gleicher Viruskonzentrationen eine gleiche Anzahl Fluoreszenz-positiver

Zellen; allerdings war die Intensität der grünen Fluoreszenz der einzelnen Zelle in Ad-Ktr. vs. Ad-I₂ erhöht. In Ad-Ktr. liegt dem Anschein nach eine stärkere Expression von GFP je Viruspartikel vor. Dieses Verhalten könnte von der doppelten CMV-Promotorsequenz im Ad-Ktr. herrühren (vgl. Abb. 3.5.) oder auf ein vermindertes Substratangebot beim zwei Fremdgene exprimierenden Ad-I₂ zurückzuführen sein.

Eine Expression von I₂ in H9c2-Zellen zeigte sich nur in Ad-I₂. Das Molekulargewicht des Signals von ca. 31 kDa entspricht dabei den Literaturangaben für I₂ (Helps et al. 1994, Roach et al. 1985). Sowohl in H9c2-Zellen als auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte in NI oder Ad-Ktr. kein endogenes I₂-Signal detektiert werden. Diese Beobachtung ist jedoch vermutlich nicht auf die Abwesenheit oder geringe Expression des endogenen I₂ zurückzuführen, sondern durch die Eigenschaften des Antikörpers bedingt. Der verwendete monoklonale Antikörper ist gegen die Aminosäuren 1-144 des humanen I₂ gerichtet und speziesspezifisch. In Ratten- und Mausgewebe kann daher mit diesem Antikörper kein I₂-Nachweis erfolgen. Der in Zellen dieser Spezies adenoviral exprimierte humane I₂ wird daher praktisch auf einem Nullhintergrund detektiert. Während der Virusgenerierung in humanen HEK293-Zellen konnte hingegen ein endogenes I₂-Signal in NI wie Ad-Ktr. mit diesem Antikörper identifiziert werden. In HEK293-Zellen erschien das exogene wie endogene I₂-Signal im Vergleich zur Expression in Rattenzellen als schmales Doppelsignal. Das exogene I₂-Signal zeigte dabei ein dem endogenen I₂ entsprechendes Molekulargewicht.

Die Identität des I₂-Signals und die Spezifität des Antikörpers konnte durch die konzentrationsabhängige Unterdrückung des Signals durch rekombinanten humanen I₂ aus *E. coli* (rI₂) bestätigt werden. Das Auftreten des zur Kontrolle mitgeführten rI₂ als Dreiersignal widerspricht der Spezifikation des Herstellers (upstate biotechnology, Lake Placid, USA). Das Phänomen mehrerer Signale von in *E. coli* exprimiertem I₂ ist jedoch in der Literatur bekannt. So fanden Helps et al. (1994) bei der Expression von humanem I₂ in *E. coli* ein Doppelsignal. Das kleinere Signal konnte dabei als Degradierungsprodukt des I₂ identifiziert werden, welches durch einen Translationsstart 13 AS nach dem N-terminalen Methionin erzeugt wurde.

In den Verdrängungsexperimenten mit H9c2-Zellen konnten unabhängig von der Infektion zwei zusätzliche Signale bei ca. 37 und 45 kDa detektiert werden. In mehreren Gewebehomogenaten (u. a. Herzgewebe) von Kaninchen wurde ebenfalls eine immunoreaktive Proteinspezies von ca. 39 kDa detektiert (Roach et al. 1985). Die Identität und Bedeutung dieser höhermolekularen Spezies ist ungeklärt, obgleich

das analoge immunologische Verhalten die Frage einer funktionellen und/oder strukturellen Beziehung zum I₂ aufwirft. Hitzeinaktivierte Zellhomogenate von Ad-I₂ infizierten H9c2-Zellen konnten die PP-Aktivität rekombinanter PP1 α aus *E. coli* gegenüber radioaktiv markierter Phosphorylase a hemmen. Das heißt, der I₂ wird in aktiver Form exprimiert und besitzt einen inhibitorischen Effekt gegenüber PP1 α .

5.5.3. Expressionsverhalten der Proteinphosphatasen infolge einer I₂-Überexpression

Es wurde untersucht, ob es durch Überexpression des I₂ in H9c2-Zellen zu einer Gegenregulation auf der Ebene der PPs kommt. Weder die PP1 α noch die PP2A zeigten jedoch eine durch die I₂-Überexpression oder die virale Infektion veränderte Expression. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es im Gegensatz zu Beobachtungen im transgenen Mausmodell der α MHC-I₂-Mäuse steht (Kirchhefer et al. 2001). Diese Mäuse exprimieren herzspezifisch eine C-terminal trunkeerte, aber inhibitorisch effektive Form des humanen I₂ (AS 1-144). Die PP-Aktivität war in diesem Modell stark reduziert. Gleichzeitig kam es jedoch durch die Überexpression des I₂ zu einer deutlichen kompensatorischen Zunahme der PP1 α -Expression um den Faktor Sechs.

In den transgenen Mäusen erfolgt die Expression des I₂ unter der Kontrolle des α MHC-Promotors. Eine I₂-Überexpression besteht daher bereits von Geburt an (Gulick et al. 1991, Ng et al. 1991, Robbins et al. 1990, Subramaniam et al. 1991). Zum Zeitpunkt der Untersuchung der PP-Expression lebten die Tiere somit seit mehr als vier Monaten mit einer herzspezifischen Erhöhung der I₂-Konzentration. Im Gegensatz dazu erfahren die infizierten H9c2-Zellen einen relativ kurzfristigen Anstieg der I₂-Expression innerhalb von 72 h. Das Ausbleiben einer Gegenregulation im adenoviralen Modell könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei der kompensatorischen Expression der PP1 α im Mausmodell um einen adaptiven Langzeiteffekt handelt. Demgegenüber sind die H9c2-Zellen nicht in der Lage, kurzfristig auf Änderungen im PP-Haushalt zu reagieren.

Andererseits ist zu bedenken, daß es sich bei den exprimierten Proteinen um unterschiedliche Fragmente des I₂ handelt. Im adenoviralen System wird die gesamte humane I₂-Sequenz (204 AS) exprimiert. Das heißt, der I₂ sollte, nach dem Modell von Park und DePaoli-Roach (1994), an die PP1 binden, sie in einem ersten Schritt inhibieren und anschließend mit der PP1 einen stabilen, inaktiven Komplex,

die sog. ATP-Mg-abhängige Phosphatase, bilden (s. 1.2.1.). In dieser inaktiven Form steht die PP1 dem zellulären System jedoch weiterhin zur Verfügung und kann durch Phosphorylierung an Threonin-72 erneut reaktiviert werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem im Mausmodell exprimierten I₂ um eine C-terminal trunkierte Form (AS 1-144). Der trunkierte I₂ verhält sich wie der native I₂ gegenüber PP1 inhibitorisch und inaktivierend. Der mit dem trunkierten I₂ gebildete heterodimere Komplex der ATP-Mg-abhängigen Phosphatase entzieht sich jedoch einer Reaktivierung durch Phosphorylierung (Park und DePaoli-Roach 1994). Das heißt, eine einmal von einem trunkierten I₂ komplexierte PP1 wird aus dem PP1-Reservoir der Zelle irreversibel entfernt. Die Aufrechterhaltung einer ausreichenden zellulären PP1-Aktivität wäre unter solchen Bedingungen nur durch Neubildung von PP1 möglich, was die erhöhte Expression der PP1 α im Mausmodell erklären könnte.

5.5.4. Veränderungen der Phosphataseaktivität infolge einer I₂-Expression

Die endogene Gesamt-PP-Aktivität Ad-I₂ infizierter H9c2-Zellen war um 41% gegenüber nicht infizierten Zellen erniedrigt. Auf dem Hintergrund einer erhöhten I₂-Expression und einer anscheinend unveränderten PP-Expression entspricht diese Beobachtung dem Erwarteten. Die Untersuchungen zur PP-Expression (s. 5.5.3.) umfaßten jedoch nur die PP1 α und die PP2A. Die stark erniedrigte Gesamt-PP-Aktivität legt die Vermutung nahe, daß auch die nicht untersuchten anderen PP1-Isoformen und PP-Klassen nicht kompensatorisch in ihrer Expression erhöht sind.

Unter 10 nM OA nahm die PP-Aktivität in Ad-I₂ infizierten H9c2-Zellen relativ zu unbehandelten Ad-I₂ infizierten Zellen noch einmal um ca. 46% ab. Die relative Erniedrigung der PP-Aktivität in NI und Ad-Ktr. fiel hingegen schwächer aus (28% bzw. 32%). Dieses Bild täuscht, da es außer Acht läßt, daß in Ad-I₂ die PP-Aktivität bereits partiell gehemmt ist. Betrachtet man hingegen den absoluten Effekt von 10 nM OA, so zeigt sich eine identische Reduktion der PP-Aktivitäten in den drei Gruppen um einen Wert von im Mittel 237 cpm/ μ g. Unter der Annahme einer präferentiellen Hemmung der PP2A durch 10 nM OA festigt die gleichmäßige Reduktion der PP-Aktivität unter den drei verschiedenen Versuchsbedingungen die Vorstellung von einer durch die I₂-Überexpression unveränderten Aktivität und Expression der PP2A in Ad-I₂ infizierten Zellen. Zusätzlich wird die Annahme, daß die anfänglich beobachtete Hemmung der endogenen Gesamt-PP-Aktivität primär auf einer PP1-Hemmung und damit dem inhibitorischen Effekt des I₂ beruht, weiter bestätigt.

Diese Versuche zur PP-Aktivität in H9c2-Zellen demonstrieren anschaulich, wie der Einsatz des Ad-I₂ alleine oder in Kombination mit PP-Hemmstoffen zur Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Aktivitäten genutzt werden kann. Damit bieten sie Einblick in die Zusammensetzung der endogenen PP-Aktivität.

5.5.5. Infektion von Primärkulturen und Ausblick

Zunächst wurde der Ad-I₂ Virus in H9c2-Zellen charakterisiert, d. h. einer kontinuierlich wachsenden klonalen Zelllinie von unbegrenzter Lebensdauer, die aus embryonalem Rattenmyokard gewonnen worden war (Kimes und Brandt 1976). Solche Zelllinien bieten durch ihre einfache Handhabung und ihre unbegrenzte Lebensdauer ein einfaches Modell zur Charakterisierung rekombinanter Adenoviren. Andererseits sind ihre Eigenschaften im Vergleich zum primären Ausgangsmaterial oft im Hinblick auf Proliferationseigenschaften, Morphologie und Differenzierung verändert. Um die Qualifikation des Ad-I₂ zum Einsatz in physiologischen Experimenten mit differenzierten Zellsystemen zu charakterisieren, wurden primäre Zell- und Organkulturen infiziert. Gleichzeitig sollten hierdurch Wege aufgezeigt werden, wie und daß der Einsatz des Ad-I₂ zu Modellsystemen für die Untersuchung der Bedeutung der PP1 im kardiovaskulären System führen kann.

Neonatale Rattenkardiomyozyten zeigten eine von der Infektionszeit und der Viruskonzentration abhängige Expression des I₂. Gleichzeitig hafteten sie auch nach 72 h Infektion noch fest an der Kulturschale an und zeigten ein vitales Aussehen. In dieser Weise kultivierte und infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten können zur Messung von Calciumtransienten eingesetzt werden (Buskase et al. 2002, Methling et al. 2002). Durch die hochselektive Hemmung der PP1 könnte der Einfluß dieser PP auf Calciumkanäle und Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums genauer untersucht werden (Neumann 2002, Rapundalo 1998).

Die erfolgreiche Infektion von Gefäßringen der Maus ermöglicht die nähere Untersuchung der Funktion der PP1 für die Kontraktion der Gefäßmuskulatur. Bei den unter 5.1.4. beschriebenen Kontraktionskraftmessungen an intakten Gefäßringen stellte sich die Frage, ob neben der PP1 auch der PP2A eine Bedeutung für die Kraftentwicklung zukommt und ob diese Funktion in gehäuteten Fasern entfällt. Die Frage kam auf, weil die durch Cantharidin ausgelösten Effekte nicht eindeutig einer der beiden PP-Klassen zuzuordnen waren. Durch die hochselektive Hemmung der PP1 infolge einer adenoviralen Expression des I₂ könnte auch in intakten Gefäßen eindeutig zwischen PP1- und PP2A-vermittelten Effekten differenziert werden.

In einem nächsten Schritt wäre die Generierung eines rekombinanten Adenovirus mit gewebespezifischer Überexpression des I_2 anzustreben. Erste Berichte von adenoviralen Expressionssystemen mit glattmuskelspezifischer Überexpression von Reporter genen liegen vor (Frame et al. 2001, Kim et al. 1997b, Ribault et al. 2001). Die gewebespezifische adenovirale Expression würde die Möglichkeit einer noch feineren Differenzierung der beobachteten Effekte ermöglichen. Zum Beispiel könnte in intakten Gefäßringen der Aorta zwischen PP1-Effekten der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen unterschieden werden. Gleichzeitig würde ein solches System den Weg zu Versuchen im Ganztiermodell ebnen und damit die Tür zur Gentherapie öffnen (Thomas et al. 2003).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Untersuchungen war es, durch eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der zellulären Proteinphosphatase-Aktivität den Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC_{20}) in der vaskulären glatten Muskulatur zu variieren. Hierdurch sollte der kontraktile Status der Muskulatur und damit der Gefäßtonus Ca^{2+} -unabhängig reguliert werden.

Die Bedeutung der Proteinphosphatasen (PP) für die Regulation der Kontraktionskraft der vaskulären glatten Muskulatur konnte zunächst durch den Einsatz von PP-Hemmstoffen demonstriert werden. Als PP-Hemmstoffe dienten der unspezifischere, aber hoch potente, hydrophile Hemmstoff Microcystin LR (MC) und der spezifischere, lipophile Hemmstoff Cantharidin (Cant). Durch Cant konnte in intakten Gefäßringen, in Gegenwart von Calciumionen, eine Zunahme der Kontraktionskraft ausgelöst werden, wohingegen der hydrophile PP-Hemmstoff MC keinen Effekt zeigte. Im Gegensatz dazu konnten in gehäuteten Gefäßmuskelstreifen, in Abwesenheit von Calciumionen, sowohl Cant als auch MC eine Zunahme der Kontraktionskraft herbeiführen. In beiden Modellen wurde eine Steigerung der Kontraktionskraft jeweils von einem Anstieg der MLC_{20} -Phosphorylierung begleitet. Der biochemische Nachweis der $PP1\alpha$ und $PP2A$ in gehäuteten Fasern wies auf eine feste Bindung dieser PPs an kontraktile und/oder strukturelle Proteine hin und ein selektiver Verlust der PPs beim Häutungsprozeß konnte ausgeschlossen werden. Durch die Kontraktionskraftmessungen an gehäuteten Gefäßmuskelfasern wurde somit ein Ca^{2+} -unabhängiger Mechanismus der glattmuskulären Kontraktion aufgezeigt. Darüber hinaus konnte, da die MLCK in Abwesenheit von Calciumionen nicht aktiv ist, die basale Aktivität einer Ca^{2+} -unabhängigen Kinase der MLC_{20} demaskiert werden.

Um die Phosphataseaktivität im Modell der gehäuteten Gefäßmuskelfasern durch exogene Zugabe einzelner rekombinanter PPs steigern zu können, wurde die $PP1\alpha$ mit Hilfe eines Baculovirussystems in Sf21-Insektenzellen überexprimiert. Die Expression der $PP1\alpha$ erfolgte überwiegend in unlöslicher, inaktiver Form. Das unlösliche Enzym konnte unter denaturierenden Bedingungen in Lösung gebracht und durch schnelle, starke Verdünnung unter Mangansubstitution renaturiert werden. Im Gegensatz zur nativen $PP1\alpha$ verblieb die renaturierte $PP1\alpha$ anschließend jedoch Mn^{2+} -abhängig. So stellte sich die $PP1\alpha$ als Metalloenzym dar, das als Monomer zu hydrophoben Protein-Protein-Wechselwirkungen neigt und bei dem die exakte Tertiärstruktur für die feste Bindung der Metallionen essentiell erscheint. Der Vergleich mit anderen Expressionssystemen zeigt, daß eine verlangsamte und

weniger starke Expression der PP1 α in Insektenzellen zu einer löslichen Expression der Mn²⁺-unabhängigen PP1-Form führen wird.

Zur Untersuchung einer erhöhten Phosphataseaktivität in *in vivo*-Modellsystemen sollte die PP1 α glattmuskelspezifisch unter der Kontrolle des SM22-Promotors im Modell der transgenen Maus überexprimiert werden. Es konnten zwei transgene Mauslinien etabliert werden, die jedoch trotz verändertem Genotyp keinen veränderten Phänotyp zeigten. Durch Vergleich mit dem Modell der transgenen Maus mit erfolgreicher herzspezifischer Überexpression der PP1 α (α MHC-PP1 α -Maus) wurde das Fehlen von untranslatierten Regionen als mögliche Ursache für die fehlende Expression in Betracht gezogen. Diese These wurde mit Hilfe des flexibleren und schneller zugänglichen Modells der adenoviralen Expression von Fremdgenen in der Zellkultur überprüft. Es wurden zunächst zwei rekombinante Adenoviren generiert, die ausschließlich die kodierende PP1 α -Sequenz beinhalteten (Ad-PP1 und Ad-His-PP1). Beide Adenoviren zeigten analog dem im transgenen Mausmodell beobachteten Phänomen trotz erfolgreich verändertem Genotyp keine Expression der PP1 α . Beim Versuch der Generierung rekombinanter Adenoviren mit zusätzlich integrierten 3'UTR-Sequenzen (Ad-PP1-UTR) konnten hingegen keine rekombinanten Adenoviren erhalten werden. Den untranslatierten Regionen der PP1 α könnte daher bei der Expression des Gens in Säugetierzellen eventuell eine entscheidende Bedeutung zukommen.

Im Gegensatz dazu konnte der Inhibitor 2 der PP1 (I₂) im adenoviralen Expressionssystem in Abhängigkeit von Infektionszeit und Viruskonzentration überexprimiert werden. Der I₂ wurde in aktiver Form exprimiert und zeigte einen inhibitorischen Effekt gegenüber PP1 α . Die PP1-Aktivität der Zellhomogenate nahm ab. In infizierten H9c2-Zellen blieb dabei im Vergleich zum Mausmodell (α MHC-I₂-Maus) eine Gegenregulation auf der Ebene der PPs aus. Dies könnte entweder einen Hinweis auf einen adaptiven Langzeiteffekt im Mausmodell darstellen oder die funktionelle Relevanz der in diesem Modell fehlenden Aminosäuren (Δ 145-204 AS) des I₂ für die Regulation der PP1 durch den Inhibitor ausdrücken. Neben kontinuierlich wachsenden Zelllinien waren auch primäre Zell- und Gewebekulturen einer Infektion gegenüber zugänglich. So wurden neue Optionen erschlossen, durch adenovirale Expression des I₂ weitere aussagekräftige Modellsysteme zur Bedeutung der PP1 im kardiovaskulären System zu entwickeln. Diese Systeme könnten die Basis für zukünftige gentherapeutische Einsatzgebiete darstellen.

7. ANHANG

7.1. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Radioaktive Substanzen wurden von Hartmann Analytics (Braunschweig) oder von NEN-DuPont (Bad Homburg) bezogen. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für die Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (TKA-LAB, TKA, Niederelbert) gewonnen. Hochohmiges Wasser wurde in einer Purelab Classic-Reinstwasseranlage (Purelab Classic, USF Seral, Ransbach-Baumbach) erzeugt.

Untersuchungsmaterial

PBS pH 7.45	NaCl	137.0 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8.1 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM
	pH 7.45 autoklavieren	
Krebs-Bicarbonat-Lösung	NaCl	118.0 mM
	KCl	4.7 mM
	KH ₂ PO ₄	1.2 mM
	MgSO ₄	1.2 mM
	D-Glucose	11.1 mM
	NaHCO ₃	25.0 mM
	CaCl ₂	2.54 mM
vor der Verwendung Begasung mit Carbogen		

Kontraktionskraftmessung an intakten Gefäßringen der Maus

PSS	NaCl	118.3 mM
	NaHCO ₃	25.0 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	2.5 mM
	KCl	4.7 mM
	KH ₂ PO ₄	1.2 mM
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1.2 mM
	Glucose x H ₂ O	5.5 mM
	EDTA	0.027 mM
	vor der Verwendung Begasung mit Carbogen	

K-PSS	NaHCO ₃	25.0 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	2.5 mM
	KCl	123.0 mM
	KH ₂ PO ₄	1.2 mM
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1.2 mM
	Glucose x H ₂ O	5.5 mM
	EDTA	0.027 mM
	vor der Verwendung Begasung mit Carbogen	

Cantharidin	Sigma, Deisenhofen
Microcystin LR	Alexis, Grünberg

Kontraktionskraftmessung an gehäuteten Gefäßmuskelfasern der Maus

Häutungsgrundlösung	EGTA	5.0 mM	
	Imidazol	20.0 mM	
	KCl	50.0 mM	
	Saccharose	150.0 mM	
	Dithiothreitol	2.0 mM	
	pH 7.4 mit KOH einstellen		
Häutungslösung	EGTA	5.0 mM	
	Imidazol	20.0 mM	
	KCl	50.0 mM	
	Saccharose	150.0 mM	
	Dithiothreitol	2.0 mM	
	Leupeptin	1.0 µM	
	Triton X-100	1% (V/V)	
	pH 7.4 mit KOH einstellen		
Lagerungslösung	EGTA	4.0 mM	
	Imidazol	20.0 mM	
	ATP	7.5 mM	
	MgCl ₂ X 6H ₂ O	10.0 mM	
	NaN ₃	1.0 mM	
	pH 6.7 mit KOH einstellen		
	Glycerol	50% (V/V)	
R-Lösung	Imidazol	20.0 mM	
	ATP	10.0 mM	
	Kreatinphosphat	10.0 mM	
	MgCl ₂	12.5 mM	
	NaN ₃	5.0 mM	
	EGTA	5.0 mM	
	Dithiothreitol	1.0 mM	
	pH 7.0; in hochohmigem Wasser (18.2 MΩ·cm)		
	Lagerung in Kunststoffflaschen		
	vor Gebrauch frisch zusetzen:		
	Calmodulin	654 u/ml	
Kreatinkinase	1.0 mg/ml		

K-Lösung	Imidazol	20.0 mM
	ATP	10.0 mM
	Kreatinphosphat	10.0 mM
	MgCl ₂	12.5 mM
	NaN ₃	5.0 mM
	EGTA	5.0 mM
	Dithiothreitol	1.0 mM
	CaCl ₂	5.0 mM
	in hochohmigem Wasser (18.2 MΩ·cm)	
	pH 7.0	
	Lagerung in Kunststoffflaschen vor Gebrauch frisch zusetzen:	
Calmodulin	654 u/ml	
Kreatinkinase	1.0 mg/ml	
Cantharidin	Sigma, Deisenhofen	
Microcystin LR	Alexis, Grünberg	

Arbeitstechniken mit Proteinen

Harnstoff-Probenpuffer	Harnstoff	6.7 M
	Tris	18.5 mM
	Glycin	20.4 mM
	Dithiothreitol	9.2 mM
	gesättigte Saccharose-Lsg.	4.6% (V/V)
	Bromphenolblau	0.004% (m/V)
Homogenisationspuffer A	Tris-HCl pH 7.4	20.0 mM
	EDTA	1.0 mM
	MgCl ₂	5.0 mM
	Dithiothreitol	1.0 mM
	PMSF	1.0 mM
	Leupeptin	5.0 µg/ml
	Puffer frisch ansetzen	
Homogenisationspuffer B	Tris-HCl	50.0 mM
	NaCl	0.8 M
	Triton X-100	1% (m/V)
	MnCl ₂	1.0 mM
	pH 7.0	
	vor Gebrauch frisch zusetzen:	
	2-Mercaptoethanol	20.0 mM
Homogenisationspuffer C	Saccharose	250.0 mM
	Histidin	10.0 mM
	SDS	1.0%

SDS-PAGE-Probenpuffer	Tris-HCl	62.5 mM
	SDS	10.0% (m/V)
	Glycerol	20.0% (V/V)
	Bromphenolblau	q. s.
	pH 6.8	
	vor Gebrauch frisch zusetzen:	
	Dithiothreitol	40.0 mM
Sammelgel (4%)	Acrylamid	4.0% (m/V)
	bis-Acrylamid	0.2% (m/V)
	Tris	125.0 mM
	SDS	0.1% (m/V)
	TEMED	0.064% (V/V)
	Ammoniumpersulfat	0.1% (m/V)
	pH 6.8	
Trenngel (10%)	Acrylamid	10.0% (m/V)
	bis-Acrylamid	0.5% (m/V)
	Tris	100.0 mM
	Glycin	300.0 mM
	EDTA	60.0 μ M
	SDS	0.1% (m/V)
	Glycerol	13.3% (V/V)
	Polyacrylamid	0.2 % (m/V)
	TEMED	0.086% (V/V)
	Ammoniumpersulfat	0.04% (m/V)
	pH 8.8	
Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)	Tris	50.0 mM
	Glycin	125.0 mM
	SDS	1.0% (m/V)
	pH 8.8	
Proteingrößenstandard (Amersham Biosciences, Freiburg)	Phosphorylase b	97.0 kDa
	Albumin	66.0 kDa
	Ovalbumin	45.0 kDa
	Carboanhydrase	30.0 kDa
	Trypsininhibitor	20.1 kDa
	α -Lactalbumin	14.4 kDa
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol	25.0% (V/V)
	Eisessig	10.0% (V/V)
	Coomassie-Blau	0.15% (m/V)
	bidest. Wasser	64.85% (V/V)
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	10.0% (V/V)
	Methanol	30.0% (V/V)
	bidest. Wasser	60.0% (V/V)

Harnstoff-Glycerol-Gel (10%)	Glycerol	39.6% (V/V)
	Acrylamid	9.9% (m/V)
	bis-Acrylamid	0.5% (m/V)
	Tris	20.2 mM
	Glycin	22.3 mM
	TEMED	0.016% (V/V)
	Ammoniumpersulfat	0.05% (m/V)
Unterer Elektrodenpuffer	Tris	20.0 mM
	Glycin	22.1 mM
Oberer Elektrodenpuffer	Tris	20.0 mM
	Glycin	22.1 mM
	Dithiothreitol	2.4 mM
	Thioglycolat	2.9 mM
Transferpuffer	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	42.0 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	8.0 mM
	pH 7.4	
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0.2%
	Trichloressigsäure	3.0%
	Sulfosalicylsäure	3.0%
Puffer A	Tris	13.0 mM
	NaCl	154.0 mM
	pH 7.4	
Puffer C	Tris	13.0 mM
	NaCl	154.0 mM
	Tween 20	0.1% (V/V)
	pH 7.4	
TBS pH 7.4	Tris	10.0 mM
	NaCl	154.0 mM
	pH 7.4	
TTBS pH 7.4	Tris	10.0 mM
	NaCl	154.0 mM
	Tween 20	0.125%
	pH 7.4	
TBS pH 9.4	Tris	10.0 mM
	NaCl	154.0 mM
	pH 9.4	
AP-Puffer	NaCl	100.0 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	5.0 mM
	Triethanolamin	100.0 mM
	pH 9.4	

Albumin aus Rinderserum	Sigma, Steinheim
BCIP	biomol, Hamburg
Biorad Protein Assay Reagenz	Biorad Laboratories, München
Cellophan [®] -Papier	Biorad Laboratories, München
Coomassie-Blau	Merck, Schwalbach
ECF-Substrat	Amersham Biosciences, Freiburg
Leupeptin	Sigma, Steinheim
NBT	Sigma, Steinheim
Ponceau-S-Lösung (10 x konzentriert)	Sigma, Steinheim
Protran Nitrocellulose Membran BA 85	Schleicher und Schuell, Dassel

Arbeitstechniken mit RNA

DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat in bidest. Wasser für 12 h unter dem Abzug rühren autoklavieren	0.5% (V/V)
Präzipitationslösung	tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O NaCl in DEPC-Wasser	0.8 M 1.2 M
10 x MOPS	MOPS Natriumacetat Na-EDTA pH 7.0 autoklavieren	20.0 mM 50.0 mM 5.0 mM
denat. Agarosegel (1%)	Agarose Formaldehyd, säurefrei Ethidiumbromid in 1 x MOPS	1.0% (m/V) 2.0% (V/V) 0.5 µg/ml
Denaturierungspuffer	Formaldehyd, säurefrei Formamid, deionisiert in 1 x MOPS	8.7% (V/V) 63.3% (V/V)
Ladepuffer für RNA	Bromphenolblau-Lösung DEPC-Wasser Glycerol, autoklaviert	q. s. 50% (V/V) 50% (V/V)
10 x SSC	NaCl tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O pH 7.0 autoklavieren	1.5 M 150.0 mM

Prähybridisierungslösung	Formamid, deionisiert	50.0% (V/V)
	NaCl	0.9 M
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50.0 mM
	NaEDTA	5.0 mM
	SDS	0.2% (m/V)
	Rinderserumalbumin	0.1% (m/V)
	Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon)	0.1% (m/V)
	Ficoll 400	0.1% (m/V)
	pH 7.4	
	vor der Verwendung frisch denaturiert zugeben:	
tRNA aus Bäckerhefe	0.4 mg/ml	
2 x SSC	NaCl	300.0 mM
	tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O	30.0 mM
	pH 7.0	
2 x SSC + 0.1% SDS:	NaCl	300.0 mM
	tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O	30.0 mM
	SDS	0.1% (m/V)
	pH 7.0	
0.2 x SSC + 0.1% SDS	NaCl	30.0 mM
	tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O	3.0 mM
	SDS	0.1% (m/V)
	pH 7.0	
Ethidiumbromid 1%ig in H ₂ O	Merck, Darmstadt	
GenScreen (Art.Nr.: NEF 983)	NEN-DuPont, Bad Homburg	
Rinderserumalbumin	Sigma, Steinheim	
TriStar Reagent TM	AGS, Heidelberg	
TRizol Reagent TM	GibcoBRL/Life Technol., Karlsruhe	
tRNA aus Bäckerhefe	Roche, Mannheim	

Arbeitstechniken mit DNA

LB-Medium	Trypton	1.0% (m/V)
	Hefeextrakt	0.5% (m/V)
	NaCl	0.5% (m/V)
	pH 7.5	
	autoklavieren	
LB-Agar	Agar-Agar	1.5% (m/V)
	in LB-Medium pH 7.5	
CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂	100.0 mM
	sterilfiltrieren (Membranfilter Porengröße 0.22µm)	

TSS-Puffer	PEG 6000	10% (m/V)
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	10.0 mM
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	10.0 mM
	in LB-Medium pH 6.5	
	autoklavieren und anschließend DMSO zusetzen	
	DMSO	5% (V/V)
Waschpuffer (elektrocomp. E. coli)	Glycerol	10.0% (V/V)
	bidest. Wasser	90.0% (V/V)
	autoklavieren	
5 x KCM-Puffer	KCl	0.50 M
	CaCl ₂	0.15 M
	MgCl ₂	0.25 M
SOC-Medium	Hefeextrakt	0.5% (m/V)
	Trypton	2.0% (m/V)
	NaCl	8.5 mM
	KCl	2.5 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	10.0 mM
	Glucose x H ₂ O	20.0 mM
	pH 7.0	
	autoklavieren	
Puffer P1 (Resusp.puffer)	Tris-HCl pH 8.0	50.0 mM
	EDTA	10.0 mM
	RNase A	100.0 µg/ml
	Lagerung bei 2 bis 8°C (Grund: RNase-Stabilität)	
Puffer P2 (Lysispuffer)	NaOH	200.0 mM
	SDS	1.0% (m/V)
Puffer P3 (Neutralis.puffer)	Kaliumacetat pH 5.5	3.0 M
Puffer QBT	NaCl	750.0 mM
	MOPS	50.0 mM
	Isopropanol	15% (V/V)
	Triton X-100	0.15% (V/V)
	pH 7.0	
Puffer QC	NaCl	1.0 M
	MOPS	50.0 mM
	Isopropanol	15% (V/V)
	pH 7.0	
Puffer QF	NaCl	1.25 M
	Tris	50.0 mM
	Isopropanol	15% (V/V)
	pH 8.5	

10 x Probenpuffer (DNA-Gelelektrophorese)	Bromphenolblau Glycerol 1 x TAE	q. s. 50.0% (V/V) 50.0% (V/V)
TAE-Puffer	Tris Essigsäure Na-EDTA pH 8.0	40.0 mM 0.11% (V/V) 1.0 mM
RT-Puffer (AGS)	Tris-HCl pH 8.3 KCl MnCl ₂ Rinderserumalbumin	50.0 mM 40.0 mM 6.0 mM 50.0 µg/ml
TE/SDS-Puffer	Tris EDTA SDS pH 8.0	50.0 mM 100.0 mM 0.5% (V/V)
Proteinase K-Lsg.	Proteinase K	1.0% (m/V)
10 x SSC	NaCl tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O pH 7.0 autoklavieren	1.5 M 150.0 mM
Prähybridisierungslsg.	NaCl tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O Rinderserumalbumin Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon) Ficoll 400 SDS Heringssperma-DNA (geschert und denaturiert) Blockingreagenz (Roche) pH 7.0	0.9 M 90.0 mM 0.1% (m/V) 0.1% (m/V) 0.1% (m/V) 0.5% (m/V) 100.0 µg/ml 1.0% (m/V)
Hybridisierungslsg.	NaCl tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O SDS Heringssperma-DNA (geschert und denaturiert) Blockingreagenz (Roche) pH 7.0	0.9 M 90.0 mM 0.5% (m/V) 100.0 µg/ml 1.0% (m/V)
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure NaCl pH 7.5 autoklavieren	0.10 M 0.15 M

Detektionspuffer	Tris	0.1 M
	NaCl	0.1 M
	pH 9.5	
	autoklavieren	
anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment	Roche, Mannheim	
Blockingreagenz	Roche, Mannheim	
Dithiothreitol (DTT)	CN Biomedicals Inc., Aurora, USA	
dNTP-Stamm, 20 mM	AGS, Heidelberg	
ECF-Substrat	Amersham Biosciences, Freiburg	
Ethidiumbromid 1%ig in H ₂ O	Merck, Darmstadt	
GenScreen (Art.Nr.: NEF 983)	NEN-DuPont, Bad Homburg	
Hefeextrakt	Difco/Becton Dickinson, Heidelberg	
Oligo(dt)-Primer p(dt) ₁₅	Roche, Mannheim	
RNase	Qiagen, Hilden	
RNase-Inhibitor	AGS, Heidelberg	
Trypton/Peptone 140	Gibco BRI/Life Technol., Karlsruhe	
Tween-20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn	

Bestimmung der Phosphataseaktivität

pNPP-Reaktionslösung	p-Nitrophenylphosphat	10.60 mM
	MOPS	37.50 mM
	Dithiothreitol	0.75 mM
	pH 7.4	
	kühl und vor Licht geschützt lagern	
Homogenisationspuffer II	Tris-HCl	20.0 mM
	EGTA	2.0 mM
	EDTA	5.0 mM
	2-Mercaptoethanol	0.1% (V/V)
	pH 7.4	
	vor Gebrauch frisch zusetzen:	
	Benzamidin	1.0 mM
	PMSF	0.5 mM
Puffer M1	EDTA	5.0 mM
	2-Mercaptoethanol	0.1% (V/V)
	pH 7.0	
Puffer M2	EDTA	5.0 mM
	2-Mercaptoethanol	0.1% (V/V)
	HEPES	50.0 mM
	pH 7.0	

Phosphorylase-Kinase-Lsg.	Tris	50.0 mM
	MgCl ₂	20.0 mM
	Benzamidin	31.0 mM
	CaCl ₂	1.0 mM
	BSA	0.66 mg/ml
	Phosphorylase b	5.0 mg/ml
	Phosphorylase-Kinase	20.0 IE/ml
	ATP	1.0 mM
	γ-[³² P]-ATP	1.0 mCi
Dialysierpuffer	Tris	10.0 mM
	EDTA	1.0 mM
	pH 7.4	
Phos. a-Reaktionsansatz	Tris	20.0 mM
	Coffein	5.0 mM
	EDTA	0.1 mM
	2-Mercaptoethanol	0.1%
	[³² P]-Phosphorylase a	25.0 %
	pH 7.4	

γ-[³² P]-ATP	NEN-DuPont, Bad Homburg
Benzamidin	Sigma, Steinheim
Coffein	Sigma, Steinheim
Dialyseschlauch Servapor	Serva Electrophoresis, Heidelberg
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, Steinheim
Okadasäure	ICN Biomedicals, Eschwege
Phosphorylase b	Sigma, Steinheim
Phosphorylase-Kinase	Sigma, Steinheim
PP1α (rec. aus <i>E. coli</i>)	Sigma, Steinheim

Herstellung rekombinanter His₆-PP1α mit Hilfe des Baculovirussystems

TNM-FH-Medium	Grace's Insektenzellmedium	89.0% (V/V)
	TC Hefeextrakt	0.33% (m/V)
	Lactalbuminhydrolysat	0.33% (m/V)
	Glutamin	0.06% (m/V)
	Fetales Kälberserum, inaktiviert	10.0% (V/V)
	Gentamicin	10.0 µg/ml
	Amphotericin B	2.5 µg/ml
Transfektionspuffer A	Grace's Medium	90.0% (V/V)
	Fetales Kälberserum, inaktiviert	10.0% (V/V)
	pH 6.0–6.2	
Transfektionspuffer B	HEPES	25.0 mM
	CaCl ₂	125.0 mM
	NaCl	140.0 mM
	pH 7.1	

PBS pH 7.45	NaCl	137.0 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8.1 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM
	pH 7.45 autoklavieren	
6 M Guanidiniumpuffer	Guanidiniumchlorid	6.0 M
	Tris-HCl	50.0 mM
	NaCl	300.0 mM
	pH 7.5 vor Gebrauch frisch zusetzen:	
	2-Mercaptoethanol	20.0 mM
Renaturierungspuffer	Tris-HCl	50.0 mM
	NaCl	800.0 mM
	MnCl ₂	1.0 mM
	Tween-20	0.02% (m/V)
	pH 7.0 vor Gebrauch frisch zusetzen:	
2-Mercaptoethanol	20.0 mM	
Waschpuffer	Tris-HCl	50.0 mM
	NaCl	800.0 mM
	MnCl ₂	1.0 mM
	Tween-20	0.02% (m/V)
	pH 7.0	
Elutionspuffer	Tris-HCl	50.0 mM
	NaCl	800.0 mM
	MnCl ₂	1.0 mM
	Imidazol	150.0 mM
	Tween-20	0.02% (m/V)
pH 7.0 vor Gebrauch frisch zusetzen:		
2-Mercaptoethanol	20.0 mM	
BaculoGold®-DNA	Pharmingen, San Diego, USA	
fetales Kälberserum	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe vor der Verwendung hitzeinaktiviert (20 min, 50°C)	
low melting agarose	Pharmingen, San Diego, USA	
pAChLT-A-Plasmid	Pharmingen, San Diego, USA	
pTRE2-Plasmid	Clontech Laboratories, Heidelberg	
Talon® Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, Heidelberg	

Das adenovirale Expressionssystem

HEK-Medium	Fetales Kälberserum, inaktiviert Penicillin G Streptomycinsulfat L-Glutamin in DMEM (s. u.: Sigma, D-5671) sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	10.0% (V/V) 100.0 IU/ml 100.0 µg/ml 4.0 mM
PBS pH 7.45	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ pH 7.45 autoklavieren	137.0 mM 2.7 mM 8.1 mM 1.5 mM
H9c2-Medium	NaHCO ₃ Fetales Kälberserum, inaktiviert Penicillin G Streptomycinsulfat in DMEM (s. u.: Sigma, D-7777) sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	17.8 mM 10.0% (V/V) 100.0 IU/ml 100.0 µg/ml
DMEM (15% FCS)	Fetales Kälberserum, inaktiviert in DMEM (s. u.: Sigma, D-5671) sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	15.0% (V/V)
0.15% Collagen	Collagenlösung (Worthington) in PBS pH 7.45 autoklavieren	15% (V/V)
NRC-Medium	Fetales Kälberserum, inaktiviert Pferdeserum, inaktiviert Penicillin G Streptomycinsulfat L-Glutamin in DMEM (s. u.: Sigma, D-5671) sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	2.0% (V/V) 10.0% (V/V) 100.0 IU/ml 100.0 µg/ml 2.0 mM
Krebs-Bicarbonat-Lösung	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ D-Glucose NaHCO ₃ CaCl ₂ vor der Verwendung Begasung mit Carbogen	118.0 mM 4.7 mM 1.2 mM 1.2 mM 11.1 mM 25.0 mM 2.54 mM

M199-Medium	Fetales Kälberserum, inaktiviert Penicillin G Streptomycinsulfat L-Glutamin in Medium199 sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	10.0% (V/V) 100.0 IU/ml 100.0 µg/ml 4.0 mM
Dulbecco's modified Eagle's medium	Sigma, Steinheim	
DMEM, Kat.-Nr. D-5671:	D-Glucose L-Glutamin Pyruvat	4500 mg/l ∅ ∅
DMEM, Kat.-Nr. D-7777:	D-Glucose L-Glutamin Pyruvat NaHCO ₃	4500 mg/l 584 mg/l 110 mg/l ∅
Collagen bovine achilles tendon fetales Kälberserum	Worthington, New Jersey, USA Gibco/Life Technologies, Karlsruhe vor der Verwendung hitzeinaktiviert (20 min, 50°C)	
L-Glutamin 200 mM	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA	
Medium 199	Sigma, Steinheim	
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe	
Pferdeserum	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe vor der Verwendung hitzeinaktiviert (30 min, 56°C)	
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe	

7.2. Antikörper

Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen.
pc = polyklonal, mc = monoklonal, -AP = konjugiert an Alkalische Phosphatase

1. Antikörper	Verd.	Firma/Art.-Nr.	2. Antikörper	Verd.
Anti-human- PP1α developed in rabbit pc IgG	1:1000	Upstate/UBI 06-221	Anti-rabbit IgG-AP developed in goat	1:2000
Anti-human- PP2A developed in rabbit pc IgG	1:1000	Upstate/UBI 06-222	Anti-rabbit IgG-AP developed in goat	1:2000
Anti-human- I₂ mouse mc IgG1	1:1000	BD Transduction 610698	Anti-mouse IgG-AP developed in goat	1:1000
Anti- MLC₂₀ mouse mc IgM	1:400	Sigma M4401	Anti-mouse IgM-AP developed in goat	1:1000
Anti- GFP (-AFPmAb,11E5) mouse mc IgG1	1:500	Quantum AFP5001	Anti-mouse IgG-AP developed in goat	1:1000
Anti- His₄ mouse mc IgG1	1:1000	Qiagen 34670	Anti-mouse IgG-AP developed in goat	1:1000

Die 2. Antikörper wurden von Sigma (Steinheim) bezogen.

7.3. Geräte und Bezugsquellen

Gerät	Bezugsquelle
Autoklav Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Autoklav Tuttnauer Systec Typ 3850 EL	Systec GmbH, Wettenberg
Betazähler TRI-CARB 1600 TR	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Blotkammer Hoefer	Hoefer Scientific Instruments San Franc. USA
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments San Franc. USA
Flatbed Recorder Kipp and Zonen	FMI, Seeheim/Ober-Beerlauch
Gefäßmyograph Modell 410 A	Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark
Geldokumentation Fluo_Link	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Gene Pulser	Biorad Laboratories, München
Hybridisierungssofen Hybaid Mini 10	Hybaid, Heidelberg
Inkubator Queue Stabil Therm	Nalge Nunc International, Wiesbaden
Inkubator (Bakterienkultur) Typ UE 400	Memmert GmbH, Schwabach
Kühlbrutschrank Typ ICP 600	Memmert GmbH, Schwabach
Labor-Schwingmühle Mikro-Dismembrator U	B. Braun Biotech International AG, Melsungen
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Minigel Twin Electrophoresis apparatus	Biometra, Göttingen
MSK 1 (Kraftaufnehmer gehäutete Fasern)	Scientific Instruments, Heidelberg
Omiga	Oxford Molecular, Madison, USA
PCR-Gerät Gene Amp ® PCR System 9700	PerkinElmer Analytical Instruments, Shelton, USA
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
PhosphorImager Kassetten	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Polytron PT-MR 3000	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Reinstwasseranlage TKA-LAB Typ HP4	TKA Wasseraufbereitungssysteme mbH, Niederelbert
Reinstwasseranlage für hochohmiges Wasser Purelab Classic	Purelab Classic, USF Seral, Ransbach-Baumbach
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttler Modell 3015	GFL, Burgwedel
Schüttler Modell Unimax 2010, RO-5	Heidolph GmbH, Schwabach

Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2472	Heraeus instruments, Düsseldorf
Storm 860	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Szintillationszähler	Canberra Packard, Dreieich
Thermomixer Modell 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Modell 5415 C mit Standardrotor F-45-18-11	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallstab VirSonic® 60	VirTis, New York, USA
UV-Kammer GS Gene Linker	Biorad, Richmond, USA
UV-Lichtanlage Docu Gel-V 8A400	MWG Biotech, Ebersberg
Vakuum Blotter Model 785	Biorad Laboratories, München
Vakuum-Geltrockner Model 583	Biorad Laboratories, München
Vakuumzentrifuge SpeedVac Plus AR Modell SC 110AR	Savant Instruments Inc., Farmingdale New York, USA
Zentrifuge Centrikon T-124	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Universal 16	Hettich/Heraeus Holding, Düsseldorf
Zentrifuge Universal 16R	Hettich/Heraeus Holding, Düsseldorf
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding, Düsseldorf

7.4. Primer und PCR-Programme

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Primer und PCR-Programme sowie die Sequenzierungsprimer angegeben. Alle Primer sind in 5'-3'-Orientierung geschrieben.

Tab. 7.1.: Amplifikation von PP1α aus cDNA der Ratte (Herzgewebe)			
PP1R-ZBamHI-for	CGG CGG ATC CAT GTC CGA CAG CGA GAA GCT C		
PP1R-ZXbal-rev	AGC ATC TAG AGG CTA TTT CTT GGC TTT GGC		
Produktgröße	1015 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	2 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	94°C	35 Zyklen
Annealing	30 sec	63°C	
Elongation	1.5 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.2.: Amplifikation von I₂ aus cDNA des Menschen (rechter Ventrikel)			
I2-for1	AGA TCT CCA ATG GCG GCC TCG ACG		
I2-rev2	CTC TCG AGG TGG TAA AGT ACT AGG CAC AAG		
Produktgröße	844 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	2 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	94°C	9 Zyklen
Annealing	20 sec	60°C	
Elongation	2 min	72°C	
Denaturierung	30 sec	94°C	19 Zyklen: Verlängerung der Elongation um 5 sec je Zyklus
Annealing	20 sec	60°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.3.: SM22-PP1α-Mäuse: PCR-Genotypisierung / Markierung von spezifischen Sonden			
SM22-Seq-P1	TGA GCC AAG CAG ACT TCC		
PP1 α -239-rev	CCA CCA TAC TCG AAC AGC C		
Produktgröße	410 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	5 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	1 min	94°C	30 Zyklen
Annealing	30 sec	55°C	
Elongation	1.5 min	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.4.: Sequenzierungsprimer für pAcHLT-A-PP1α	
pAcHLT-A for	ACA GCC ATT GTA ATG AGA CGC AC
pAcHLT-A rev	AAC AGA GGT GCG TCT GGT GCA AAC

Tab. 7.5.: Sequenzierungsprimer für PP1α-Transfervektoren und -Adenoviren	
PP1 α -239 rev	CCA CCA TAC TCG AAC AGC C
PP1R-Zhang for	CGC CAT ATG TCC GAC AGC GAG AAG CTC
PP1R -Zhang rev	AGG CTA TTT CTT GGC TTT GGC
PP1 α -Seq-1364 f	AAG CCC GCT GAT AAG AAT

Tab. 7.6.: PCR-Synthese eines His₆-Fragments			
His for	CAT GTC CCC TAT GGT ACC GAT GG		
pAChLT-A rev	AAC AGA GGT GCG TCT GGT GCA AAC		
Produktgröße	266 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	2 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	94°C	27 Zyklen
Annealing	30 sec	59.6°C	
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.7.: Sequenzierungsprimer für I₂-Transfektor und -Adenovirus	
I2 rev-seq	GCT TTC TCC ATC TGC AGT CTC
I2 For.4	GCT GCA GCT GAA GGC TTG G
I2-rev 2	CTC TCG AGG TGG TAA AGT ACT AGG CAC AAG

Tab. 7.8.: PCR-Nachweis von pAdEasy			
AdEasy for	TTG ATA GGG TCT CTT ACC AGC		
AdEasy rev	AAC AGT GCG GGA ATG TTA CC		
Produktgröße	ca. 1250 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	3 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 sec	94°C	9 Zyklen
Annealing	20 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Denaturierung	20 sec	94°C	19 Zyklen: Verlängerung der Elongation um 5 sec je Zyklus
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 7.9.: PCR-Nachweis von PP1α in pAdEasy-Vektoren			
PP1 α 376f	GAG TGT GCC AGC ATC AAC C		
PP1R -Zhang rev	AGG CTA TTT CTT GGC TTT GGC		
Produktgröße	621 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	5 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 sec	94°C	30 Zyklen
Annealing	30 sec	65°C	
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1 Zyklus

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad Z, Green FJ, Subuhi HS, Watanabe AM (1989) Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *J Biol Chem* 264: 3859-3863

Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M, Cohen P (1992) The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 210: 1023-1035

Alessi DR, Street AJ, Cohen P, Cohen PTW (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem* 213: 1055-1066

Aleth SR (2002) Zur Bedeutung der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A im Herz-Kreislauf-System. Inaugural-Dissertation im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Allen TJA, Mikala G, Wu X, Dolphin AC (1998) Effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 508: 1-14

Ammosova T, Jerebtsova M, Beullens M, Voloshin Y, Ray P, Kumar A, Bollen M, Nekhai S (2003) Nuclear protein phosphatase-1 regulates HIV-1 transcription. *J Biol Chem* Papers in Press: Manuscript M300521200

Andersch MA, Szczypinski AJ (1947) Use of p-nitrophenyl phosphate substrate in determination of serum acid phosphatase. *Am J Clin Pathol* 17: 571

Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T (2001) Arachidonic acid-induced Ca^{2+} sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 441: 596-603

Arner A (1982) Mechanical characteristics of chemically skinned guinea-pig taenia coli. *Pflügers Arch* 395: 277-284

Bai G, Zhang Z, Amin J, Deans-Zirattu SA, Lee EYC (1988) Molecular cloning of a cDNA for the catalytic subunit of rabbit muscle phosphorylase phosphatase. *FASEB J* 2: 3010-3016

Ballou LM, Brautigam DL, Fischer EH (1983) Subunit structure and activation of inactive phosphorylase phosphatase. *Biochemistry* 22: 3393-3399

Barker HM, Jones TA, da Cruz e Silva EF, Spurr NK, Sheer D and Cohen PT (1990) Localization of the gene encoding a type I protein phosphatase catalytic subunit to human chromosome band 11q13. *Genomics* 7: 159-166

Bastians H, Ponstingl H (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci* 109: 2865-2874

Bayley PM, Findlay WA, Martin SR (1996) Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity interaction using short peptide sequences. *Protein Sci* 5: 1215-1228

Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10: 440-447

Berndt N, Campbell DG, Caudwell FB, Cohen P, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OB and Cohen PT (1987) Isolation and sequence analysis of a cDNA clone encoding a type-1 protein phosphatase catalytic subunit: homology with protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 223: 340-346

Berndt N, Cohen PTW (1990) Renaturation of protein phosphatase 1 expressed at high levels in insect cells using a baculovirus vector. *Eur J Biochem* 190: 291-297

Bers DM (1982) A simple method for the accurate determination of free [Ca] in Ca-EGTA solutions. *Am J Physiol* 242: C404-C408

Bett AJ, Prevec L, Graham FL (1993) Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 67: 5911-5921

Beullens M, Van Eynde A, Vulsteke V, Connor J, Shenolikar S, Stalmans W, Bollen M (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem* 274: 14053-14061

Bialojan C, Takai A (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256: 283-290

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523

Bishop JO (1996) Chromosomal insertion of foreign DNA. *Reprod Nutr Dev* 36: 607-618

Bollen M, Stalmans W (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 227-281

Bonning BC, Roelvink PW, Vlak JM, Possee RD, Hammock BD (1994) Superior expression of juvenile hormone esterase and beta-galactosidase from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus compared to the p10 protein and polyhedrin promoters. *J Gen Virol* 75: 1551-1556

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brandt H, Capulong ZL, Lee EYC (1975) Purification and properties of rabbit liver phosphorylase phosphatase. *J Biol Chem* 250: 8038-8044

Brautigan DL, Ballou LM, Fischer EH (1982) Activation of skeletal muscle phosphorylase phosphatase. Effects of proteolysis and divalent cations. *Biochemistry* 21: 1977-1982

Brewis ND, Street AJ, Prescott AR, Cohen PT (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J* 12: 987-996

- Buskase J, Methling K, Gergs U, Schmitz W, Jones LR, Neumann J (2002) Altered calcium transients in adenoviral-infected rat cardio-myocytes with overexpression of junctin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1) R 94
- Carbonell LF, Klowden MJ, Miller LK (1985) Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J Virol* 56: 153-160
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22: 4124-4135
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
- Chen C, Okayama H (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 6: 632-638
- Chen MX, Cohen PT (1997) Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett* 400: 136-140
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Chu Y, Wilson SE, Schlender KK (1994) A latent form of protein phosphatase 1 α associated with bovine heart myofibrils. *Biochim Biophys Acta* 1208: 45-54
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2172-2175
- Chung H, Nairn AC, Murata K, Brautigan DL (1999) Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the $\alpha 4$ subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2. *Biochemistry* 38: 10371-10376

Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucl Acids Res* 24: 3546-3551

Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508

Cohen P, Cohen PTW (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264: 21435-21438

Cohen P, Klumpp S, Schelling DL (1989) An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 250: 596-600

Cohen P (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur J Biochem* 268: 5001-5010

Cohen PTW (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22: 245-251

Cohen PTW (2002) Protein phosphatase 1 - targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-256

Connor JH, Quan HN, Ramaswamy NT, Zhang L, Barik S, Zheng J, Cannon JF, Lee EYC, Shenolikar S (1998) Inhibitor-1 interaction domain that mediates the inhibition of protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 273: 27716-27724

Connor JH, Kleeman T, Barik S, Honkanen RE, Shenolikar S (1999) Importance of the β 12- β 13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem* 274: 22366-22372

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38

Davis TR, Schuler ML, Granados RR, Wood HA (1993) Comparison of oligosaccharide processing among various insect cell lines expressing a secreted glycoprotein. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A: 842-846

Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C, Walsh MP (2001) Ca^{2+} -independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 276: 16365-16373

Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP (2002) Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J* 367: 517-524

DePaoli-Roach AA (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem* 259: 12144-12152

DePaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* 34: 199-224

Dillon N, Festenstein R (2002) Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 18: 252-258

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* 16: 6127-6145

Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7: 555-569

Egloff MP, Cohen PTW, Reinemer P, Barford D (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254: 942-959

Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PTW, Cohen P, Barford D (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* 16: 1876-1887

Eisfeld J, Mikala G, Varadi G, Schwartz A, Klöckner U (1997) Inhibition of cloned human L-type cardiac calcium channels by 2,3-butanedione monoxime does not require PKA-dependent phosphorylation sites. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 489-492

Ellis RJ, Hemmingsen SM (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* 14: 339-342

Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35: 5220-5228

Endo S, Connor JH, Forney B, Zhang L, Ingebritsen TS, Lee EYC, Shenolikar S (1997) Conversion of protein phosphatase 1 catalytic subunit to a Mn^{2+} -dependent enzyme impairs its regulation by inhibitor 1. *Biochemistry* 36: 6986-6992

Erdödi F, Ito M, Hartshorne DJ (1996) Myosin light chain phosphatase. In: Barany M (ed) *Biochemistry of smooth muscle contraction*. Academic Press, San Diego: 131-142

Eriksson JE, Gronberg L, Nygard S, Slotte JP, Meriluoto JA (1990) Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochim Biophys Acta* 1025: 60-66

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13

Feinberg AP, Vogelstein B (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* 137: 266-267

Fields BN, Knipe DM, Howley PM (1996) *Virology*. Third edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia

Fink AL (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79: 425-449

Fourel G, Lebrun E, Gilson E (2002) Protosilencers as building blocks for heterochromatin. *BioEssays* 24: 828-835

Frame MD, Miano JM, Yang J, Rivers RJ (2001) Localized adenovirus-mediated gene transfer into vascular smooth muscle in the hamster cheek pouch. *Microcirculation* 8: 403-413

Fraser MJ (1992) The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 131-172

Gailly P, Wu X, Haystead TAJ, Somlyo AP, Cohen PTW, Cohen P, Somlyo AV (1996) Regions of the 110-kDa regulatory subunit M₁₁₀ required for regulation of myosin-light-chain-phosphatase activity in smooth muscle. *Eur J Biochem* 239: 326-332

Gallagher PJ, Herring BP, Stull JT (1997) Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil* 18: 1-16

Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E (1998) Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 18: 56-59

Gershoni JM (1988) Protein blotting: A manual. In: Glick NT (Hrsg.), *Methods of biochemical analysis*, Wiley, New York, 33. Auflage: 1-58

Goldberg J, Huang H, Kwon Y, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376: 745-753

Gong MC, Cohen P, Kitazawa T, Ikebe M, Masuo M, Somlyo AP, Somlyo AV (1992) Myosin light chain phosphatase activities and the effect of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. *J Biol Chem* 267: 14662-14668

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74

Gratecos D, Detwiler TC, Hurd S, Fischer EH (1977) Rabbit muscle phosphorylase phosphatase. 1. Purification and chemical properties. *Biochemistry* 16: 4812-4817

Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K, Navia MA (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82: 507-522

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185

Guo Z, Su W, Ma Z, Smith GM, Gong MC (2003) Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 is required for agonist-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 278: 1856-1863

Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251

Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 325-341

Hartshorne DJ, Hirano K (1999) Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem* 190: 79-84

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514

Heitz F, Nay C, Guenet C (1997) Expression of functional human muscarinic M2 receptors in different insect cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* 17: 305-317

Helps NR, Street AJ, Elledge SJ, Cohen PTW (1994) Cloning of the complete coding region for human protein phosphatase inhibitor 2 using the two hybrid system and expression of inhibitor 2 in *E. coli*. *FEBS Lett.* 340: 93-98

Henikoff S (1998) Conspiracy of silence among repeated transgenes. *BioEssays* 20: 532-535

Henikoff S (2000) Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* 1470: O1-O8

Hennig W (1999) Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9

Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210

Hill-Perkins MS, Possee RD (1990) A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* 71: 971-976

Hink WF, Thomsen DR, Davidson DJ, Meyer AL, Castellinos FJ (1991) Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines. *Biotechnol Prog* 7: 9-14

Hollams EM, Giles KM, Thomson AM, Leedman PJ (2002) mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res* 27: 957-980

Honkanen RE (1993) Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett* 330: 283-286

Honkanen RE, Codispoti BA, Tse K, Boynton AL (1994) Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicol* 32: 339-350

Hsieh-Wilson LC, Benfenati F, Snyder GL, Allen PB, Nairn AC, Greengard P (2003) Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *J Biol Chem* 278:1186-1194

Huang HB, Horiuchi A, Goldberg J, Greengard P, Nairn AC (1997) Site-directed mutagenesis of amino acid residues of protein phosphatase 1 involved in catalysis and inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3530-3535

Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P, Nairn AC (1999) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 274: 7870-7878

Huang X, Honkanen RE (1998) Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (rdgC). *J Biol Chem* 273: 1462-1668

Husain M, Olson EN, Rosenberg RD (1997) Conditional transgene expression in arterial smooth muscle. *Circulation* 96 (suppl I): I-501

Iizuka K, Ikebe M, Somlyo AV, Somlyo AP (1994) Introduction of high molecular weight (IgG) proteins into receptor coupled, permeabilized smooth muscle. *Cell Calcium* 16: 431-445

Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M (1986) Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* 261: 36-39

Jacobsson K (1960) The determination of tartrate-inhibited phosphatase in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 12: 367

Jagiello I, Beullens M, Stalmans W, Bollen M (1995) Subunit structure and regulation of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 270: 17257-17263

Johnson DF, Moorhead G, Caudwell FB, Cohen P, Chen YH, Chen MX, Cohen PTW (1996) Identification of protein-phosphatase-1-binding domains on the glycogen and myofibrillar targeting subunits. *Eur J Biochem* 239: 317-325

Johnson DF, Cohen P, Chen MX, Chen YH, Cohen PTW (1997) Identification of the regions on the M₁₁₀ subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M₂₁ subunit and with myosin. *Eur J Biochem* 244: 931-939

Johnson JD, Snyder C, Walsh M, Flynn M (1996) Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca²⁺ exchange with the N- and C-terminal Ca²⁺ binding sites of calmodulin. *J Biol Chem* 271: 761-767

Kashima T, Hasegawa A, Iwata H, Inoue T (1999) Expression of recombinant bovine L-selectin in *Escherichia coli* and insect cells. *J Vet Med Sci* 61: 251-254

Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio/Technology* 9: 825-829

Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS (1997a) A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol* 17: 2266-2278

Kim S, Lin H, Barr E, Chu L, Leiden JM, Parmacek MS (1997b) Transcriptional targeting of replication-defective adenovirus transgene expression to smooth muscle cells in vivo. *J Clin Invest* 100: 1006-1014

Kim YM, Watanabe T, Allen PB, Kim YM, Lee SJ, Greengard P, Nairn AC, Kwon YG (2003) PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 13819-13828

Kimes BW, Brandt BL (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 98: 367-381

King MM, Huang CY (1984) The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *J Biol Chem* 259: 8847-8856

King VA, Possee RD (1992) *The Baculovirus Expression System, A Laboratory Guide*, Chapman Hall, London

Kirchhefer U, Bokník P, Schmitz W, Neumann J (2001) Generation of mice that overexpress protein phosphatase inhibitor-2 in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (suppl 4): R 98

Kitamura K, Mizuno Y, Sasaki A, Yasui A, Tsuiki S, Kikuchi K (1991) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for the catalytic subunit 1 alpha of rat kidney type 1 protein phosphatase, and detection of the gene expression at high levels in hepatoma cells and regenerating livers as compared to rat livers. *J Biochem* 109: 307-310

Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Brautigan DL (2000) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 275: 9897-9900

Kitts PA, Possee RD (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* 14: 810-817

Knapp J, Bokník P, Huke S, Lüss H, Müller FU, Müller T, Nacke P, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J (1998) The mechanism of action of cantharidin in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 123: 911-919

Knapp J, Bokník P, Lüss I, Huke S, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Nacke P, Noll T, Piper HM, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J (1999a) The protein phosphatase inhibitor cantharidin alters vascular endothelial cell permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1480-1486

Knapp J, Bokník P, Deng MC, Huke S, Lüss I, Klein-Wiele O, Linck B, Lüss H, Müller FU, Nacke P, Scheld HH, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J (1999b) On the contractile function of protein phosphatases in isolated human coronary arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 464-472

Knapp J, Bokník P, Linck B, Lüss H, Müller FU, Petertönjes L, Schmitz W, Neumann J (2000) Cantharidin enhances norepinephrine-induced vasoconstriction in an endothelium-dependent fashion. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 620-626

Kulakosky PC, Klinge CM (2003) Maximizing production of estrogen receptor beta with the baculovirus expression system. *Biotechniques* 34: 334-338, 340-343

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lalli J, Harrer JM, Luo W, Kranias EG, Paul RJ (1997) Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle. *Circ Res* 80: 506-513

Leach C, Shenolikar S, Brautigan DL (2003) Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis. *J Biol Chem* 278: 26015-26020

Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN (1996a) SM22 α , a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* 78: 188-195

Li L, Miano JM, Mercer B, Olson EN (1996b) Expression of the SM22 α promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol* 132: 849-859

Li L, Liu ZC, Mercer B, Overbeek P, Olson EN (1997) Evidence for serum response factor-mediated regulatory networks governing SM22 α transcription in smooth, skeletal, and cardiac muscle cells. *Dev Biol* 187: 311-321

Li L, Eto M, Lee MR, Morita F, Yazawa M, Kitazawa T (1998) Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J Physiol* 508: 871-881

Li YM, MacKintosh C, Casida JE (1993) Protein phosphatase 2A and its [³H]cantharidin/[³H]endothall thioanhydride binding site. Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues. *Biochem Pharmacol* 46: 1435-1443

Lindemann JP, Watanabe AM (1985) Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 260: 4516-4525

Liu LH, Paul RJ, Sutliff RL, Miller ML, Lorenz JN, Pun RYK, Duffy JJ, Doetschmann T, Kimura Y, MacLennan DH, Hoying JB, Shull GE (1997) Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca²⁺ signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3. *J Biol Chem* 272: 30538-30545

Livingstone C, Jones I (1989) Baculovirus expression vectors with single strand capability. *Nucl Acid Res* 17: 2366

Louis N, et al. (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233: 423-429

Lowry OH, Rosebrough NJ, Fass AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Luckow VA, Summers MD (1988) Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 167: 56-71

Lüss H, Klein-Wiele O, Bokník P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W, Neumann J (2000) Regional Expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2349-2359

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196: 725-734

MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264: 187-192

MacKintosh C, Garton AJ, McDonnell A, Barford D, Cohen PTW, Tonks NK, Cohen P (1996) Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett* 397: 235-238

Marston FAO (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *J Biochem* 240: 1-12

Mazumder B, Seshadri V, Fox PL (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28: 91-98

McAvoy T, Allen PB, Obaishi H, Nakanishi H, Takai Y, Greengard P, Nairn AC, Hemmings HC Jr (1999) Regulation of neurabin I interaction with protein phosphatase 1 by phosphorylation. *Biochemistry* 38: 12943-12949

Methling K, Buskase J, Gergs U, Schmitz W, Jones LR, Neumann J (2002) Adenoviral gene transfer of calsequestrin leads to impaired Ca^{2+} transients in rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1) R 94

Miller LK (1989) Insect baculoviruses: powerful gene expression vectors. *BioEssays* 11: 91-95

Misquitta CM, Iyer VR, Werstiuk ES, Grover AK (2001) The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol Cell Biochem* 224: 53-67

Moessler H, Mericskay M, Li Z, Nagl S, Paulin D, Small JV (1996) The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice. *Development* 122: 2415-2425

Morano IL (1992) Molecular biology of smooth muscle. *J Hypertension* 10: 411-416

Mukherjee B, Burma S, Talwar GP, Hasnain SE (1995) Transcriptional regulation of cell line-dependent, baculovirus-mediated expression of foreign genes. *DNA Cell Biol* 14: 7-14

Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19-26

Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73: 673-699

Murata K, Hirano K, Villa-Moruzzi E, Hartshorne DJ, Brautigan DL (1997) Differential localization of myosin and myosin phosphatase subunits in smooth muscle cells and migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell* 8: 663-673

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69: 1450-1457

Neumann J, Herzig S, Bokník P, Apel M, Kaspáreit G, Schmitz W, Scholz H, Tepel M, Zimmermann N (1995) On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 530-539

Neumann J, Maas R, Bokník P, Jones LR, Zimmermann N, Scholz H (1999) Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *J Pharm Exp Therap* 289: 188-193

Neumann J (2002) Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca^{2+} movement. *Basic Res Cardiol* 97 (Suppl. 1): I/91-I/95

Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A, Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* 69: 1742-1750

Niiró N, Ikebe M (2001) Zipper-interacting protein kinase induces Ca^{2+} -free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 29567-29574

Niiró N, Koga Y, Ikebe M (2003) Agonist-induced changes in the phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase and CPI17, two regulatory factors of myosin light chain phosphatase, in smooth muscle. *Biochem J* 369: 117-128

Nishito Y, Usui H, Shinzawa-Itoh K, Inoue R, Tanabe O, Nagase T, Murakami T, Takeda M (1999) Direct metal analyses of Mn^{2+} -dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes detect zinc and iron only in the Mn^{2+} -independent one. *FEBS Lett* 447: 29-33

Ohmori Y (1937) Über die Phosphomonoesterase. *Enzymologia* 4: 217

Okubo S, Ito M, Takashiba Y, Ichikawa K, Miyahara M, Shimizu H, Konishi T, Shima H, Nagao M, Hartshorne DJ, Nakano T (1994) Regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 429-434

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA (1992) Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. W.H. Freeman and Company, New York, NY

Owens GK (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75: 487-517

Park IK, DePaoli-Roach AA (1994) Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem* 269: 28919-28928

Pearson RB, Wettenhall RE, Means AR, Hartshorne DJ, Kemp BE (1988) Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science* 241: 970-973

Perrino BA, Fong YL, Brickey DA, Saitoh Y, Ushio Y, Fukunaga K, Miyamoto E, Soderling TR (1992) Characterization of the phosphatase activity of baculovirus-expressed calcineurin A isoform. *J Biol Chem* 267: 15965-15969

Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Mignone F, Gissi C, Saccone C (2002) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic Acid Res* 30: 335-340

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490: 27-34

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233

Rapundalo ST (1998) Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-588

Rhoads AR, Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* 11: 331-340

Ribault S, Neuville P, Méchine-Neuville A, Augé F, Parlakian A, Gabbiani G, Paulin D, Calenda V (2001) Chimeric smooth muscle-specific enhancer/promoters. Valuable tools for adenovirus-mediated cardiovascular gene therapy. *Circ Res* 88: 468-475

Roach P, Roach PJ, DePaoli-Roach AA (1985) Phosphoprotein phosphatase inhibitor-2: Identification as a species of molecular weight 31,000 in rabbit muscle, liver, and other tissues. *J Biol Chem* 260: 6314-6317

Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P, Doetschman T (1990) Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem* 265: 11905-11909

Runnegar MT, Kong S, Berndt N (1993) Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystin. *Am J Physiol* 265: G224-230

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Auflage

Sangrador A, Andres I, Eguiraun A, Lorenzo ML, Ortiz JM (1998) Growth arrest of *Schizosaccharomyces pombe* following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol Gen Genet* 259: 449-456

Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T, Nagao M (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 α gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81: 1272-1280

Saunders LR, Barber GN (2003) The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J* 17: 961-983

Schlichter LC, Pahapill PA, Chung I (1992) Dual action of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on K⁺ current in human T lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 438-446

Shenolikar S, Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. In: Greengard P, Robison GA, eds, *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. Raven Press, New York, 1-121

Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, Nakano T (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 269: 30407-30411

Siegmán MJ, Butler TM, Mooers SU, Trinkle-Mulcahy L, Narayan S, Adam L, Chacko S, Haase H, Morano I (1997) Hypertrophy of colonic smooth muscle: contractile proteins, shortening velocity, and regulation. *Am J Physiol* 272: 1571-1580

Silberman SR, Speth M, Nemani R, Ganapathi MK, Dombradi V, Paris H, Lee EYC (1984) Isolation and characterization of rabbit skeletal muscle protein phosphatases C-I and C-II. *J Biol Chem* 259: 2913-2922

Smith GE, Ju G, Ericson BL, Moschera J, Lahm HW, Chizzonite R, Summers MD (1985) Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8404-8408

Smith PA, Williams BA, Ashcroft FM (1994) Block of ATP-sensitive K⁺ channels in isolated mouse pancreatic beta-cells by 2,3-butanedione monoxime. *Br J Pharmacol* 112: 143-149

Sobue K, Hayashi K, Nishida W (1999) Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem* 190: 105-118

Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, Parmacek MS (1995) Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 α . *J Biol Chem* 270: 13460-13469

Somlyo AP, Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236

Somlyo AP, Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522: 177-185

Stralfors P, Hiraga A, Cohen P (1985) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 149: 295-303

Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the α -myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266: 24613-24620

Summers MD, Smith GA (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull B1555*: 1-56

Sutliff RL, Paul RJ (1998) Mouse smooth muscle studies using gene-altered mouse models: a users' guide. In: Hoit BD, Walsh RA (ed) *Cardiovascular physiology in the genetically engineered mouse*. Kluwer Academic Publishers: 247-257

Swärd K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP (2000) Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 522: 33-49

Swärd K, Mita M, Wilson DP, Deng JT, Susnjar M, Walsh MP (2003) The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. *Curr Hypertens Rep* 5: 66-72

Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Van Eugen D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J Am Chem Soc* 103: 2469-2471

Takai A, Bialojan C, Troschka M, Ruegg JC (1987) Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett* 217: 81-84

Takai A, Troschka M, Mieskes G, Somlyo AV (1989) Protein phosphatase composition in the smooth muscle of guinea-pig ileum studied with okadaic acid and inhibitor 2. *Biochem J* 262: 617-623

Tan SL, Tareen SU, Melville MW, Blakely CM, Katze MG (2002) The direct binding of the catalytic subunit of protein phosphatase 1 to the PKR protein kinase is necessary but not sufficient for inactivation and disruption of enzyme dimer formation. *J Biol Chem* 277: 36109-36117

Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE, Stull JT (1994) Ca^{2+} -dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca^{2+} sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 9912-9920

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 4: 346-358

Toraason M, Luken ME, Breitenstein M, Krueger JA, Biagini RE (1989) Comparative toxicity of Allylamine and Acrolein in cultured myocytes and fibroblasts from neonatal rat heart. *Toxicology*, 56: 107

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels on nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

Tung HYL, Resink TJ, Hemmings BA, Shenolikar S, Cohen P (1984) The catalytic subunits of protein phosphatase-1 and protein phosphatase 2A are distinct gene products. *Eur J Biochem* 138: 635-641

Van Heijst BGV, Blangé T, Jongsma HJ, De Beer EL (2000) The length dependency of calcium activated contractions in the femoral artery smooth muscle studied with different methods of skinning. *J Muscle Res Cell Motil* 21: 59-66

Van Hoof C, Goris J (2003) Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochim Biophys Acta* 1640: 97-104

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro Cell Devel Biol* 13: 213-217

Villa-Moruzzi E, Ballou LM, Fischer EH (1984) Phosphorylase phosphatase. Interconversion of active and inactive forms. *J Biol Chem* 259: 5857-5863

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 615-619

Watanabe T, Huang HB, Horiuchi A, da Cruze Silva EF, Hsieh-Wilson L, Allen PB, Shenolikar S, Greengard P, Nairn AC (2001) Protein phosphatase 1 regulation by inhibitors and targeting subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3080-3085

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-842

Waurick R, Knapp J, Van Aken H, Bokník P, Neumann J, Schmitz W (1999) Effect of 2,3-butanedione monoxime on force of contraction and protein phosphorylation in bovine smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359: 484-492

Weber LP, van Lierop JE, Walsh MP (1999) Ca^{2+} -independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J Physiol* 516: 805-824

Wera S, Hemmings BA (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311: 17-29

Xu R, Ho YS, Ritchie RP, Li L (2003) Human SM22 α BAC encompasses regulatory sequences for expression in vascular and visceral smooth muscles at fetal and adult stages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1398-H1407

Yan SC, Graves DJ (1982) Inactivation and reactivation of phosphoprotein phosphatase. *Mol Cell Biochem* 42: 21-29

Yoshida K, Watanabe M, Kato H, Dutta A, Sugano S (1999) BH-protocadherin-c, a member of the cadherin superfamily, interacts with protein phosphatase 1 alpha through its intracellular domain. *FEBS Lett* 460: 93-98

Zhang J, Zhang Z, Brew K, Lee EYC (1996) Mutational analysis of the catalytic subunit of muscle protein phosphatase-1. *Biochemistry* 35: 6276-6282

Zhang JCL, Kim S, Helmke BP, Yu WW, Du KL, Lu MM, Strobeck M, Yu QC, Parmacek MS (2001) Analysis of SM22 α -deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function. *Mol Cell Biol* 21: 1336-1344

Zhang L, Zhang Z, Long F, Lee EYC (1996) Tyrosine-272 is involved in the inhibition of protein phosphatase-1 by multiple toxins. *Biochemistry* 35: 1606-1611

Zhang Z, Bai G, Deans-Zirattu S, Browner MF, Lee EYC (1992) Expression of the catalytic subunit of phosphorylase phosphatase (protein phosphatase-1) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267: 1484-1490

Zhao Z, Yaar R, Ladd D, Cataldo LM, Ravid K (2002) Overexpression of A3 adenosine receptors in smooth, cardiac, and skeletal muscle is lethal to embryos. *Microvasc Res* 63: 61-69

Zimmermann N, Boknik P, Gams E, Gsell S, Jones LR, Maas R, Neumann J, Scholz H (1996) Mechanisms of the contractile effects of 2,3-butanedione-monoxime in the mammalian heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354: 431-436

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

KONGRESSBEITRÄGE

Knapp J, Balzer F, DePaoli-Roach AA, Suzuchi Y, Neumann J (2000) Altered contractile function in vessels from transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of protein phosphatase 1 α (CS1 α). *Circulation* 102 (suppl II): II-187

Aleth S, Balzer F, Knapp J, Schmitz W, Neumann J (2001) Different contractile function in vessels of various mice strains. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (suppl 4): R 109

Balzer F, Aleth S, Knapp J, Schmitz W, Neumann J (2001) Effects of Microcystin LR in vascular smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (suppl 4): R 108

Knapp J, Aleth S, Balzer F, Neumann J, Schmitz W (2001) On the mechanism of action of cantharidin in intact and skinned smooth muscle of mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (suppl 4): R 109

Aleth S, Balzer F, Knapp J, Schmitz W, Neumann J (2002) Overexpression of protein phosphatases in an adenoviral system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (suppl 1): R 93

Balzer F, Aleth S, Hafer L, Schmitz W, Neumann J (2003) Overexpression of protein phosphatase inhibitor-2 in an adenoviral expression system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (suppl 1): R 95

Krause T, Aleth S, Balzer F, Schmitz W, Neumann J (2003) Altered expression of cardiac PP2A in patients with end-stage heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (suppl 1): R 96

Brüchert N, Balzer F, Bokník P, Hafer L, Kirchhefer U, Schmitz W, Neumann J (2003) Adenoviral expression of PP1-I2. A new strategy against increased protein phosphatases in heart failure? *Circulation* 108 (suppl IV): IV-81

ARTIKEL IN JOURNALEN

Knapp J, Aleth S, Balzer F, Schmitz W, Neumann J (2002) Calcium-independent activation of the contractile apparatus in smooth muscle of mouse aorta by protein phosphatase inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366: 562-569