

**Die Bedeutung  
der p21-aktivierten Proteinkinase 1 (PAK1)  
für die Regulation  
der Myosin II-Phosphorylierung und der Kontraktion  
der glatten Muskulatur**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Angela Wirth**

aus Issum

Copy Team, Köln

2002

Berichtersteller:

Prof. Dr. G. Pfitzer  
Institut f. Vegetative Physiologie, Universität zu Köln

Prof. Dr. H.W. Klein  
Institut f. Biochemie, Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung:

14.11.2002

**Inhaltsverzeichnis**

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	
<b>1</b>	<b>Grundlagen der glattmuskulären Kontraktion.....</b>	<b>1</b>
1.1	Morphologische Charakteristika der glatten Muskulatur.....	1
1.2	Aufbau der Myofilamente.....	2
1.3	Molekularer Mechanismus der Kontraktion.....	6
<b>2</b>	<b>Zentrale Rolle der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion.....</b>	<b>7</b>
2.1	Mechanismen zur Kopplung von Erregung und Kontraktion.....	7
2.1.1	Elektromechanische Kopplung.....	7
2.1.2	Pharmakomechanische Kopplung.....	8
2.2	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II.....	10
<b>3</b>	<b>Schlüsselenzyme der glattmuskulären Kontraktion: MLCK und MLCP</b>	<b>11</b>
3.1	Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK).....	11
3.2	Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP).....	14
<b>4</b>	<b>Modulation der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Myofilamente.....</b>	<b>16</b>
4.1	Ca <sup>2+</sup> -Sensitivierung über Regulation der Beziehung zwischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration und r-MLC-Phosphorylierung.....	17
4.1.1	Beeinflussung der MLCK-Aktivität.....	18
4.1.2	Beeinflussung der MLCP-Aktivität.....	20
4.2	Ca <sup>2+</sup> -Sensitivierung über Regulation der Beziehung zwischen r-MLC-Phosphorylierung und Kontraktionskraft.....	22
4.2.1	Beteiligung von Calponin an der Ca <sup>2+</sup> -Sensitivierung der glatten Muskulatur	24
4.2.2	Beteiligung von Caldesmon an der Ca <sup>2+</sup> -Sensitivierung der glatten Muskulatur.....	25
<b>5</b>	<b>Phosphorylierung der r-MLC durch Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Kinasen.....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Bedeutung der p21-aktivierten Proteinkinasen (PAK) für Cytoskelett-Remodelling und glattmuskuläre Kontraktion.....</b>	<b>29</b>
6.1	Familie der p21-aktivierten Proteinkinasen (PAK).....	29
6.2	Gewebespezifische Expression der PAK.....	32
6.3	Regulation der PAK-Aktivität.....	32
6.4	Beteiligung der PAK an der intrazellulären Signaltransduktion.....	34
<b>7</b>	<b>Adenovirale Infektion glatter Muskulatur.....</b>	<b>39</b>
7.1	Adenoviren und ihre Manipulation.....	39
7.2	Infektionszyklus der Adenoviren und die daran beteiligten Rezeptoren.....	41
7.2.1	Ablauf des Infektionszyklus.....	41
7.2.2	Rezeptoren der Virusinfektion und ihre Expressionsmuster.....	42
7.3	Adenovirale Infektion glatter Muskelzellen im Gewebe.....	44

<b>II</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>45</b>
<b>III</b>	<b>Material und Methoden</b>	
<b>1</b>	<b>Kraftmessungen an glattmuskulären Gewebepreparaten.....</b>	<b>47</b>
1.1	Herkunft der Gewebe und Lösungen für intakte Präparate.....	47
1.2	Präparation der glattmuskulären Darmpräparate vom Meerschweinchen.....	48
1.2.1	Präparation der Längsmuskulatur vom Ileum.....	48
1.2.2	Präparation der Taenia caeci.....	49
1.3	Präparation der Gefäßmuskulatur verschiedener Spezies.....	49
1.3.1	Präparation der Arteria carotis communis verschiedener Spezies.....	49
1.3.2	Präparation der Arteria carotis communis für die Experimente zur Druckapplikation <i>ex vivo</i> .....	50
1.3.3	Präparation der Arteria coronaris des Schweins.....	51
1.4	Permeabilisierung von Muskelpräparaten.....	51
1.4.1	Permeabilisierung mit $\beta$ -Escin.....	52
1.4.2	Lösungen für die mit $\beta$ -Escin-permeabilisierten Präparate.....	53
1.4.3	Permeabilisierung mit Triton X-100.....	55
1.4.4	Lösungen für die mit Triton X-100-permeabilisierten Präparate.....	56
1.5	Aufbau der Versuchsapparatur.....	57
1.5.1	Muskelstreifen der Longitudinalmuskulatur des Ileums und der Taenia caeci	57
1.5.2	Ringpräparate der A. carotis communis.....	59
1.6	Calmodulin.....	60
1.7	GST-Fusionsprotein der p21-aktivierten Proteinkinase 1 (GST-PAK1 <sup>T422E</sup> )...	60
<b>2</b>	<b>Herstellung des adenoviralen Vektors und Methoden zum Nachweis der adenoviralen Infektion von Geweben.....</b>	<b>61</b>
2.1	Herstellung des adenoviralen Vektors.....	61
2.2	Enzymhistochemischer Nachweis der $\beta$ -Galactosidase mittels X-gal-Färbung und histologischer Analyse.....	62
2.3	$\beta$ -Galactosidase-Assay mit Gewebeextrakten.....	65
<b>3</b>	<b>Gelelektrophoretische Methoden.....</b>	<b>66</b>
3.1	Disk-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
3.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	69
3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	71
<b>4</b>	<b>Nachweise von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Färbetechniken....</b>	<b>73</b>
4.1	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie BrilliantBlue R-250®.....	73
4.2	Färbung von Polyacrylamidgelen mit BioSafe®-Coomassie.....	74
4.3	Silberfärbung nach Schoenle [Schoenle et al., 1984].....	74
4.4	Autoradiographie.....	75
4.5	PhosphoImager-Auswertung.....	76

<b>5</b>	<b>Dokumentation und Auswertung von gefärbten Polyacrylamidgelen, Röntgenfilmen und Autoradiographien.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>77</b>
6.1	Western Blot.....	77
6.1.1	Proteintransfer.....	77
6.1.2	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen mit Ponceau-Rot® nach Salinovich und Montelaro [Salinovich und Montelaro, 1986].....	78
6.1.3	Western Blot-Entwicklung durch Antikörper-gebundene Peroxidase-Reaktion.....	78
6.1.4	Entfernen von Antikörpern von Nitrocellulosemembranen.....	80
6.2	Immunpräzipitation.....	81
<b>7</b>	<b>Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford [Bradford, 1976].....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der r-MLC.....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Analyse der Proteinphosphorylierung in Geweben mit [<math>\gamma^{32}\text{P}</math>]ATP.....</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>88</b>
<b>11</b>	<b>Bezugsquellennachweis.....</b>	<b>89</b>

## **IV Ergebnisse**

<b>A</b>	<b>Kultur und adenovirale Infektion intakter glattmuskulärer Gewebe</b>	
<b>1</b>	<b>Charakterisierung der intakten A. carotis communis des Kaninchens hinsichtlich der Stimulierung mit Agonisten.....</b>	<b>93</b>
<b>2</b>	<b>Gewebekultur von intakten Muskelringen der A. carotis communis des Kaninchens.....</b>	<b>95</b>
2.1	Bedeutung der Gewebekultur für die Kontraktilität.....	95
2.2	Einfluß von fötalem Kälberserum auf die Gewebekultur.....	97
<b>3</b>	<b>Bedeutung potentiell infektionsverbessernder Methoden für die Kontraktilität der A. carotis communis des Kaninchens.....</b>	<b>99</b>
3.1	Auswirkungen von Druckapplikation auf die Kontraktilität.....	99
3.2	Behandlung mit dem Chelatbildner EGTA.....	101
3.3	Behandlung mit Elastase.....	103
<b>4</b>	<b>Infektion glatter Muskelgewebe mit rekombinanten Adenoviren, die das Gen der <math>\beta</math>-Galactosidase tragen (LacZ-Kontrollviren).....</b>	<b>106</b>
4.1	Ablauf der Infektion.....	106
4.2	Bedeutung der Infektion mit LacZ-Kontrollviren für die Kontraktilität.....	107
4.3	Nachweis der adenoviralen Infektion in Gewebehomogenaten.....	108
4.4	Enzymhistochemischer Nachweis der adenoviralen Infektion.....	109

<b>B</b>	<b>Untersuchungen an permeabilisierten glattmuskulären Geweben</b>	
<b>1</b>	<b>Untersuchungen an permeabilisierter Taenia caecie des Meerschweinchens.....</b>	<b>115</b>
1.1	Charakterisierung der mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate.....	115
1.2	Einfluß von PAK1* auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen.....	117
1.3	Auswirkung des Phosphataseinhibitors Okadainsäure auf die Kraftentwicklung.....	120
1.4	Nachweis der Spezifität der Effekte von PAK1* auf die Kraftentwicklung....	121
1.5	Untersuchung der Reversibilität der Effekte von PAK1* auf die Kontraktilität.....	122
1.6	Analyse des Gehalts der endogenen und rekombinanten p21-aktivierten Proteinkinasen im Gewebe der Taenia caecie im Verlauf der Kraftmessungen....	124
1.7	Einfluß von PAK1* auf die r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen.....	126
1.8	Effekt von PAK1* auf die Aktivität der Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK).....	127
1.9	Auswirkung des Phosphataseinhibitors Okadainsäure auf die Bestimmung der MLCK-Aktivität.....	131
1.10	Bedeutung von PAK1* für die Rate der r-MLC-Phosphorylierung.....	132
1.11	Untersuchung der Phosphorylierung der MLCK durch PAK1*.....	133
1.12	Analyse der Phosphorylierung des Caldesmons durch PAK1*.....	135
1.13	Test auf Kreuzreaktion der MLCK- und Caldesmon-Immunpräzipitate.....	137
1.14	Einfluß von PAK1* auf die Aktivität der Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP).....	138
1.15	Bedeutung von PAK1* für die Aktivität Ca <sup>2+</sup> -unabhängiger Proteinkinasen..	142
1.15.1	Abhängigkeit der r-MLC-Phosphorylierung unter relaxierten Gleichgewichtsbedingungen vom MLCK-Inhibitor Wortmannin.....	142
1.15.2	Effekt von PAK1* auf Ca <sup>2+</sup> - und MLCK-unabhängige Kontraktionen.....	143
<b>2</b>	<b>Untersuchungen an permeabilisierter A. carotis communis des Kaninchens.....</b>	<b>147</b>
2.1	Charakterisierung der mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate.....	147
2.2	Einfluß von PAK1* auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen.....	148
2.3	Wirkung von PAK1* auf die r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen.....	148
<b>3</b>	<b>Untersuchungen an permeabilisierter A. carotis communis des Meerschweinchens.....</b>	<b>150</b>
3.1	Charakterisierung der mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate.....	150
3.2	Einfluß von PAK1* auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen.....	151

<b>V</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>A</b>	<b>Kultur und adenovirale Infektion intakter glattmuskulärer Gewebe</b>	
1	<b>Allgemeine Betrachtungen zu den Meßdaten.....</b>	<b>153</b>
2	<b>Ein guter Kontraktilitätserhalt intakter Muskelringe der <i>A. carotis communis</i> des Kaninchens während fünftägiger Kultur ist schon bei experimentellen Grundbedingungen gewährleistet.....</b>	<b>155</b>
3	<b>Untersuchung potentiell kontraktilitätserhaltender Maßnahmen.....</b>	<b>157</b>
3.1	Vitamin D3 (1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ) wirkt sich leicht positiv auf die Kontraktilität aus.....	157
3.2	<i>all-trans</i> Retinolsäure hat keinen Effekt auf die Kontraktilität.....	158
4	<b>Auswirkung potentiell infektionsverbessernder Methoden auf den Erhalt der Kontraktilität.....</b>	<b>159</b>
4.1	Der Verlust des Endothels hat keinen starken Einfluß auf die Kontraktilität...	159
4.2	Temporäre Veränderungen der endothelialen Zellbarriere durch die Behandlung mit EGTA haben keinen Einfluß auf die Kontraktilität.....	160
4.3	Fötale Kälberserum hat keinen nachteiligen Einfluß auf die Kontraktilität...	162
4.4	Applikation höherer Drücke beeinträchtigt die Kontraktilität nachhaltig.....	163
4.5	Elastase bewirkt starke morphologische Veränderungen der Muskelpräparate und führt damit zu Kontraktilitätsverlusten.....	165
5	<b>Die adenovirale Infektion mit Kontrollviren hat keinen Einfluß auf die Kontraktilität des Gewebes.....</b>	<b>167</b>
6	<b>Effizienz der adenoviralen Infektion glatter Muskelzellen im Gewebeverband.....</b>	<b>168</b>
6.1	Allgemeine Infektionseffizienz und Identifizierung der infizierten Zellen der Gefäßwand.....	168
6.2	In den Ileumpräparaten werden glatte Muskelzellen infiziert.....	172
<b>B</b>	<b>Untersuchungen an permeabilisierten glattmuskulären Geweben</b>	
1	<b>Allgemeine Betrachtungen zum experimentellen System und den Meßdaten.....</b>	<b>174</b>
2	<b>PAK1 wirkt im glatten Muskel antagonistisch zu PAK3 und ROK.....</b>	<b>178</b>
3	<b>Die Effekte von PAK1 auf die glattmuskuläre Kontraktion sind spezifisch und reversibel.....</b>	<b>182</b>
4	<b>Der Wirkmechanismus und die Substratspezifität von PAK1 im glatten Muskel.....</b>	<b>183</b>
4.1	Die r-MLC sind kein Substrat für PAK1.....	184
4.2	PAK1 phosphoryliert die MLCK und hemmt so deren Aktivität.....	185
4.3	PAK1 beeinflusst die Aktivität der MLCP höchstwahrscheinlich nicht.....	188
4.4	PAK1 phosphoryliert Caldesmon im glatten Muskel kaum.....	189
4.5	Die Bedeutung von PAK1 für die Aktivität Ca <sup>2+</sup> -unabhängiger Proteinkinasen ist nicht eindeutig.....	191

<b>5</b>	<b>Involvierung von PAK1 in Signalkomplexen.....</b>	<b>193</b>
<b>6</b>	<b>Der Effekt von PAK1 zeigt leichte Unterschiede an verschiedenen glatt- muskulären Geweben.....</b>	<b>194</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>197</b>
<b>VII</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>215</b>
<b>VIII</b>	<b>Summary</b>	<b>216</b>

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung



## Abkürzungsverzeichnis

Gängige Abkürzungen für Proteine werden im Text der Arbeit bei der ersten Erwähnung erklärt und dann als solche verwendet (z.B. MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase). Im Abkürzungsverzeichnis werden lediglich die für das Verständnis dieser Arbeit zentralen Proteine und ihre Abkürzungen aufgeführt. Ebenso werden die neben den SI-Einheiten verwendeten Standardgrößen der Biochemie (z.B.  $\mu\text{l}$ ), sowie gängige Textabkürzungen (z.B., usw. und andere) im Abkürzungsverzeichnis nicht erläutert.

bfu	<i>blue forming units</i>
Ca <sup>2+</sup> /CaM	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>4</sub> -Calmodulin-Komplex
CaM	Calmodulin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
Cool	Bindungspartner der p21-aktivierten Proteinkinasen ( <i>Cloned-out of library</i> )
CRIB	Bindungsmotiv der GTPasen Cdc42 und Rac ( <i>Cdc42/Rac interactive binding</i> )
D3	Vitamin D3, 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol
GST	Glutathion-S-Transferase
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Wirkkonzentration
ILK	Integrin-gekoppelte Proteinkinase ( <i>integrin linked kinase</i> )
K+H 10 bzw. 100	K <sup>+</sup> -PSS (80 mM) mit Histamin 10 $\mu\text{M}$ bzw. 100 $\mu\text{M}$
MC-LR	Microcystin-LR, Phosphatasen-Inhibitor
MHC	schwere Ketten des Myosins ( <i>myosin heavy chain</i> )
ML-9	1-(5-Chloronaphthalen-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepin, MLCK-Inhibitor
MLCK	Myosin leichte Ketten Kinase ( <i>myosin light chain kinase</i> )
MLCP	Myosin leichte Ketten Phosphatase ( <i>myosin light chain phosphatase</i> )
MYPT1	regulatorische Untereinheit der MLCP
OA	Okadainsäure, Phosphatasen-Inhibitor
PAK	p21-aktivierte Proteinkinase
PBD	p21-bindende Domäne
pCa	negativer dekadischer Logarithmus der freien Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
PE	Phenylephrin, glattmuskulärer Agonist
p.i.	nach der Infektion ( <i>post infection</i> )
PIX	PAK-interagierender Austauschfaktor ( <i>PAK-interacting exchange factor</i> )
POPX	Partner von PIX ( <i>Partner of PIX</i> )
PSS	Physiologische Salzlösung ( <i>physiological salt solution</i> )
RA	<i>all trans</i> -Retinolsäure
r-MLC	regulatorische leichte Ketten des Myosins II
ROK	Rho-Kinase
SM	glatter Muskel/ glattmuskulär ( <i>smooth muscle</i> )
U-44069	Thromboxan-Analogon, glattmuskulärer Agonist
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZIPK	Zipper-interagierende Proteinkinase

## **I Einleitung**

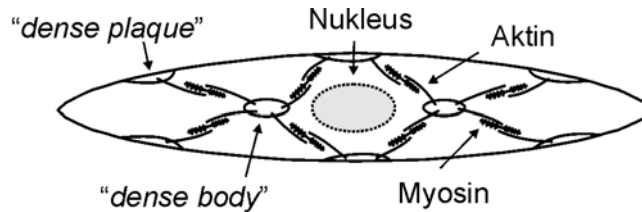
### **1 Grundlagen der glattmuskulären Kontraktion**

#### **1.1 Morphologische Charakteristika der glatten Muskulatur**

Die Muskulatur der inneren Organe, etwa von Gefäßsystem, Darm oder Uterus, unterscheidet sich schon in ihrer lichtmikroskopisch erkennbaren Struktur deutlich von der Skelettmuskulatur. Während die Skelettmuskulatur eine regelmäßige Bänderung, die ihr den Ausdruck „quergestreifte Muskulatur“ eingebracht hat, aufweist, erscheint die Muskulatur der Hohlgane im lichtmikroskopischen Bild homogen und wird daher auch als „glatte Muskulatur“ bezeichnet. Dieser Unterschied läßt sich auf die Morphologie der einzelnen Muskelfasern zurückführen. In den Muskelfasern der Skelettmuskulatur, die eine Breite von 10-100  $\mu\text{m}$  und eine Länge von mehreren Zentimetern erreichen können, sind die kontraktile Elemente, die Myofibrillen, in parallelen Längsbündeln angeordnet. Da Myofibrillen wiederum aus regelmäßig angeordneten Proteinfilamenten bestehen, resultieren Bereiche unterschiedlicher Lichtdurchlässigkeit, die sich in gleichbleibendem Abstand wiederholen und so zu der schon unter dem Lichtmikroskop auffallenden Querstreifung führen. In der spindelförmigen glatten Muskelzelle fallen die Größendimensionen deutlich kleiner aus als in der Skelettmuskelfaser. Eine glatte Muskelzelle erreicht bei einer Breite von 3-6  $\mu\text{m}$  lediglich eine Länge von 100-500  $\mu\text{m}$ . Die Myofilamente verlaufen in der Zelle nicht parallel zueinander, sondern bilden ein diagonales Netzwerk (Abb. I-1). Die einzelnen Bereiche der Myofilamente liegen daher nicht deckungsgleich und verleihen dem glatten Muskelgewebe nicht die gleichmäßig strukturierte Erscheinung der Skelettmuskulatur [Übersicht bei Rüegg, 1996].

Daneben weist die glatte Muskelzelle weitere Unterschiede zur Skelettmuskulatur auf. Der Nukleus der glatten Muskelzelle liegt zentral in der Zelle, während er sich in der Skelettmuskulatur direkt unter der Zellmembran befindet. Da eine Skelettmuskelfaser durch die Fusion von Myoblasten entsteht, besitzt sie außerdem viele Zellkerne, während eine einzelne glattmuskuläre Zelle nur einen Nukleus hat.

Das Sarkoplasmatische Retikulum, das den wichtigsten intrazellulären Calciumspeicher der Zellen darstellt, macht beim glatten Muskel je nach Herkunft des Gewebes lediglich 2-7,5 % aus und ist damit im Vergleich zum Skelettmuskel schwach ausgeprägt. Auch fehlt im glatten Muskel das transversale Tubulussystem.



**Abb. I-1:** Schematische Darstellung des diagonalen Netzwerkes der kontraktilen Elemente einer glatten Muskelzelle.  
Nach [Thews et al., 1999].

Während der Skelettmuskel von motorischen Nerven erregt wird und bewußt gesteuert werden kann, ist die glatte Muskulatur nur vegetativ innerviert und unterliegt zusätzlich hormoneller und parakriner Kontrolle.

Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur ist die glatte Muskulatur auch synthetisch aktiv. In der Media großer Arterien sind die glatten Muskelzellen der einzige vorkommende Zelltyp, so daß schon früh angenommen wurde, daß die Strukturen des Bindegewebes der Media, wie z.B. Kollagen und Elastin, von den Muskelzellen selbst synthetisiert werden müssen. Über Synthesestudien mit radioaktiv markierten Stoffwechseledukten konnte diese Hypothese bestätigt werden [Übersicht bei Chamley-Campbell et al., 1979]. In Zellkultur kommt es zu einem raschen Wechsel des Phänotyps der glatten Muskelzellen vom kontraktilen zum vorwiegend synthetischen Typus [Chamley-Campbell und Campbell, 1981].

## 1.2 Aufbau der Myofilamente

Die Myofilamente der glatten Muskulatur bilden ein diagonales Netzwerk innerhalb der Zelle aus. Dabei sind sie sowohl an der Plasmamembran als auch an einzelnen Verankerungspunkten in der Zelle über sogenannte „dense plaques“ bzw. „dense bodies“ befestigt. Diese Strukturen enthalten  $\alpha$ -Actinin und Vinculin und gelten daher als Äquivalente zu den Z-Scheiben der Skelettmuskulatur.

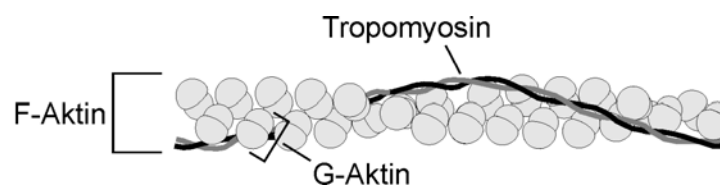
Das Myofilamentsystem des glatten Muskels kann aufgrund der Größe, Lage und Proteinzusammensetzung in drei distinkte Filamenttypen eingeteilt werden: Die dünnen Aktinfilamente, die zusammen mit den dicken Myosinfilamenten für die Kontraktion der Muskulatur verantwortlich sind und die Intermediärfilamente, die ein Bestandteil des

Cytoskeletts sind. Das Verhältnis von Aktin- und Myosinfilamenten beträgt im glatten Muskel ungefähr 13:1, so daß jedes Myosinfilament von 10-15 dünnen Filamenten umgeben ist [Somlyo und Somlyo, 1994].

Die dünnen Filamente, die den Großteil der Myofilamente der glatten Muskelzelle ausmachen und an der Verankerung des Filamentnetzwerkes in den „dense bodies“ und „dense plaques“ beteiligt sind, besitzen einen Durchmesser von 50-80 Å und bestehen hauptsächlich aus filamentösem Aktin (F-Aktin) und Tropomyosin.

G-Aktin ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. In vertebreten Geweben werden sechs hoch konservierte Aktin-Isoformen exprimiert [Vanderkerckhove und Weber, 1978], die untereinander zu ca. 95 % identisch sind [Übersicht bei Pollard und Cooper, 1986]: drei Isoformen des  $\alpha$ -Aktins, eine  $\beta$ -Isoform und zwei Isoformen des  $\gamma$ -Aktins. Jede Isoform wird von einem eigenen Gen kodiert [Vanderkerckhove und Weber, 1978] und die Expression dieser Genloci ist gewebespezifisch. So wird in glatter Gefäßmuskulatur vor allem  $\alpha$ -Aktin exprimiert [Fatigati und Murphy, 1984], während in visceraler glatter Muskulatur ein hoher Anteil an  $\gamma$ -Aktin gefunden wird. Die  $\beta$ -Isoform des Aktins wird in allen glatten Muskelgeweben exprimiert und scheint ein Bestandteil des Cytoskeletts zu sein [North et al., 1994]. Bei physiologischen Salzkonzentrationen polymerisiert das G-Aktin zu F-Aktin und liegt dann als dünnes Filament in Form einer über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierten Doppelhelix vor. Das Aktinfilamentsystem ist universeller Bestandteil des Cytoskeletts und ist auch in nicht-muskulären Zellen weit verbreitet.

Tropomyosin besteht aus zwei Polypeptidketten von 36 und 39 kDa, die in einer  $\alpha$ -Helix angeordnet sind, und hat somit den gleichen Aufbau wie in der Skelettmuskulatur. Es windet sich spiralig um die Aktinfilamente (Abb. I-2).



**Abb. I-2:** Schematische Darstellung eines dünnen Filaments aus Aktin und Tropomyosin.

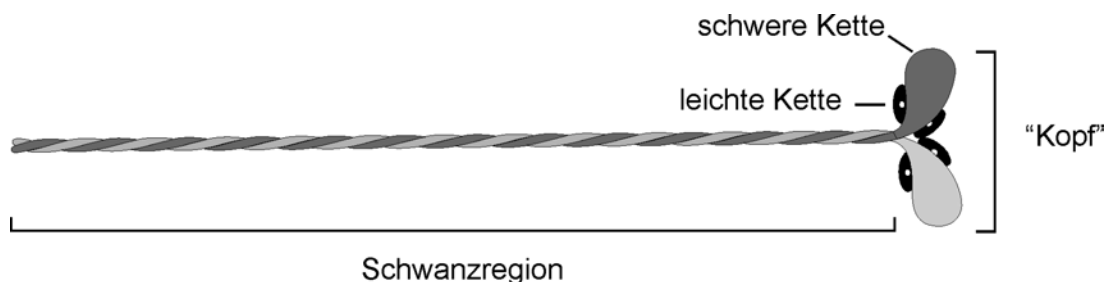
F-Aktin: filamentöses Aktin; G-Aktin: einzelnes globuläres Aktinmolekül

Nach [Smillie, 1996].

Glattmuskuläres Tropomyosin kann ebenso wie seine skelettmuskuläre Isoform an den Troponin-Komplex binden, der im Skelettmuskel zentral an der Regulation der Kontraktion beteiligt ist, im glatten Muskel jedoch nicht vorkommt. Die Funktion, die Tropomyosin im glatten Muskel übernimmt, ist noch nicht zufriedenstellend beschrieben. Tropomyosin scheint die Interaktion von Aktin und Myosin beeinflussen zu können, indem es wie sein skelettmuskuläres Analogon durch eine kooperative Konformationsänderung die Myosinbindungsstelle des Aktins für die phosphorylierte Kopfregion des Myosins zugänglich macht. Außerdem ist Tropomyosin für die volle Entfaltung der ATPase-inhibierenden Wirkung von Caldesmon wichtig [Übersicht bei Morgan und Gangopadhyay, 2001].

Die weiteren regulatorischen Proteine des dünnen Filaments, Calponin und Caldesmon, werden zusammen mit ihrer Rolle beim Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung (s. I; 4.2) ausführlicher besprochen.

Die dicken Filamente ( $\text{\AA}$  120-180  $\text{\AA}$ ) der glatten Muskulatur bestehen wie in allen Typen vertebrater Muskulatur überwiegend aus dem Protein Myosin. Ein einzelnes Myosinmolekül hat ein Molekulargewicht von ca. 470 kDa und besteht aus insgesamt sechs Untereinheiten: zwei schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa, zwei sogenannten regulatorischen leichten Ketten (r-MLC, 20 kDa) und zwei essentiellen leichten Ketten ( $\text{MLC}_{17}$ , 17 kDa; Abb. I-3). Die schweren Ketten bestehen aus einer N-terminalen globulären Kopfstruktur und einem C-terminal lokalisierten, 150 nm langen Schwanzbereich. Am C-Terminus sind die beiden schweren Ketten  $\alpha$ -helikal umeinander gewunden. Die Kopfregion der schweren Ketten trägt das aktive Zentrum der  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Aktin-aktivierten Myosin-ATPase sowie die Aktinbindungsstelle. Außerdem ist je eine regulatorische und eine essentielle leichte Kette am Myosinkopf assoziiert.



**Abb. I-3:** Schematische Darstellung eines Myosinmoleküls aus zwei schweren und vier leichten Ketten.

Nach [Alberts et al., 1994].

Durch alternatives Splicing der pre-mRNA der schweren Ketten des glattmuskulären Myosins können verschiedene Isoformen des Proteins generiert werden. Am 3'-Ende der mRNA, also im Schwanzbereich des Myosins, existieren zwei alternative Exone, die je nach Verwendung zu einer 204 bzw. 200 kDa großen Isoform der schweren Ketten des Myosins führen, auch als SM1 bzw. SM2 bezeichnet [Nagai et al., 1989; Babij und Periasamy, 1989]. Außerdem kann durch alternatives Splicen in der Kopfregion der schweren Ketten des Myosins in der Nähe der ATP-Bindungsstelle die Insertion einer kurzen Sequenz von 7 Aminosäuren erfolgen [Kelley et al., 1993; Babij, 1993; White et al., 1993]. Mit verschiedenen experimentellen Ansätzen, wie z.B. mit *in vitro motility*-Assays, konnte gezeigt werden, daß diese kurze Insertion die Querbrückenkinetik des Myosins verändert [Rovner et al., 1997]. Später konnte ein Mausmodell generiert werden, in dem gezielt die Expression der Myosin-Isoform mit dem Insert ausgeschaltet wurde [Babu et al., 2001]. Bei Kraftmessungen mit glattmuskulären Geweben dieser Tiere wurden signifikant geringere Maximalkräfte und Verkürzungsgeschwindigkeiten ermittelt [Babu et al., 2001], so daß diese Insertion wahrscheinlich für die Querbrückenkinetik und Verkürzungsgeschwindigkeit der glatten Muskulatur eine bedeutende Rolle spielt.

Die reversible Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins ist entscheidend an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion beteiligt (s. I; 2.2). Die essentiellen leichten Ketten des Myosins spielen wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Myosin-ATPase-Aktivität. Sie werden in zwei Isoformen (MLC<sub>17a</sub> und MLC<sub>17b</sub>) mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten exprimiert, deren Verhältnis vom Ursprung des glatten Muskelgewebes abhängig ist [Hasegawa et al., 1988]. Die einzelnen Isoformen führen möglicherweise zu einer unterschiedlichen Beeinflussung der Kontraktionsgeschwindigkeit des glatten Muskels [Malmqvist und Arner, 1991].

Da der Durchmesser des dritten Filamenttyps im glatten Muskel mit 100 Å genau zwischen dem der dicken und dünnen Filamente liegt, wird dieser auch als Intermediärfilament bezeichnet. Es handelt sich hierbei um einen Teil des Cytoskeletts, der nicht an der Kontraktion der Muskulatur beteiligt ist, sondern strukturelle Funktionen übernimmt. So sind die Intermediärfilamente mit ihren Hauptbestandteilen Desmin und Vimentin an der Verankerung der Myofilamente in den „dense plaques“ an der Plasmamembran und den „dense bodies“ im Cytosol maßgeblich beteiligt. An der Plasmamembran sorgen sie zusammen mit den membranständigen Integrinen für eine stabile und zugleich flexible

Anheftung der Myofilamente, die für die Kontraktion der Muskulatur essentiell ist [Pavalko et al., 1995; Sjuve et al., 1998].

### 1.3 Molekularer Mechanismus der Kontraktion

Der Kontraktion des glatten Muskels liegt wie bei der Skelettmuskulatur der ATP-abhängige Querbrückenzyklus zugrunde und sie wird durch die sogenannte Gleitfilamenttheorie beschrieben. Prinzipiell findet bei der Kontraktion eine zyklische Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente statt, in deren Verlauf es zu einem Ineinandergleiten der beiden Filamente und damit zu einer Verkürzung der Muskulatur kommt.

In Abwesenheit von ATP sind die Köpfe der schweren Ketten des Myosins an Aktin gebunden. Nach der Bindung von ATP kann sich der Myosinkopf vom Aktin lösen und das ATP hydrolytisch spalten. Die Spaltprodukte ADP und anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) verbleiben dabei zunächst am Myosin. In diesem Zustand sind die Myosinquerbrücken nur schwach an Aktin gebunden. Erst die sequentielle Freisetzung von  $P_i$  und ADP führt zur Ausbildung von stark gebundenen, kraftgenerierenden Querbrücken, zur Konformationsänderung im Bereich des Myosinkopfes und damit zum sogenannten „*power stroke*“, der eine Verkürzung der Sarkomere und damit des ganzen Muskels bewirkt.

Die ATPase-Aktivität des glattmuskulären Myosins ist deutlich geringer als die des Skelettmuskels, die Freisetzung der Spaltprodukte erfolgt langsamer und die Frequenz der Querbrückenzyklen fällt um einen Faktor 100-1000 geringer aus. Gleichzeitig bleiben die Querbrücken jedoch länger erhalten, so daß die glatte Muskulatur bei niedrigem Energieverbrauch einen hohen Krafttonus entwickeln kann (*duty cycle*). Trotz des geringeren Myosingehaltes und der größeren Sarkomerlänge ist die glatte Muskulatur so in der Lage, bei niedrigerem ATP-Verbrauch vergleichbare Kräfte wie der Skelettmuskel aufzubauen. Die höhere Frequenz der Querbrückenzyklen ermöglicht der Skelettmuskulatur jedoch deutlich höhere Verkürzungsgeschwindigkeiten, weswegen im Gegensatz dazu beim glatten Muskel auch von einem „langsamen“ Muskel gesprochen wird.

## **2 Zentrale Rolle der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion**

Sowohl im skeletalen als auch im glatten Muskel ist eine Erhöhung oder Erniedrigung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für die Initiierung einer Kontraktion bzw. Relaxation das auslösende Signal. Während die Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Skelettmuskel über den Troponinkomplex registriert und entsprechend umgesetzt werden, handelt es sich in der glatten Muskulatur um einen indirekteren Steuerungsmechanismus, an dem das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin (CaM), die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK) und die regulatorischen leichten Ketten des Myosins II (r-MLC) entscheidend beteiligt sind (s. I; 2.2).

### **2.1 Mechanismen zur Kopplung von Erregung und Kontraktion**

Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt in der glatten Muskelzelle über zwei unterschiedliche Mechanismen, die sich hinsichtlich ihres Einflusses auf das Membranpotential unterscheiden: die elektromechanische (s. I; 2.1.1) und die pharmakomechanische (s. I; 2.1.2) Kopplung. Jede Erregung der glatten Muskulatur ist in der Regel eine Mischung dieser beiden Kopplungsarten.

#### **2.1.1 Elektromechanische Kopplung**

Bei der elektromechanischen Kopplung kommt es aufgrund einer Depolarisation der Zellmembran von einem Ruhewert von  $-40$  bis  $-70$  mV hin zu positiven Werten [Somlyo und Somlyo, 1994] zur Aktivierung spannungsabhängiger L- und T-Typ-Calciumkanäle, zu einem Einstrom von Calciumionen in die Zelle [Ganitkevich und Isenberg, 1991] und damit zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche die Auslösung einer Kontraktion bewirkt. Im experimentellen Ansatz kann diese Depolarisation durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration erreicht werden, unter physiologischen Bedingungen wird sie durch Agonisten, wie z.B. Norepinephrin oder Carbachol, nach deren Bindung an ihren membranständigen Rezeptor ausgelöst. Bei der Stimulation durch Agonisten kann bei einer vergleichbaren Depolarisation der Membran



eine größere Kontraktion beobachtet werden als bei der  $K^+$ -Depolarisation [Nelson et al., 1988]. Dies beruht wahrscheinlich auf einer zusätzlichen pharmakomechanischen Komponente der Agonistenwirkung.

Ein Teil der glatten Muskulatur besitzt Zellen, die spontane Membrandepolarisationen auslösen können und eine Schrittmacherfunktion übernehmen. Es handelt sich dabei um die sogenannten Cajal-Zellen [Übersicht bei Hanani und Freund, 2000], die vor allem in den Hohlorganen des Intestinaltraktes vorkommen, nach neuesten Erkenntnissen jedoch auch in der Gefäßmuskulatur zu finden sind [Povstyan et al., 2002; Pucovský und Bolton, 2002]. Bei diesen Zellen kommt es zu einem spontanen Einstrom von Kationen, der nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zur Auslösung eines Aktionspotentials führt. Diese Erregung wird durch bisher wenig verstandene Mechanismen auf die umliegende glatte Muskulatur übertragen und dort über Verbindungen zwischen den Muskelzellen, sogenannte *gap junctions*, weitergeleitet. Auf diese Weise wird eine synchrone Kontraktion des Muskelgewebes ausgelöst. Diese Art der Muskulatur wird als „*single-unit*“-Typ bezeichnet. Die Frequenz der Spontankontraktionen ist je nach betrachtetem Abschnitt des Intestinaltraktes verschieden und kann aufgrund der benachbarten Lokalisierung der Cajal-Zellen zu vegetativen Nervenzellen vom vegetativen Nervensystem moduliert werden.

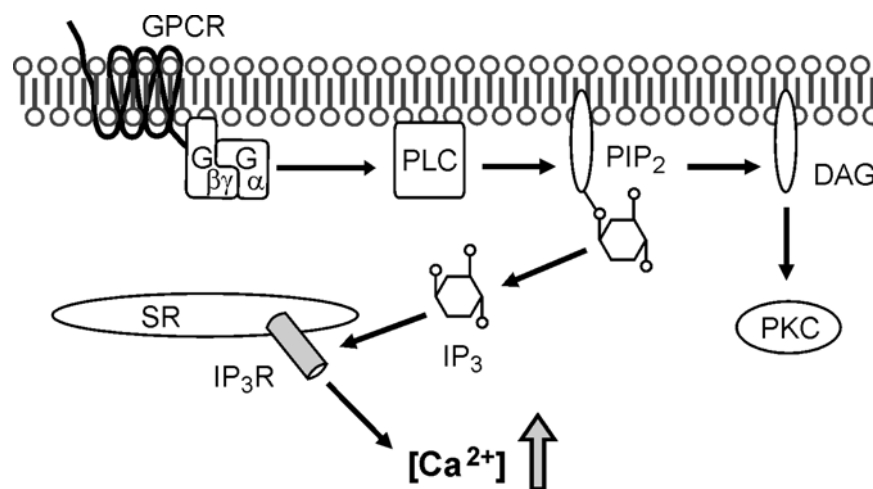
### 2.1.2 Pharmakomechanische Kopplung

Unter dem Begriff der pharmakomechanischen Kopplung werden die Mechanismen zusammengefaßt, die eine Kontraktion der Muskulatur ohne eine Änderung der Membranpotentiale auslösen. Die für die Kontraktion nötige Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration kann dabei prinzipiell über zwei Wege erfolgen: über die Freisetzung von Calcium aus dem intrazellulären Calciumspeicher des Sarkoplasmatischen Retikulums oder über Einstrom von extrazellulärem Calcium.

Die Freisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern wird über die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) ausgelöst (Abb. I-4). Die Bindung von Agonisten an muskarinerge ( $M_1$ ,  $M_3$  oder  $M_5$ ) oder  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptoren führt dabei zunächst über heterotrimere G-Proteine zur Aktivierung der Phospholipase C, die das membranständige Phosphatidyl-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in  $IP_3$  und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet.  $IP_3$  bindet dann an spezifische  $IP_3$ -Rezeptoren in der Membran des Sarkoplasmatischen

Retikulums und induziert die Öffnung dieser Liganden-gesteuerten Calciumkanäle. Der resultierende Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist nur von kurzer Dauer, da zum einen eine schnelle Dephosphorylierung des IP<sub>3</sub> durch Phosphatasen zu dessen Inaktivierung führt [Rüegg, 1996], und zum anderen die Calciumkanäle bei einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von ca. 500 nM wieder geschlossen werden.

Das bei der Spaltung des PIP<sub>2</sub> ebenfalls gebildete DAG kann die Proteinkinase C, der eine Rolle bei der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung der glatten Muskulatur (s. I; 4) zugesprochen wird, aktivieren.



**Abb. I-4:** Schematische Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der glatten Muskelzelle über die Inositol-1,4,5-trisphosphat-Signalkaskade.

GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; Gβγ/Gα: heterotrimeres G-Protein; PLC: Phospholipase C; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidyl-4,5-bisphosphat; IP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat; IP<sub>3</sub>R: IP<sub>3</sub>-Rezeptor

Zahlreiche Studien mit radioaktiv markierten IP<sub>3</sub>-Molekülen, „caged“-IP<sub>3</sub> und spezifischen Inhibitoren des IP<sub>3</sub>-Signalweges [Baron et al., 1989; Walker et al., 1987; Kobayashi et al., 1989] konnten die Hypothese der IP<sub>3</sub>-vermittelten Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum bestätigen.

Zusätzlich kommt es bei der Agonisten-induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Einige Agonisten, wie z.B. Noradrenalin, können über Aktivierung von G-Protein- oder Phosphorylierungskaskaden [Übersicht bei

Brown und Birnbaumer, 1990] die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle derart beeinflussen, daß bereits bei Ruhemembranpotentialen ein Influx von Calciumionen stattfinden kann [Nelson et al., 1988].

### 2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einer glatten Muskelzelle liegt bei einem Basalwert von ca. 100 nM und steigt während einer Kontraktion auf Werte um 600-800 nM an [Somlyo und Himpens, 1989]. Die freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden in der Zelle von Calmodulin (CaM) gebunden, einem ca. 17 kDa schweren Protein mit zwei hochaffinen und zwei niederaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen. Der entstehende  $[\text{Ca}^{2+}]_4$ -CaM-Komplex, im weiteren Text kurz als  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM bezeichnet, aktiviert die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK) unter Ausbildung eines  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-MLCK Holoenzym. Die aktivierte MLCK ist nun in der Lage, die regulatorischen leichten Ketten des Myosins II (r-MLC) zu phosphorylieren, und so die Interaktion von Aktin und Myosin zu ermöglichen. Dadurch kann der Querbrückenzyklus stimuliert werden und es kommt zu einer Kontraktion der Muskulatur. Die zentrale Bedeutung der r-MLC-Phosphorylierung konnte 1982 gezeigt werden [Walsh et al., 1982]: Wird permeabilisierter glatter Muskel des Hühnerkaumagens in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit einem konstitutiv aktiven Fragment der MLCK inkubiert, kommt es zu einer Phosphorylierung der r-MLC und einer Kontraktion des Gewebes.

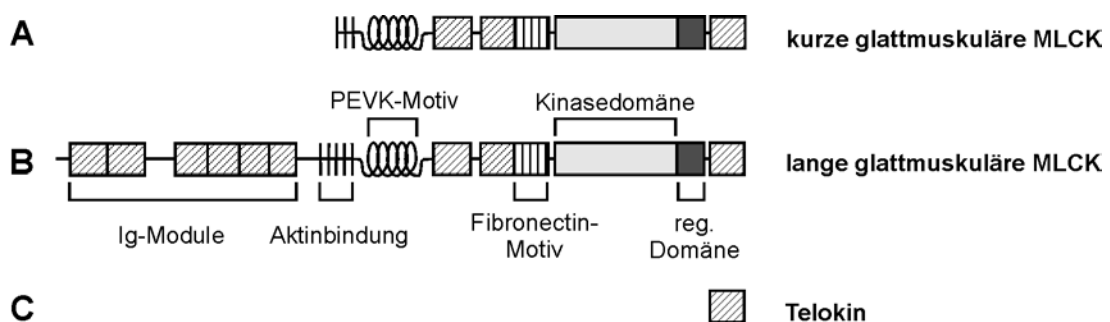
Die Relaxation erfolgt prinzipiell analog zum oben beschriebenen Mechanismus. Sinkt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ab, führt dies zu einer Dissoziation des  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-MLCK Holoenzym und damit zu einer Inaktivierung der MLCK. Das Aktivitätsgleichgewicht zwischen der MLCK und ihrem Gegenspieler, der Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP), verschiebt sich dabei zugunsten der MLCP und es kommt zu einer Dephosphorylierung der r-MLC und zu einer Relaxation des Muskels.

Die r-MLC werden von der MLCK typischerweise am Serinrest 19 phosphoryliert. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. hohen Aktivierungszuständen der MLCK oder kurzfristig unter Stimulation mit Rezeptoragonisten [Ikebe und Hartshorne, 1985; Ikebe et al., 1986; Park und Rasmussen, 1986], kann zusätzlich eine weitere Aminosäure, Threonin 18, phosphoryliert werden.

### 3 Schlüsselenzyme der glattmuskulären Kontraktion: MLCK und MLCP

#### 3.1 Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK)

Untersuchungen mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden haben zur Charakterisierung der MLCK in einer Vielzahl von Spezies und Geweben geführt [Übersicht bei Gallagher et al., 1997]. Die glattmuskuläre MLCK wird in Vertebraten in drei verschiedenen Isoformen (Abb. I-5), die alle vom gleichen Gen kodiert, aber durch unterschiedliche Promotoren reguliert werden, exprimiert [Birukov et al., 1998]. Die im glatten Muskelgewebe dominante Isoform hat ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa, wird ubiquitär exprimiert [Guerrero et al., 1981] und co-lokalisiert mit filamentösem Aktin und Myosin-haltigen Strukturen in der Zelle [de Lanerolle et al., 1981]. Diese Isoform der MLCK besteht neben dem katalytischen Zentrum und der regulatorischen Domäne aus verschiedenen strukturellen Motiven (Abb. I-5; A): Am N-Terminus des Proteins befinden sich wiederholend 24 bzw. 28 Aminosäuren lange Sequenzen, mit denen die Aktin-Bindungsstelle der Proteinkinase co-lokalisiert werden konnte [Kanoh et al., 1993]. Dieser Sequenzbereich ist sowohl notwendig als auch ausreichend für eine Assoziation der MLCK am Aktinfilamentsystem [Lin et al., 1999]. Neuere Untersuchungen konnten die minimale Aktinbindungsstelle der MLCK auf drei DFRXXL-Motive im N-Terminus des Proteins eingrenzen [Smith et al., 1999], wobei jedes Motiv für die Bindung an ein Aktinmonomer verantwortlich sein könnte [Smith und Stull, 2000].



**Abb. I-5:** Die drei Transkripte des glattmuskulären MLCK-Gens.

**A** Kurze glattmuskuläre Isoform der MLCK. **B** Lange glattmuskuläre Isoform. **C** Telokin. Ig-Module: Immunglobulin-ähnliche Module; reg. Domäne: regulatorische Domäne. Nach [Kamm und Stull, 2001].

Auf die Aktinbindungsstelle folgt erneut ein Bereich mit sich wiederholenden Aminosäuresequenzen. Es handelt sich dabei um sogenannte PEVK-Motive, deren Funktion bisher ungeklärt ist. Sie könnten zusammen mit den ebenfalls N-terminal lokalisierten Immunglobulin (Ig)- und Fibronektin-ähnlichen Modulen als flexible Verbindung zwischen Aktinbindungsstelle und katalytischem Zentrum dienen, die der Kinasedomäne den Zugang zu den r-MLC am dicken Filament ermöglicht. Strukturelle Motive dieser Art existieren auch in dem großen Muskelprotein Titin (~3 MDa) und stellen durch partielle Entfaltung der  $\beta$ -Faltblattmotive eine wichtige elastische Komponente der Muskulatur dar.

Größere Isoformen der glattmuskulären MLCK (~210 kDa) sind N-terminal elongiert [Watterson et al., 1995] und besitzen zusätzliche Aktinbindungsstellen sowie weitere Ig-ähnliche Module (Abb. I-5; B). Diese Isoformen werden in adultem Gewebe nur schwach exprimiert, konnten aber in embryonalen Geweben detektiert werden [Gallagher et al., 1995] und könnten eine Rolle bei der Entwicklung spielen.

Das dritte Produkt des glattmuskulären MLCK-Gens besteht lediglich aus dem am C-Terminus lokalisierten Ig-ähnlichen Motiv und besitzt weder Kinase- noch regulatorische Domäne (Abb. I-5; C) [Ito et al., 1989]. Die Expression des sogenannten Telokins wird durch einen im Gen befindlichen Promotor gesteuert. Telokin stabilisiert unphosphorylierte Myosinfilamente *in vitro* [Shirinsky et al., 1993], und könnte als strukturelles Motiv in der Proteinkinase zur Bindung der MLCK an Myosin dienen. Des Weiteren wird diskutiert, daß Telokin an der Kontrolle der Phosphorylierung und Dephosphorylierung der r-MLC mitwirkt [Übersicht bei Vorotinkov, 1997], eventuell durch Beeinflussung der MLCP-Aktivität [Wu et al., 1998]. Die Phosphorylierung des Telokins, deren komplexe Regulation unter Beteiligung verschiedener Proteinkinasen mit neueren Daten belegt werden konnte [Krymsky et al., 2001], könnte dabei eine wichtige Rolle spielen.

Der Aufbau des katalytischen Zentrums der MLCK folgt dem klassischen Schema anderer Serin/Threonin-Proteinkinasen. Die MLCK unterscheidet sich jedoch von vielen anderen Proteinkinasen durch die Tatsache, daß sie lediglich ein einziges physiologisches Substrat, nämlich die regulatorischen leichten Ketten des Myosins II, besitzt.

In der regulatorischen Domäne der MLCK konnte durch Mutationsstudien eine autoinhibitorische Region identifiziert werden [Shoemaker et al., 1990; Ito et al., 1991], deren Sequenz teilweise große Ähnlichkeit zum Phosphorylierungsmotiv der r-MLC aufweist [Kemp et al., 1987] und als Pseudosubstrat zur Inhibierung der Kinaseaktivität

dienen könnte (Abb. I-8; S. 18). Mit späteren Untersuchungen konnten weitere, von der Sequenz des Pseudosubstrats abweichende Bereiche mit der autoinhibitorischen Funktion der regulatorischen Domäne korreliert werden [Tanaka et al., 1995]. Intramolekulare Interaktionen zwischen der katalytischen Domäne und der autoinhibitorischen Region blockieren den Zugang des Substrats zum katalytischen Zentrum, so daß die MLCK in einer geschlossenen, inaktiven Konformation vorliegt und in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  nur sehr schwach aktiv ist. Die Aufhebung dieser Interaktion, und damit die Stimulierung der Kinaseaktivität, erfolgt durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , die ebenfalls im regulatorischen, C-terminalen Bereich der Proteinkinase stattfindet (Abb. I-8; S. 18) [Blumenthal et al., 1985; Edelman et al., 1985]. Bindungsstudien mit Peptiden der  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindungsregion und Calmodulin haben gezeigt, daß das in Lösung eher länglich geformte Calmodulin seine Konformation durch Komplexbildung mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Bindung an die MLCK stark ändert und eine kompakte, globuläre Form einnimmt [Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992]. Von Johnson et al. [Johnson et al., 1996a] wurde die Theorie aufgestellt, daß die hochaffinen Bindungsstellen des Calmodulins schon bei basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu 50-80 % besetzt sind und eine Bindung an die MLCK ermöglichen, diese Bindung allerdings noch keine Aktivierung der Kinase bewirkt. Erst die Besetzung der niederaffinen Bindungsmotive führt zum Kollaps des Calmodulins in die globuläre Konformation und löst damit eine starke Konformationsänderung in der MLCK aus. Die intramolekulare Interaktion der katalytischen Domäne und der autoinhibitorischen Region wird dadurch aufgehoben und das katalytische Zentrum für das Substrat zugänglich. Mit Hilfe der Methode der Neutronenstreuung konnte sowohl der Kollaps des Calmodulins und die dadurch induzierte Konformationsänderung der MLCK [Krueger et al., 1997] als auch die sequentielle Besetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen des Calmodulins und deren Auswirkung auf die Konformation der MLCK belegt werden [Krueger et al., 1998].

Die durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  induzierte Aktivierung der MLCK kann durch die Phosphorylierung der MLCK durch verschiedene Proteinkinasen reguliert werden. Dieser Regulationsmechanismus spielt für die Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente (s. I; 4) eine bedeutende Rolle und wird später näher besprochen (s. I; 4.1.1).

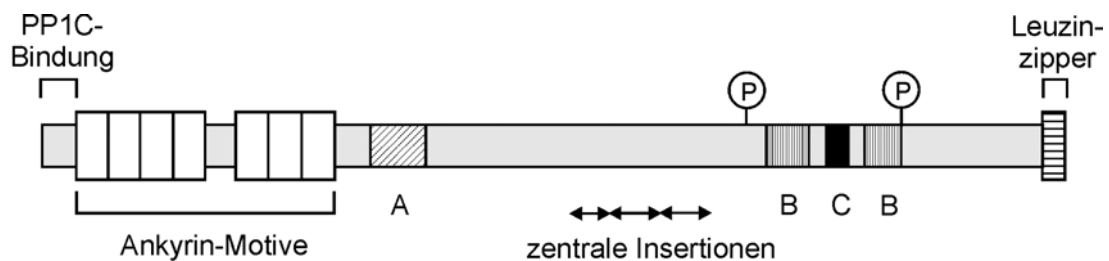
### 3.2 Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP)

Der Proteinphosphatase, die spezifisch für die Dephosphorylierung der r-MLC im Zuge der Relaxation der glatten Muskulatur verantwortlich ist, wurden schon früh verschiedene Charakteristika zugesprochen. So war bekannt, daß es sich um eine Proteinphosphatase vom Typ 1 handelt, die nah am kontraktilen Apparat lokalisiert sein muß und natürlich zur Dephosphorylierung der r-MLC in filamentösem Myosin in der Lage ist. In ersten Präparationen aus verschiedenen glattmuskulären Geweben konnte ein aus drei Untereinheiten zusammengesetztes Holoenzym gereinigt werden [Alessi et al., 1992; Shimizu et al., 1994; Shirazi et al., 1994], bestehend aus einer 38 kDa großen katalytischen Untereinheit, sowie einer regulatorischen Untereinheit von ca. 130 kDa und einer weiteren Untereinheit von ca. 20 kDa. Verschiedene Untersuchungen konnten belegen, daß es sich bei diesem Holoenzym um die Myosin leichte Ketten Phosphatase handelt. Die Aktivität der katalytischen Untereinheit gegenüber phosphoryliertem Myosin wird in Anwesenheit der beiden anderen Untereinheiten stimuliert [Alessi et al., 1992; Shirazi et al., 1994]. Außerdem konnte in Sedimentationsversuchen die Assoziation des Holoenzym mit filamentösem Myosin gezeigt werden [Shimizu et al., 1994] und bei Zellfraktionierungsexperimenten werden 80-90 % des Holoenzym in der myofibrillären Fraktion gefunden [Alessi et al., 1992]. Des weiteren kann mit Antikörpern gegen die beiden nicht-katalytischen Untereinheiten eine nahezu vollständige Immunpräzipitation des Holoenzym erfolgen, wodurch eine enge Assoziation zwischen den Proteinuntereinheiten bestätigt wurde [Johnson et al., 1997].

Die katalytische Untereinheit der MLCP gehört nach den Kriterien von Ingebritsen und Cohen [Ingebritsen und Cohen, 1983] zum Typ 1C der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (PP1C). Von den fünf verschiedenen Isoformen der PP1C, die in Vertebraten exprimiert werden, scheint die  $\delta$ -Isoform mit dem Holoenzym assoziiert zu sein [Übersicht bei Hartshorne et al., 1998]. Im C-terminalen Bereich der PP1C befindet sich eine Phosphorylierungsstelle für die cdc2-Kinase, deren Phosphorylierung zu einer verringerten Aktivität des Enzym führt [Johansen und Ingebritsen, 1986]. Für die Regulation der PP1C-Aktivität während der glattmuskulären Kontraktion scheint diese Phosphorylierung, die z.B. bei mitotischen Vorgängen beobachtet wird [Dohadwala et al., 1994], allerdings nicht von Bedeutung zu sein.

Die große regulatorische Untereinheit der MLCP sorgt für die Lokalisierung des Holoenzym am Myosin und wird daher auch als *myosin phosphatase target subunit 1*,

kurz MYPT1, bezeichnet. Sie wird in einer Vielzahl von Geweben in unterschiedlichen Isoformen exprimiert [Übersicht bei Hartshorne et al., 1998], die sich in ihrer Struktur allerdings kaum unterscheiden (Abb. I-6): Im N-Terminus befindet sich eine Reihe von Ankyrin-Motiven [Shimizu et al., 1994], die in einer Vielzahl von Proteinen vorkommen und wahrscheinlich für Proteininteraktionen wichtig sind. Des Weiteren wurden saure und ionische Regionen identifiziert, sowie ein Serin/Threonin-reicher Bereich. C-terminal wird in einigen Isoformen ein Leuzin-Zipper gefunden. Die MYPT1 weist in diesem Bereich Sequenzhomologien zu der kleinen, 20 kDa Untereinheit (M20) des Holoenzym auf [Chen et al., 1994]. Im zentralen Bereich des Proteins liegen drei kurze Insertionen vor, die in einigen Isoformen deletiert sind.



**Abb. I-6:** Domänenstruktur der MYPT1.

PP1C: Proteinphosphatase vom Typ 1C; A: azidische Region; B: ionische Region;

C: Serin/Threonin-reiche Region

Nach [Hartshorne et al., 1998].

Die MYPT1 bindet im N-terminalen Bereich mit hoher Affinität an phosphoryliertes Myosin [Ichikawa et al., 1996a]. Ebenfalls N-terminal findet die Bindung der PP1C statt, während die M20-Untereinheit im C-Terminus der MYPT1 gebunden wird [Hirano et al., 1997]. Der N-Terminus der MYPT1 alleine kann über simultane Bindung von Myosin und PP1C eine Stimulierung der Phosphataseaktivität der katalytischen Untereinheit gegenüber phosphoryliertem Myosin bewirken [Johnson et al., 1996b].

Unter bestimmten experimentellen Bedingungen konnte eine Assoziation der MLCP mit der Zellmembran [Inagaki et al., 1997] bzw. die Isolierung der MYPT1 in Membranfraktionen [Kimura et al., 1996; Ito et al., 1997] festgestellt werden. Ito et al. [Ito et al., 1997] konnten zeigen, daß die MYPT1 mit ihrem C-Terminus an saure Phospholipide bindet und daß daraus eine Inhibierung der Phosphataseaktivität des Holoenzym resultiert.



Die Assoziation zwischen der MYPT1 und der katalytischen Untereinheit kann vielfältig reguliert werden und spielt eine bedeutende Rolle bei der Modulation der Phosphataseaktivität. Die unterschiedlichen Regulationsmechanismen sollen im Rahmen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der Myofilamente (s. I; 4.1.2) näher besprochen werden.

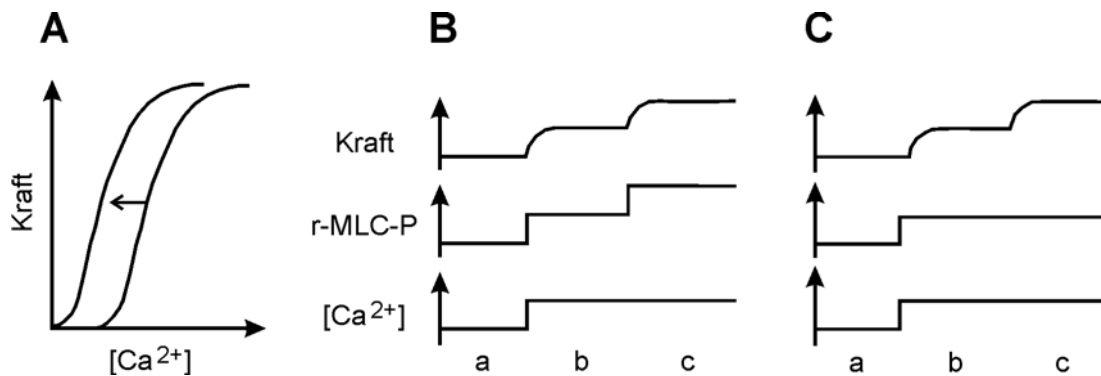
Die Funktion der kleine Untereinheit M20 ist bisher nicht geklärt. Für die Stimulierung der Phosphataseaktivität scheint sie nicht notwendig zu sein [Hirano et al., 1997].

#### 4 Modulation der $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente

Die Kopplung zwischen intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Phosphoryierungsgrad der r-MLC und Ausmaß der induzierten Kontraktion ist im glatten Muskel in vielen Fällen nicht linear. So induziert das Thromboxanalogon U-46619 eine deutliche Kraftentwicklung bei einem geringen oder, im Falle von  $\text{Ca}^{2+}$ -freier extrazellulärer Lösung, sogar komplett ohne Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration [Bradley und Morgan, 1987; Himpens et al., 1990]. Bei unterschiedlichen Bedingungen kann es so bei konstanter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgrund einer Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit der Myofilamente zur Ausbildung unterschiedlicher Kraftniveaus kommen. Dieses Phänomen, das als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung (bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung) bezeichnet wird, kann durch zwei Mechanismen erfolgen (Abb. I-7) [Übersicht bei Pfitzer, 2001]:

Beim ersten Typ der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung (s. I; 4.1; Abb. I-7; B) ändert sich die Empfindlichkeit der r-MLC-Phosphorylierung gegenüber der Calciumkonzentration. Dies wird erreicht durch eine Verschiebung des Aktivitätsgleichgewichts zwischen den beiden Gegenspielern MLCK und MLCP, also durch calciumunabhängige Aktivierung bzw. Inhibierung der MLCK und der MLCP. Bei diesem Mechanismus ändert sich das Verhältnis zwischen r-MLC-Phosphorylierung und Kontraktionskraft nicht.

Der zweite Mechanismus (s. I; 4.2; Abb. I-7; C) ist unabhängig von einer Phosphorylierung der r-MLC und involviert wahrscheinlich die regulatorischen Proteine des dünnen Filaments, Calponin und Caldesmon. Es kommt bei dieser Art der Sensitivierung zu einer Veränderung der Beziehung zwischen Kraft und r-MLC-Phosphorylierung.



**Abb. I-7:** Schematische Darstellung der Mechanismen zur Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung der Kraft.

**A** Linksverschiebung der Kraft-[Ca<sup>2+</sup>]-Kurve als Ausdruck der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung der Kraft wie in B (c) bzw. C (c) dargestellt.

**B** Sensitivierung der r-MLC-Phosphorylierung, und damit der Kraft, gegenüber der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.

**(a)** Ruhe, **(b)** Kraftgeneration durch Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, **(c)** Kraftgeneration ohne weiteren Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration: Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung.

**C** Sensitivierung der Kraft gegenüber der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei konstanter r-MLC-Phosphorylierung.

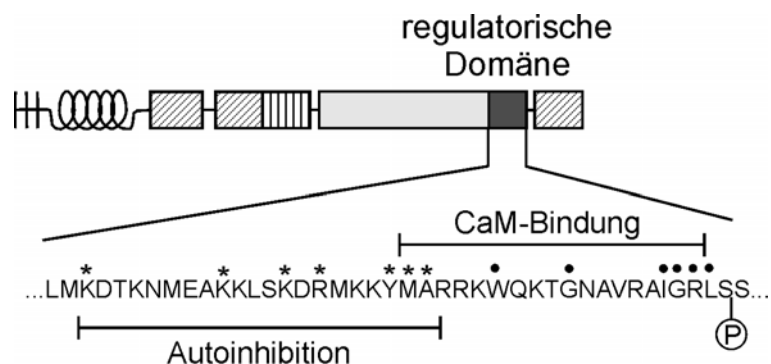
**(a,b)** s. B, **(c)** Kraftgeneration ohne weiteren Anstieg von Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und r-MLC-Phosphorylierung: Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung.

#### 4.1 Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung über Regulation der Beziehung zwischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und r-MLC-Phosphorylierung

Der Phosphorylierungsgrad der r-MLC wird in der glatten Muskulatur durch das Aktivitätsverhältnis der beiden Enzyme MLCK und MLCP reguliert. Kommt es zu einer Aktivierung oder Inhibierung eines der Gegenspieler bei konstanter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, verschiebt sich mit dem Aktivitätsgleichgewicht der beiden Enzyme auch das Verhältnis zwischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und r-MLC-Phosphorylierung.

#### 4.1.1 Beeinflussung der MLCK-Aktivität

Wie bereits in einem früheren Kapitel erläutert (s. I; 3.1), wird die Aktivität der MLCK primär durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert: In Abwesenheit von Calcium ist die MLCK sehr schwach aktiv und wird beim Anstieg des intrazellulären Calciums durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  konzentrationsabhängig stimuliert. Die Aktivität der MLCK kann jedoch zusätzlich durch Phosphorylierung reguliert werden, wobei vor allem inhibitorische Phosphorylierungsereignisse eine Rolle spielen.



**Abb. I-8:** Aufbau der kurzen glattmuskulären MLCK-Isoform mit Detailansicht der regulatorischen Domäne.

Angegeben ist die Aminosäuresequenz der Kaninchen-MLCK. Die Sterne markieren essentielle Aminosäuren für die Autoinhibition, die Punkte wichtige Aminosäuren der CaM-Bindung. Die Farbgebung der einzelnen Strukturmodule entspricht Abb. I-5; S. 11. CaM-Bindung:  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindungsregion  
Nach [Gallagher et al., 1997].

Schon früh gab es Befunde von *in vitro*-Studien, die eine Phosphorylierung der MLCK durch andere Proteinkinasen zeigen. So wurde MLCK als *in vitro*-Substrat für die cAMP-abhängige Kinase (PKA) [Conti und Adelstein, 1981], die Proteinkinase C (PKC) [Nishikawa et al., 1985] und die  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -abhängige Proteinkinase II (CaM-KII) [Hashimoto und Soderling, 1990; Ikebe und Reardon, 1990a] beschrieben. Die Phosphorylierung der MLCK an einem C-terminal, in der Nähe der CaM-Bindungsstelle gelegenen Serinrest, der sogenannten Position A (Abb. I-8), führt zu einer verminderten Affinität der Kinase zu  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und somit konsequenterweise bei konstanter  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Konzentration zu einer niedrigeren Aktivität des Enzyms. Damit einher gehend ist eine

Desensitivierung der glatten Muskulatur. *In vitro* inhibiert die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  die Phosphorylierung der MLCK an Position A durch alle drei Kinasen.

*In vivo* ist die Datenlage wesentlich uneindeutiger. Bezüglich der Phosphorylierung durch die PKA liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Während Miller [Miller et al., 1983] nach Stimulierung mit  $\beta$ -adrenergen Agonisten, die eine Erhöhung des cAMP-Spiegels der Zelle induzieren, keine verstärkte Phosphorylierung der MLCK beobachten konnte, zeigen de Lanerolle et al. [de Lanerolle et al., 1984] eine Inkorporation von radioaktiv markiertem Phosphat in die MLCK nach Stimulierung der cAMP-Synthese. Die Phosphorylierung der MLCK durch die CaM-KII ist dagegen sowohl in intakten als auch in permeabilisierten glatten Muskelpräparaten belegt [Tansey et al., 1992 und 1994] und besitzt auch physiologische Relevanz [Übersicht bei Gallagher et al., 1997].

In neueren Arbeiten konnte eine Phosphorylierung der MLCK durch Mitglieder der Familie der p21-aktivierten Proteinkinasen (PAK) in kultivierten Zellen nicht-muskulären Ursprungs gezeigt werden [Sanders et al., 1999; Goeckeler et al., 2000]. Die Phosphorylierung der MLCK sowohl durch PAK1 [Sanders et al., 1999] als auch durch PAK2 [Goeckeler et al., 2000] vermindert die enzymatische Aktivität der MLCK.

Auch eine Aktivierung der MLCK durch Fremdphosphorylierung konnte bei *in vitro*-Studien mit synthetischen Peptidsubstraten gezeigt werden. Sowohl die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) als auch die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) phosphorylieren die MLCK hauptsächlich an je einem Aminosäurerest, der außerhalb der  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Bindungsregion liegt, und erhöhen die ATPase-Aktivität der MLCK [Morrison et al., 1996]. Während diesbezüglich für die glatte Muskulatur noch keine *in vivo*-Daten vorliegen, konnte für verschiedene nicht-muskuläre Zellen eine Bedeutung der MAPK-vermittelten Stimulierung der MLCK-Aktivität für Zellmotilität und -migration gezeigt werden [Klemke et al., 1997; Nguyen et al., 1999]

Die MLCK weist neben der physiologisch relevanten Position A weitere Phosphorylierungsstellen auf und kann *in vivo* multipel phosphoryliert vorliegen [Stull et al., 1990]. Die Phosphorylierung der sechs weiteren identifizierten Aminosäuren hat jedoch keinen Einfluß auf die Bindungsaffinität der MLCK zu  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Ihre physiologische Funktion ist noch nicht geklärt.

### 4.1.2 Beeinflussung der MLCP-Aktivität

Wie bereits ausführlich dargelegt (s. I; 3.2), besteht die MLCP aus drei Untereinheiten, wobei die große regulatorische Untereinheit, die MYPT1, mittels spezifischer Bindungsstellen für eine Lokalisierung des Holoenzym am Myosin sorgt. Die Sequenz der MYPT1 weist mindestens zwei Phosphorylierungsstellen auf (s. Abb. I-6; S. 15), die Angriffspunkte für die Regulation der Aktivität der MLCP darstellen. Wie in verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt werden konnte, führt die Phosphorylierung der MYPT1 zu einer Inhibierung der Phosphataseaktivität des Holoenzym [Trinkle-Mulcahy et al., 1995; Ichikawa et al., 1996b]. Bei der Isolierung der MLCP aus Hühnerkaumagen wird diese zusammen mit einer assoziierten endogenen Kinase aufgereinigt [Ichikawa et al., 1996b]. Diese Kinase phosphoryliert die MYPT1 der MLCP und hemmt die Phosphataseaktivität *in vitro*. Einige Jahre später konnte diese endogene Kinase als ZIP-ähnliche Kinase (Zipper-interagierende Kinase (ZIPK) s. I; 5) identifiziert werden [MacDonald et al., 2001].

Die Aktivierung der ZIP-ähnlichen Kinase und die daraus folgende Phosphorylierung der MYPT1 könnte über einen der drei bisher bekannten Signalwege, die zu einer Hemmung der MLCP in der glatten Muskulatur führen, erfolgen. Diese Signalkaskaden sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

Die Rho-Kinase (ROK), eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die durch die monomere GTPase RhoA in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form stimuliert wird, scheint an der Regulation der Aktivität der MLCP entscheidend beteiligt zu sein. Schon 1992 konnte gezeigt werden, daß das nicht-hydrolysierbare GTP-Analog GTP $\gamma$ S, welches unter anderem eine konstitutive Aktivierung der monomeren G-Proteine bewirkt, in permeabilisierter glatter Muskulatur durch Hemmung der MLCP zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität führt [Kubota et al., 1992]. Daß dieser durch GTP $\gamma$ S ausgelöste Effekt in der Tat über die subsequente Aktivierung von RhoA und ROK verlaufen kann, wurde später sowohl *in vitro* [Kimura et al., 1996; Feng et al., 1999a; Übersicht bei Pfitzer und Arner, 1998] als auch an permeabilisierten glatten Muskelpräparaten gezeigt [Otto et al., 1996; Kureishi et al., 1997]. Neueste Studien der Arbeitsgruppe von Morgan [Shin et al., 2002] zeigen, daß die Phosphorylierung der MYPT1 durch die ROK zu einer Dissoziation der katalytischen Untereinheit der MLCP und der MYPT1 führt. Da die katalytische Untereinheit eine geringere Aktivität besitzt, wenn sie nicht an die MYPT1 gebunden ist,

bewirkt die Dissoziation der Untereinheiten eine Verringerung der Phosphataseaktivität. Der Dissoziation geht die Translokation der MLCP zur Membran voran, ihr folgt der Anstieg der r-MLC-Phosphorylierung.

Die Daten zur Arachidonsäure-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung stehen teilweise in direktem Zusammenhang mit dem gerade beschriebenen Signalweg. Arachidonsäure wird durch eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  in der Zellmembran gebildet und dient nicht nur in der glatten Muskelzelle als sekundärer Botenstoff. Die Inkubation von gehäuteten Muskelpräparaten mit Arachidonsäure führt zu einer Steigerung der Kraftentwicklung und einer Zunahme der r-MLC-Phosphorylierung bei konstanter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Beide Effekte werden durch eine Inhibierung der MLCP hervorgerufen [Gong et al., 1992a]. Diese Inhibierung wird durch die direkte Bindung der Arachidonsäure an die MYPT1 und die dadurch induzierte Dissoziation des Holoenzym ausgelöst. Außerdem aktiviert Arachidonsäure die ROK [Feng et al., 1999b], und kann so über den oben beschriebenen Signalweg zu einer inhibitorischen Phosphorylierung der MYPT1 führen.

Für verschiedene glattmuskuläre Agonisten, wie z.B. Phenylephrin, konnte die Steigerung der Arachidonsäurekonzentration und eine damit einher gehende Sensitivierung der Kontraktion gezeigt werden [Gong et al., 1995], so daß der Arachidonsäure durchaus physiologische Relevanz bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung zukommen kann.

Die dritte bisher bekannte Signalkaskade, die zu einer Inhibierung der MLCP führen kann, wird über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ausgelöst. Sowohl Phorbolster (PDBu) als auch Diacylglycerol (DAG), die beide eine Aktivierung der PKC bewirken, induzieren eine Kontraktion und eine Erhöhung der r-MLC-Phosphorylierung im glatten Muskel [Itoh et al., 1993]. Die Aktivierung einer atypischen PKC-Isoform wurde außerdem für die Arachidonsäure, deren Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der glatten Muskulatur im vorangehenden Abschnitt bereits erläutert wurde, gezeigt [Gailly et al., 1997]. Als ein Substrat der PKC wurde das Protein CPI-17 beschrieben [Eto et al., 1995], das in seiner phosphorylierten, aktiven Form Proteinphosphatasen vom Typ 1, zu dem auch die MLCP gehört, inhibiert. Untersuchungen mit thiophosphoryliertem CPI-17 [Li et al., 1998a] und Rekonstitutionsstudien an permeabilisierter glatter Muskulatur [Kitazawa et al., 1999] haben die Phosphorylierung des CPI-17 durch die PKC und seine anschließende inhibitorische Bindung an die MLCP bestätigt. Außerdem konnte in permeabilisierten

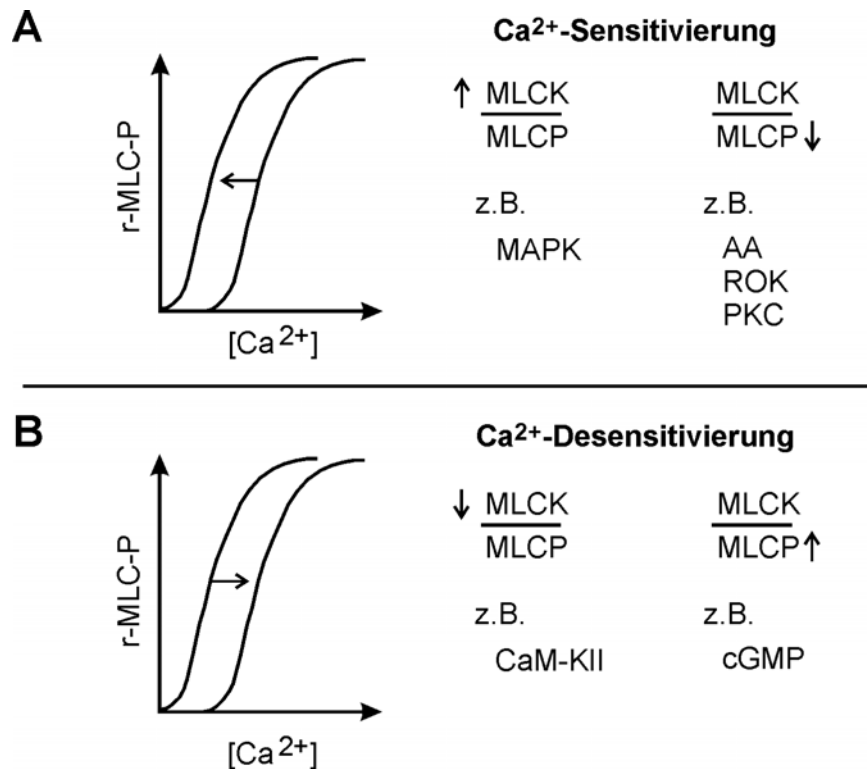
glattmuskulären Präparaten gezeigt werden, daß die nach Agonistenstimulation beobachtete Phosphorylierung des CPI-17 durch Inhibitoren der PKC, aber auch durch ROK-Inhibitoren gehemmt werden kann [Kitazawa et al., 2000]. Die Phosphorylierung des CPI-17 durch die ROK konnte auch bei *in vitro*-Studien beobachtet werden [Koyama et al., 2000].

Auch der gegenläufige Effekt einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung der glatten Muskulatur ist durch Beeinflussung der MLCP-Aktivität zu erreichen. Kommt es bei konstanter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Aktivierung der Phosphatase, wird der r-MLC-Phosphorylierungsgrad reduziert und die Kontraktionskraft sinkt. Eine Desensitivierung der Kontraktion, die über cGMP und Proteinkinase G (PKG) ausgelöst wird, konnte in verschiedenen glattmuskulären Geweben beobachtet werden [Pfitzer et al., 1986; Nishimura und van Breemen, 1989; Savineau und Marthan, 1994]. Später gelang sowohl in glatter Muskulatur des Darms [Wu et al., 1996] als auch in vaskulärem Gewebe [Lee et al., 1997a] der Nachweis, daß die cGMP-regulierte PKG durch eine Aktivierung der MLCP zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung der glattmuskulären Myofilamente führt. Der Mechanismus der PKG-vermittelten Stimulierung der Phosphataseaktivität ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Die PKG könnte über die Hemmung von RhoA der RhoA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung entgegen wirken [Sauzeau et al., 2000] und so zu einer Insensitivierung der glattmuskulären Kontraktion führen.

In Abbildung I-9 sind einige Signalproteine, die über Modulation der Aktivitäten von MLCK und MLCP zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung (Abb. I-9; A) bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung (Abb. I-9; B) der glattmuskulären Kontraktion führen, zusammengefaßt dargestellt.

### **4.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung über Regulation der Beziehung zwischen r-MLC-Phosphorylierung und Kontraktionskraft**

Die Theorie, nach der die Aktivierung der glatten Muskulatur direkt über die Phosphorylierung der r-MLC gesteuert wird, impliziert eine lineare Abhängigkeit von r-MLC-Phosphorylierungsgrad und induzierter Kontraktionskraft. Tatsächlich findet sich jedoch eine Vielzahl von Bedingungen [Übersicht bei Kamm und Stull, 1985], unter denen es zu einer Dissoziation von Phosphorylierung und Kraft kommt und niedrige r-MLC-



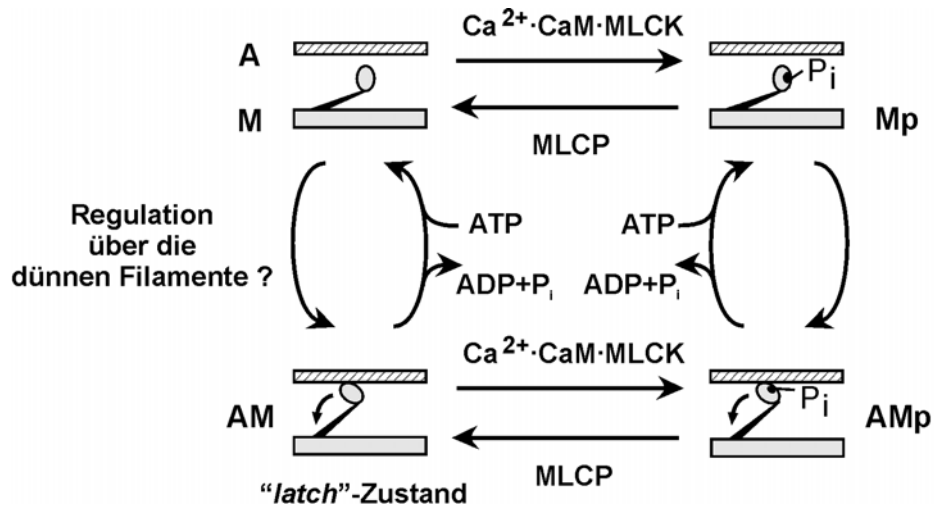
**Abb. I-9:** Potentielle Mechanismen zur Regulierung der Ca<sup>2+</sup>-Empfindlichkeit der r-MLC-Phosphorylierung durch Beeinflussung des MLCK-MLCP-Aktivitätsgleichgewichtes.

**A** Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung. **B** Ca<sup>2+</sup>-Desensitivierung.

MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; AA: Arachidonsäure; ROK: Rho-Kinase; PKC: Proteinkinase C; CaM-KII: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Phosphorylierung zu hoher Kraftentwicklung führt. Besonders bei lang anhaltender Aktivierung der glatten Muskulatur bleibt die Kraft aufrechterhalten, während die r-MLC-Phosphorylierung zu nahezu basalen Werten zurückkehrt. Hai und Murphy [Hai und Murphy, 1989] entwarfen ein kinetisches Modell, das diese Aufrechterhaltung der Kraft durch dephosphorylierte Querbrücken erklärt. Bei diesem über vier Schritte ablaufenden Zyklus (Abb. I-10) kommt es zunächst zur Ca<sup>2+</sup>-induzierten MLCK-abhängigen Anheftung von phosphorylierten, kraftgenerierenden Querbrücken. Nach der Dephosphorylierung der r-MLC durch die MLCP erfolgt die Dissoziation der jetzt dephosphorylierten Querbrücken nur sehr langsam, so daß diese zusammen mit den phosphorylierten Querbrücken zur Kraftgenerierung beitragen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Myofilamente im sogenannten „latch“-Zustand, benannt nach dem „Sperrtonus“ glatter Schließmuskeln von Muscheln, der ein extremes Beispiel dieses Zustandes darstellt.





**Abb. I-10:** Schematische Darstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Aktivierung des Querbrückenzyklus und des „latch“-Zustandes.

A: Aktin; M: Myosin; Mp: phosphoryliertes Myosin

Nach [Hai und Murphy, 1988].

Ein alternatives Modell [Himpens et al., 1988] postuliert Kooperativität von phosphorylierten und unphosphorylierten Querbrücken. Demnach erlaubt die Anheftung weniger phosphorylierter Querbrücken auch unphosphorylierten Myosinmolekülen die Bindung an Aktin, so daß die Gesamtkraft auch hier bei insgesamt niedriger r-MLC-Phosphorylierung aus einer Mischung von phosphorylierten und unphosphorylierten Querbrücken resultiert.

Die langsame Dissoziation der unphosphorylierten Querbrücken im Modell von Hai und Murphy [Hai und Murphy, 1989] bzw. die Kooperativität phosphorylierter und unphosphorylierter Querbrücken, die von Himpens [Himpens et al., 1988] postuliert wird, könnte unter Einbeziehung der regulatorischen Proteine des dünnen Filaments, Calponin [Malmqvist et al., 1997] (s. I; 4.2.1) und Caldesmon [Albrecht et al., 1997] (s. I; 4.2.2), reguliert werden (Abb. I-10).

#### 4.2.1 Beteiligung von Calponin an der $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der glatten Muskulatur

Takahashi et al. konnten 1988 ein Troponin T-verwandtes Protein aus Gefäßmuskulatur isolieren, das sowohl an skeletales Troponin C als auch an glattmuskuläres Tropomyosin und Aktin bindet [Takahashi et al., 1988]. Das sogenannte Calponin ist ein ca. 32 kDa

schweres Protein, das im glatten Muskel neben Aktin und Tropomyosin auch an Myosin und Calmodulin binden kann. Diese vielfältigen Bindungspartner legten die Vermutung nahe, daß Calponin an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion beteiligt ist, und es konnte in der Tat gezeigt werden, daß Calponin *in vitro* die Aktin-aktivierte Myosin-ATPase-Aktivität inhibiert [Winder und Walsh, 1990]. Studien mit Calponin und Calponinpeptiden an permeabilisierten Muskelpräparaten zeigen einen hemmenden Effekt auf die Kontraktilität [Übersicht bei Horowitz et al., 1996]. Calponin wird *in vitro* von der Proteinkinase C (PKC), der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaM-KII) [Winder und Walsh, 1990] und der Rho-Kinase (ROK) [Kaneko et al., 2000] phosphoryliert. Nach Phosphorylierung durch die ROK ist die Bindung von Calponin an F-Aktin inhibiert [Kaneko et al., 2000]. Eine Phosphorylierung *in vivo* konnte nicht in allen bisher untersuchten glatten Muskelgeweben gezeigt werden. Der Grund für diese Diskrepanzen ist bisher noch nicht geklärt, könnte jedoch in der variablen zellulären Lokalisation des Calponins liegen. Untersuchungen von Parker [Parker et al., 1994] belegen eine Translokation des Calponins während der Stimulation der Muskulatur von kontraktilen zu cytoskeletären Bereichen der glatten Muskelzelle. Außerdem transloziert Calponin zu frühen Zeitpunkten einer Agonistenstimulation zur Plasmamembran und ist dort mit der extrazellulär-regulierten Proteinkinase (ERK) und der PKC co-lokalisiert [Menice et al., 1997]. Diese beiden Kinasen binden auch *in vitro* an Calponin [Leinweber et al., 1999 und 2000]. Die genaue physiologische Bedeutung des Calponins und der Mechanismus, mit dem Calponin in den Kontraktionsvorgang eingreift, bleiben allerdings weiter ungeklärt. Es erscheint jedoch plausibel, daß Calponin bei der Agonisten-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung eine Rolle spielt.

### **4.2.2 Beteiligung von Caldesmon an der $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der glatten Muskulatur**

Ein weiterer Bestandteil der dünnen Filamente, der wichtige regulatorische Funktionen im glatten Muskel hat, ist Caldesmon. Es wurde 1981 als hochmolekulares Protein (93 kDa), das sowohl Aktin als auch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM binden kann, aus Hühnerkaumagen isoliert und aufgrund dieser Eigenschaften mit dem aus den Wörtern Calmodulin und Desmos (griech. für „binden“) kombinierten Namen Caldesmon versehen [Sobue et al., 1981]. Caldesmon kann neben Aktin und  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM außerdem auch an Myosin und an Tropomyosin binden. Die Bindung von Caldesmon an Aktin blockiert die Interaktion von

Aktin und Myosin und hemmt, wie Calponin, ebenfalls die Aktin-aktivierte Myosin-ATPase-Aktivität [Übersicht bei Chalovich und Pfitzer, 1997]. In Experimenten mit gehäuteten Muskelpräparaten konnte gezeigt werden, daß daraus eine Hemmung der Kraftentwicklung resultiert [Katsuyama et al., 1992]. Die Inkubation von Triton-gehäuteter Muskulatur des Hühnerkaumagens mit Caldesmon führt zur Relaxation des Muskels [Szpacenko et al., 1985] und inhibiert die Kraftentwicklung bei gleichbleibender Myosinphosphorylierung [Pfitzer et al., 1993]. Werden skeletale Muskelfasern, die normalerweise kein Caldesmon enthalten, mit diesem inkubiert, kommt es auch hier zu einer Inhibierung der Kraftentwicklung [Brenner et al., 1991]. Ein weiterer Hinweis auf die inhibitorische Wirkung des Caldesmons konnte mit Antisense-Oligodesoxynucleotiden gegeben werden [Earley et al., 1998]. Intakte A. carotis des Schweins wurde mittels einer speziellen Behandlung reversibel permeabilisiert und mit Antisense-Oligodesoxynucleotiden gegen die Startregion der mRNA für Caldesmon beladen. Die dadurch erzielte Reduktion des Caldesmons im Gewebe führte zu einer Erhöhung des Basaltonus.

Der Hemmeffekt des Caldesmons auf die glattmuskuläre Kontraktion kann prinzipiell durch zwei Mechanismen aufgehoben werden: über einen Calcium-abhängigen Schritt, der die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM beinhaltet oder über Phosphorylierung des Caldesmons.

Bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindung von Calmodulin an Caldesmon wird die Inhibierung der ATPase-Aktivität des Myosins aufgehoben. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM führt dabei zu einer verminderten Affinität des Caldesmons zu Aktin und damit zu einer Konformationsänderung, die wiederum die Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht. Ob die Bindungsaffinität des Caldesmons zu  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM und die intrazelluläre Konzentration an freiem Calmodulin ausreichend sind, damit dieser Regulationsmechanismus auch *in vivo* ablaufen kann, ist fraglich.

Nicht wesentlich eindeutiger geklärt ist die Rolle der Phosphorylierung des Caldesmons für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der glatten Muskulatur. Für verschiedene Proteinkinasen ist eine Phosphorylierung von Caldesmon *in vitro* beschrieben worden:  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Proteinkinase II [Ikebe und Reardon, 1990b], Proteinkinase C [Vorotnikov et al., 1994], cdc2-Kinase [Yamashiro et al., 1990 und 1991], p21-aktivierte Proteinkinase 3 [Foster et al., 2000] und Mitogen-aktivierte Proteinkinase [Childs et al., 1992]. Wie schon früh vermutet wurde [Sutherland und Walsh, 1989; Adam et al., 1989], kann die Phosphorylierung von Caldesmon durch einige dieser Kinasen dessen inhibitorische

Wirkung auf die Myosin-ATPase zumindest *in vitro* aufheben. Die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierungsereignisse ist umstritten und wird bisher lediglich für die MAPK eingehender diskutiert. Nach Agonisten-induzierter Aktivierung der ERK-Signalkaskade wird Caldesmon an den gleichen Stellen phosphoryliert wie nach *in vitro*-Experimenten [Adam und Hathaway, 1993]. Bei der Inkubation von permeabilisierten Präparaten mit konstitutiv aktiver MAPK wurden jedoch Ergebnisse gefunden, die sowohl für als auch gegen eine Bedeutung der Caldesmon-Phosphorylierung bei der Regulation der Kontraktion sprechen können [Gerthoffer et al., 1996; Nixon et al., 1995].

Abschließend muß auch für Caldesmon festgestellt werden, daß es viele Hinweise aber keinen eindeutigen Beweis für seine Beteiligung an der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der glatten Muskulatur gibt.

### 5 Phosphorylierung der r-MLC durch $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kinasen

Wie bereits beschrieben, spielt die Inhibierung der MLCP eine bedeutende Rolle bei der Agonisten-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der glatten Muskulatur (s. I; 4.1.2). Verschiedene Phosphataseinhibitoren wie Okadainsäure und Microcystin haben ihren Einsatz gefunden, um die Rolle der MLCP in permeabilisierter und intakter glatter Muskulatur zu untersuchen [z.B. Shibata et al., 1982; Gong et al., 1992b; Takai et al., 1987; Bialojan et al., 1988]. Werden die Muskelpräparate in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung mit den Phosphataseinhibitoren inkubiert, kommt es zur Induktion einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion, die mit einem Anstieg der r-MLC-Phosphorylierung einher geht. Häufig wird bei diesen Experimenten eine Doppelphosphorylierung der r-MLC an Serin 19 ( $\text{Ser}_{19}$ ) und Threonin 18 ( $\text{Thr}_{18}$ ) gefunden. Eine relevante Beteiligung der MLCK an dieser Phosphorylierung ist aus mehreren Gründen fraglich: Die MLCK ist durchaus in der Lage, auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen eine Phosphorylierung der r-MLC zu katalysieren, doch ist dabei ihre Aktivität zu gering, um mit den beobachteten Raten der Kontraktion zu korrelieren [Tokui et al., 1995]. Außerdem wird häufig ein vergleichbar hoher Anteil an  $\text{Thr}_{18}$ -Phosphorylierung gefunden. Das  $\text{Thr}_{18}$  ist für die MLCK jedoch ein im Vergleich zum  $\text{Ser}_{19}$  so schlechtes Substrat [Ikebe und Hartshorne, 1985], daß die gefundenen Verhältnisse von  $\text{Ser}_{19}$ - zu  $\text{Thr}_{18}$ -Phosphorylierung die MLCK als katalysierendes Enzym unwahrscheinlich machen.

1999 zeigte Weber [Weber et al., 1999], daß durch Hemmung der MLCK mit dem inhibitorischen Peptid AV25, welches auf der autoinhibitorischen Sequenz der MLCK basiert, die Microcystin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion in Triton-gehäuteter Gefäßmuskulatur der Ratte nicht unterbunden wird. Des weiteren wurde eine Phosphorylierung der r-MLC an Thr<sub>18</sub> ohne vorhergehende Ser<sub>19</sub>-Phosphorylierung gefunden, was ebenfalls die MLCK als verantwortliche Proteinkinase unwahrscheinlich macht.

Bei der Suche nach Proteinkinasen, die an der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Doppelphosphorylierung der r-MLC beteiligt sind, konnten im glatten Muskel bisher drei mögliche Proteine identifiziert werden: Die ROK, die schon lange im Zusammenhang mit der Agonisten-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung diskutiert wird, kann neben dem bereits geschilderten Weg über Inhibierung der MLCP (s. I; 4.1.2) auch durch direkte Phosphorylierung der r-MLC eine Kontraktion der glatten Muskulatur auslösen [Amano et al., 1996; Kureishi et al., 1997]. Später wurden zwei weitere Kinasen entdeckt, die ebenfalls zur  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Phosphorylierung der r-MLC in der Lage sind und in mit Triton X-100 permeabilisierter Muskulatur zur Induktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktionen führen können. Dabei handelt es sich um die Integrin-gekoppelte Proteinkinase (*integrin-linked kinase*, ILK) [Deng et al., 2001] und die Zipper-interagierende Proteinkinase (ZIPK) [Niuro und Ikebe, 2001].

In Endothelzellen konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-unabhängige Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II, die ausschließlich an Ser<sub>19</sub> lokalisiert ist, beobachtet werden, die durch die p21-aktivierte Proteinkinase 2 (PAK2) katalysiert wird [Chew et al., 1998]. Diese Phosphorylierung induziert ein Zusammenziehen sowohl von Saponin-permeabilisierten [Chew et al., 1998] als auch von intakten Endothelzellen [Zeng et al., 2000]. Auch rekombinante PAK3 ist in der Lage, die aus Hühnerkaumagen isolierten r-MLC *in vitro* zu phosphorylieren [Van Eyk et al., 1998].

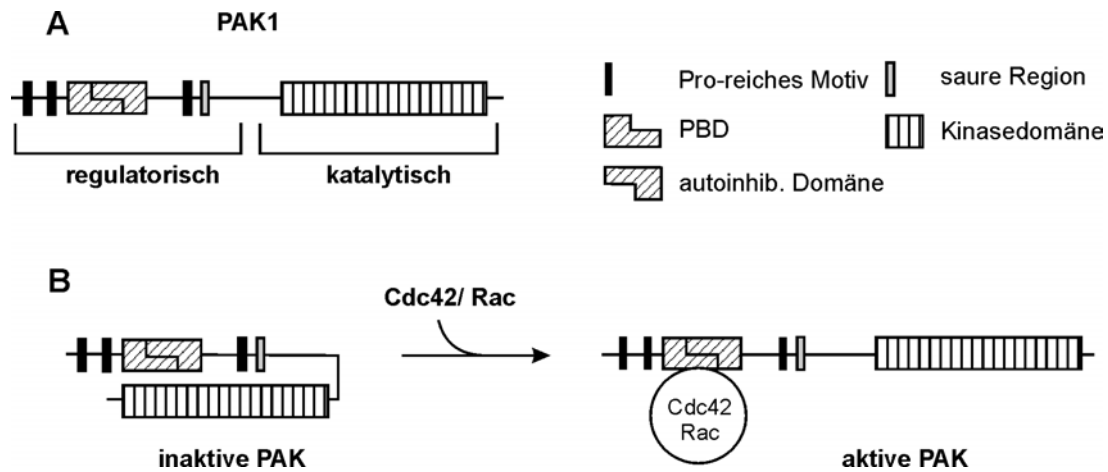
## 6 Bedeutung der p21-aktivierten Proteinkinasen (PAK) für Cytoskelett-Remodelling und glattmuskuläre Kontraktion

### 6.1 Familie der p21-aktivierten Proteinkinasen (PAK)

Die p21-aktivierten Proteinkinasen (PAK) wurden 1994 in  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-GTP-p21}$ -Overlays als Gruppe von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 62-68 kDa, welche die monomeren G-Proteine Rac und Cdc42, nicht aber das zur selben Familie gehörende RhoA, bindet, entdeckt [Manser et al., 1994]. Mittlerweile sind sechs Mitglieder dieser Serin/Threonin-Proteinkinasenfamilie bekannt, die sich aufgrund von Sequenzhomologien in zwei Gruppen einteilen lassen: die Kinasen PAK1-3 [Übersicht bei Knaus und Bokoch, 1998] bzw. PAK4-6 [Übersicht bei Jaffer und Chernoff, 2002].

PAK1, 2 und 3 (Rattenanaloga: PAK $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\beta$ ) [Manser et al., 1994; Teo et al., 1995; Martin et al., 1995; Bagrodia et al., 1995a] bestehen aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne und einem am C-Terminus gelegenen katalytischen Bereich. Im N-Terminus befinden sich die p21-bindende Domäne (PBD), drei Prolin-reiche Motive zur Bindung an src-homologe (SH3) Domänen und eine autoinhibitorische Region (Abb. I-11; A).

Die gesamte PBD umfaßt ca. 90 Aminosäuren und hat eine Homologie von 95 % unter den drei Isoformen. Das essentielle Motiv für die Bindung an die monomeren G-Proteine, auch als CRIB (*Cdc42/Rac interactive binding*) bezeichnet, besteht aus einer viel kürzeren Sequenz (ISXPX<sub>4-6</sub>FXHXXHVG) und kann auch in anderen p21-bindenden Proteinen gefunden werden [Burbelo et al., 1995]. Bei diesen Proteinen handelt es sich nicht ausschließlich um Kinasen, sondern es sind auch Proteine identifiziert worden, denen bisher keine enzymatische Aktivität und keine genaue Funktion zugeordnet werden konnte. Überlappend mit der PBD befindet sich die autoinhibitorische Domäne der PAK, die durch Punktmutationen und Bindungsstudien mit rekombinanten, inhibierenden PAK-Peptiden identifiziert wurde [Zhao et al., 1998; Frost et al., 1998]. Wie bei vielen Proteinkinasen bindet die autoinhibitorische Domäne direkt an den katalytischen Teil des Enzyms [Tu und Wigler, 1999] und bewirkt so eine geschlossene Konformation des Proteins, die den Zugang des Substrats zum katalytischen Zentrum der Kinase verhindert. Die Interaktion von PAK mit Cdc42 oder Rac hebt diese intramolekulare Bindung auf und stimuliert so die Kinaseaktivität des Enzyms (Abb. I-11; B).



**Abb. I-11:** Schematische Darstellung der p21-aktivierten Proteinkinase.

**A** Domänenstruktur der PAK1.

PBD: p21-bindende Domäne; autoinhib. Domäne: autoinhibitorische Domäne; Pro-reiches Motiv: Prolin-reiches Motiv

**B** Aktivierung der PAK1 durch Bindung von Cdc42/Rac, welche die intramolekulare Interaktion der autoinhibitorischen und der katalytischen Domäne aufhebt.

Nach [Bagrodia und Cerione, 1999].

Die drei Prolin-reichen Regionen im N-Terminus der PAK können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die beiden vor der PBD gelegenen Motive entsprechen der klassischen SH3-bindenden Form (PXXP), während die dritte, weiter C-terminal gelegene Sequenz davon abweicht (PPXXXPRP). An das erste der konventionellen Prolinmotive bindet das Adaptorprotein Nck [Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996], für das unkonventionelle Motiv wurden unabhängig voneinander bis dahin unbekannte Bindungspartner gefunden, die als PIX (*PAK-interacting exchange factors*) [Manser et al., 1998] bzw. Cool (*Cloned-out of library*) [Bagrodia et al., 1998] bezeichnet werden. Diese Proteine kommen in verschiedenen Splice-Varianten vor und besitzen neben der SH3-Domäne weitere typische Proteinbindungsbereiche wie Dbl-homologe (DH) und Pleckstrin-homologe (PH) Domänen. Wie schon aus dem Namen hervorgeht, handelt es sich bei den PIX um sogenannte *guanine-nucleotid exchange factors*, die durch Austausch von GDP zu GTP an der Aktivierung monomerer GTPasen beteiligt sind. Die kooperative Bindung von PIX und GTP-Cdc42/GTP-Rac kann somit zur Aktivierung und Regulation der PAK beitragen.

Ein weiterer Bindungspartner der PAK ist Paxillin [Hashimoto et al., 2001], welches mit Nck und PIX um die Interaktion konkurriert. Über Paxillin scheint eine Kopplung der PAK an die membranständigen Integrine möglich zu sein.

Ein Bindungspartner für das zweite Prolin-reiche Motiv konnte bisher nicht identifiziert werden. Ebenso ist auch die im N-Terminus gelegene, hoch azide Region bisher nicht funktionell charakterisiert.

Die C-terminale katalytische Domäne der PAK1-3 ist eine typische Serin/Threonin-Kinasedomäne, die große Homologie zu den STE20-Kinasen der Hefen aufweist [Manser et al., 1994]. Zwischen den drei Isoformen beträgt die Identität in der Kinasedomäne über 90 %, über den kompletten Sequenzbereich ca. 73 %. Die Kinasen scheinen bevorzugt Substrate zu phosphorylieren, die in den Positionen –2 und –3 basische Aminosäurereste besitzen: (K/R)RX(S/T) [Tuazon et al., 1997].

Die Kinasen PAK4-6 [Abo et al., 1998; Dan et al., 2002; Yang et al., 2001; Lee et al., 2002] unterscheiden sich in einigen Sequenzbereichen von den oben beschriebenen PAK1-3. Im N-terminalen Bereich befindet sich auch bei diesen Kinasen eine PBD, die im Bereich der CRIB gut mit den PAK1-3 übereinstimmt [Abo et al., 1998]. Interessanterweise wird die Kinaseaktivität von PAK4 durch die Bindung von GTP-Cdc42 nicht stimuliert [Abo et al., 1998]. Die weiteren strukturellen Elemente des N-Terminus, so z.B. auch die autoinhibitorische Domäne, scheinen zu fehlen, was auf eine deutlich andere Regulation dieser Gruppe der PAK schließen läßt. Die Kinasedomäne ist zwischen den beiden PAK-Gruppen zu ca. 50 % identisch, die Homologie innerhalb der Kinasen 4-6 beträgt ca. 80 % [Yang et al., 2001].

Bei ihrer Entdeckung war die Homologie der PAK mit den STE20-Kinasen aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sehr offensichtlich. Mittlerweile sind auch in anderen Spezies homologe Kinasen entdeckt worden. Diese Gruppe umfaßt unter anderem das Drosophila-Homolog DPAK [Harden et al., 1996], das Xenopus X-PAK [Faure et al., 1997], sowie homologe Kinasen in *Caenorhabditis elegans* (CePAK) [Chen et al., 1996] und *Dictyostelium (myosin I heavy chain kinase, MIHCK)* [Lee et al., 1996].

Im folgenden soll ausschließlich auf die Regulation und die Funktion der ersten PAK-Untergruppe, Isoformen 1-3, näher eingegangen werden, da diese deutlich besser



charakterisiert sind und für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von unmittelbarer Relevanz sind.

### 6.2 Gewebespezifische Expression der PAK

Die ersten drei entdeckten PAK-Isoformen weisen unterschiedliche, gewebespezifische Expressionsmuster auf. PAK1 wird überwiegend im Hirn, in Muskeln und in der Milz gefunden, PAK3 wird vor allem im Hirn exprimiert, während PAK2 ubiquitär vorzukommen scheint [Übersicht bei Knaus und Bokoch, 1998]. In glatten Muskelzellen der Trachea konnten alle drei Isoformen gefunden werden [Dechert et al., 2001], in glatten Gefäßmuskelzellen scheint PAK1 die dominante Isoform zu sein [Schmitz et al., 1998], während PAK3 schwach exprimiert wird und PAK2 nicht nachgewiesen werden konnte.

### 6.3 Regulation der PAK-Aktivität

Das Schlüsselereignis für die klassische Aktivierung der PAK ist die Bindung der monomeren p21-GTPasen in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form. *In vitro* führt diese Interaktion zur Stimulierung der Kinaseaktivität um einen Faktor 20-100 [Manser et al., 1994; Martin et al., 1995]. Durch die Bindung der G-Proteine wird die intramolekulare Interaktion zwischen der autoinhibitorischen und der katalytischen Domäne aufgehoben und die zur vollständigen Aktivierung der PAK essentielle Autophosphorylierung möglich. Im gesamten PAK-Protein wurden sieben Autophosphorylierungsstellen gefunden: sechs Serinreste im N-terminalen, regulatorischen Bereich des Proteins und ein Threoninrest in der Kinasedomäne [Manser et al., 1997]. Der Threoninrest befindet sich im sogenannten „regulatorischen Loop“ der Kinase und die Punktmutation dieser Stelle in eine saure Aminosäure führt zur konstitutiven Aktivierung des Enzyms [Manser et al., 1997]. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß auch die Phosphorylierungsstellen im N-Terminus entscheidend an der Regulation der PAK beteiligt sind. So ist die Phosphorylierung eines nahe der autoinhibitorischen Domäne gelegenen Serinrestes direkt an der Aktivierung der Kinase beteiligt [Chong et al., 2001]. Die Autophosphorylierung weiterer Serine, die in der Nähe der Prolin-reichen Motive im N-Terminus lokalisiert sind, hebt die Interaktion dieser Regionen mit den SH3-Domänen der Proteine Nck und PIX auf [Zhao et al., 2000].

Neben der Aktivierung über Interaktion mit den monomeren G-Proteinen sind weitere Mechanismen zur Stimulierung der p21-aktivierten Kinaseaktivität beschrieben worden. Schon bei der Entdeckung, daß PAK mit Nck interagiert, wurde festgestellt, daß es dadurch zu einer Translokation der Kinase zur Membran und in die Nähe von Rezeptor-Tyrosinkinasen (EGFR: *epidermal growth factor receptor*, PDGFR: *platelet derived growth factor receptor*) kommt [Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996]. Diese Membrantranslokation führt zu einer Aktivierung der PAK, wie bei Studien mit membrangerichteten Fusionsproteinen gefunden wurde [Lu et al., 1997; Bokoch et al., 1998; Daniels et al., 1998]. Interessanterweise scheint für die Induktion eines Effekts auf das Cytoskelett teilweise die Membranlokalisation allein ausreichend zu sein und keine Kinaseaktivität der PAK zu erfordern. Entscheidend für den induzierten Effekt scheinen in diesem Fall strukturelle Elemente im N- und C-Terminus der PAK zu sein, die durch das kooperative Binden verschiedener Signalproteine als „Gerüst“ für den Aufbau einer Signalkette dienen [Daniels et al., 1998; Frost et al., 1998].

Im Labor von Bokoch [Bokoch et al., 1998] konnte ein Mechanismus identifiziert werden, über den die Aktivierung der membrangebundenen PAK ablaufen könnte. Die Tatsache, daß PAK-Mutanten, die zur Bindung der p21-GTPasen nicht mehr in der Lage sind, dennoch durch Membrantranslokation aktiviert werden können, legte die Vermutung nahe, daß Membranlipide an dieser Aktivierung beteiligt sein könnten. In der Tat wurde eine starke Stimulation der Kinaseaktivität durch Sphingosin und verwandte Lipide beobachtet [Bokoch et al., 1998]. Diese Stimulierung benötigt eine intakte Kinasedomäne und die Bindung der Lipide interferiert mit der p21-GTPasen-Interaktion. Die PBD und die Bindungsstelle der Lipide liegen dementsprechend sehr nah beieinander oder sind überlappend. Die postulierte Interaktion der positiv geladenen Lipide mit der sauren Region im N-Terminus der PAK, konnte durch Mutationsstudien allerdings nicht bestätigt werden [Bokoch et al., 1998]. Die Bindung der Lipide scheint ebenso wie die Bindung von Cdc42/Rac die inhibitorisch wirkende intramolekulare Interaktion der PAK aufzuheben und so zur Aktivierung zu führen. Nach der Lipidbindung kommt es ebenfalls zur Autophosphorylierung des Threoninrestes in der katalytischen Domäne; die oben geschilderte Serinphosphorylierung in der autoinhibitorischen Region hat keinen Einfluß auf die Aktivierung der PAK durch Lipide [Chong et al., 2001].

Für PAK2 ist ein weiterer Aktivierungsmechanismus beschrieben worden. Durch Caspase-induzierte Proteolyse kommt es zur Spaltung des Enzyms in einen N- und einen C-terminalen Teil, wobei der C-terminale Abschnitt die komplette Kinasedomäne umfaßt,

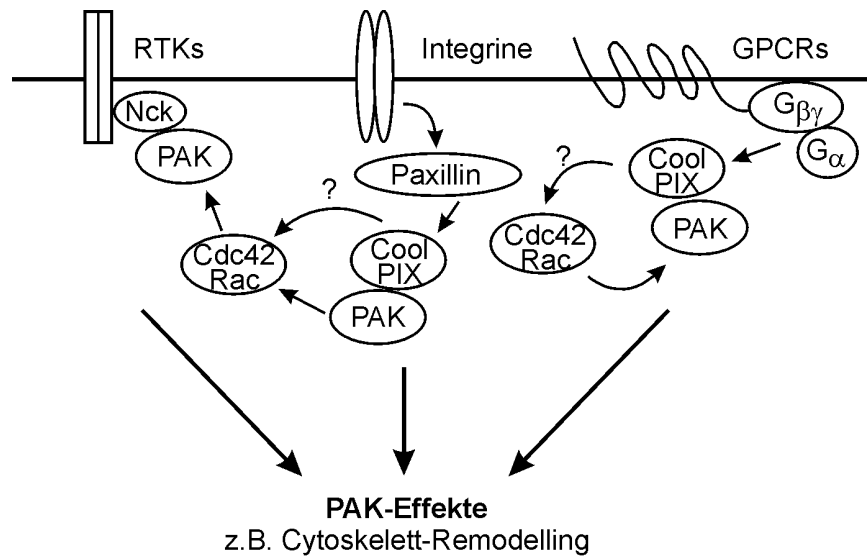
die nach Entfernung des regulatorischen Bereichs konstitutiv aktiv ist [Rudel und Bokoch, 1997]. Der Spaltung geht wahrscheinlich die Phosphorylierung des N-Terminus im Bereich der autoinhibitorischen Domäne voran, so daß es zu einer offenen Konformation des Proteins kommt, die der Caspase die Spaltung ermöglicht [Walter et al., 1998]. Auch hier muß das bereits erwähnte Threonin in der Kinasedomäne phosphoryliert werden, um eine maximale Stimulierung der Kinaseaktivität zu erreichen [Walter et al., 1998].

### **6.4 Beteiligung der PAK an der intrazellulären Signaltransduktion**

Die Datenlage in Bezug auf die Beteiligung der PAK an der intrazellulären Signaltransduktion ist vielfältig und nicht immer eindeutig. Dies liegt an der Vielzahl von verwendeten PAK-Isoformen und -Mutanten, sowie an den diversen zellulären Systemen, mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden. Für glattmuskuläre Zellen oder den glatten Muskel als Gewebe liegen kaum Ergebnisse vor. Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Signalwege, an denen die PAK beteiligt sind, zunächst im Allgemeinen dargestellt werden, um dann die Daten in Bezug auf den glatten Muskel noch einmal gesondert zu betrachten.

Aufgrund ihrer Bindungspartner sind die PAK in der Zelle an mehrere membranständige Rezeptorsysteme gekoppelt: über Nck und PIX an Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, mittels Paxillin an Integrine (Abb. I-12).

Für eine Vielzahl von extrazellulären Signalen ist bekannt, daß sie unter Beteiligung der PAK weitergeleitet werden. So konnte eine Aktivierung unterschiedlicher PAK in verschiedenen experimentellen Systemen durch EGF [Galisteo et al., 1996], Interleukin-1 [Zhang et al., 1995], Thrombin [Teo et al., 1995] sowie in glatten Muskelzellen durch Angiotensin-II [Schmitz et al., 1998], PDGF [Dechert et al., 2001] und Lysophosphatidsäure [Schmitz et al., 2002] gezeigt werden. Bisher wurde eine direkte Beteiligung der PAK an Apoptose und Zellzyklus, der Beeinflussung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden sowie bei Modifizierungen des Cytoskeletts nachgewiesen.



**Abb. I-12:** Schematische Darstellung der Kopplung der PAK an verschiedene transmembranale Rezeptorsysteme.

RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor;  $G\beta\gamma/G\alpha$ : heterotrimeres G-Protein

Nach [Bagrodia und Cerione, 1999].

Ein direkter Zusammenhang zwischen den PAK und apoptotischen Vorgängen wurde von Rudel und Bokoch hergestellt [Rudel und Bokoch, 1997]. Sie fanden heraus, daß in Jurkat T-Zellen die Caspase-induzierte Spaltung und die damit einher gehende Aktivierung der PAK2 direkt an den Verlauf der Apoptose geknüpft ist und daß diese Signalkaskade durch typische Apoptose-induzierende Substanzen (z.B. Tumornekrosisfaktor  $\alpha$ ) eingeleitet werden kann. Die Überexpression des konstitutiv aktiven C-Terminus von PAK2 induziert morphologische und biochemische Änderungen wie sie bei der Apoptose üblich sind [Lee et al., 1997b], während dominant-negative PAK2 die Fragmentierung der Zellen in sogenannte „*apoptotic bodies*“ verhindert [Rudel und Bokoch, 1997].

Die unterschiedlichen MAPK-Signalkaskaden sind an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt, und die Involvierung der monomeren GTPasen Cdc42 und Rac ist schon länger bekannt. Man unterscheidet drei Klassen von MAP-Kinasen: die c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK), die p38 MAPK (p38) und die extrazellulär regulierten Proteinkinasen (ERK).

Für die JNK- und p38-Signalwege konnte in mehreren Fällen eine Involvierung verschiedener PAK nachgewiesen werden [Bagrodia et al., 1995b; Zhang et al., 1995; Brown et al., 1996], wobei dominant-negative Mutanten der PAK eine große Rolle für die Untersuchung dieser Signalkaskaden gespielt haben. So konnten z.B. Zhang et al. zeigen, daß dominant-negative PAK1 die Interleukin-1 induzierte Aktivierung der p38 in HeLa-Zellen aufhebt [Zhang et al., 1995].

Bezüglich der Aktivierung der ERK sind weniger eindeutige Daten publiziert. Während die einen Arbeitsgruppen eine Beteiligung der PAK an der ERK-Signalkaskade nicht nachweisen konnten [Bagrodia et al., 1995b; Brown et al., 1996], ist in anderen Untersuchungen durchaus eine Verbindung zwischen diesen beiden Kinasegruppen gezeigt worden [Tang et al., 1997; Yablonski et al., 1998; Vadlamudi et al., 2000].

Nicht weniger verwirrend ist die Datenlage in Bezug auf die Beteiligung der PAK an Modifizierungen des Cytoskeletts. Die Co-Lokalisation der PAK mit den Bereichen des Cytoskeletts, die eine Umstrukturierung erfahren, wird häufig beschrieben [Manser et al., 1997; Sells et al., 1997]. So wird PAK1 in endothelialen HeLa-Zellen nach Co-Transfektion mit konstitutiv aktiven p21-Mutanten vom Cytoplasma zu den „*focal complexes*„ (FC) transloziert [Manser et al., 1997]. Auch die PAK-Analoga anderer Spezies, z.B. DPAK [Harden et al., 1996] und CePAK [Chen et al., 1996], zeigen diese Art der Translokation zu Bereichen des aktiven Cytoskeletumbaus nach Aktivierung.

Um zu belegen, daß die PAK tatsächlich an den morphologischen Veränderungen beteiligt sind, wurden Mikroinjektionsstudien, Transfektionsexperimente und Versuche mit unterschiedlichen Effektormutanten der Kinasen und der G-Proteine durchgeführt. Die daraus resultierende Datenlage ist uneindeutig. In HeLa-Zellen bewirkt konstitutiv aktive PAK1 einen starken Rückgang der Stressfasern und löst damit ein Zusammenziehen der Zellen aus [Manser et al., 1997], während in Swiss 3T3-Fibroblasten die Ausbildung polarisierter Filopodien und Membranaufwerfungen induziert wird [Sells et al., 1997]. Der Phänotyp dieser Fibroblasten ähnelt dem von motilen Zellen und tatsächlich konnte von der gleichen Arbeitsgruppe später gezeigt werden, daß konstitutiv aktive PAK1 die Motilität von NIH-3T3-Zellen steigert [Sells et al., 1999]. Dieser Effekt wird von einer erhöhten Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II begleitet. Erstaunlicherweise induziert auch eine Kinase-defiziente Mutante diese verstärkte Motilität, die dann jedoch ungerichtet ist und nicht mit einer erhöhten r-MLC-Phosphorylierung einher geht [Sells et al., 1999]. Auch in Wundheilungssassays mit

Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung von PAK1 mit dem Erscheinen motiler Zellen korreliert [Sells et al., 2000].

In anderen Zellsystemen konnte ebenfalls ein Effekt der PAK auf das Cytoskelett nachgewiesen werden. In BHK-21-Zellen (*baby hamster kidney cells*), die mit konstitutiv aktiver PAK1 transfiziert wurden, konnte eine verminderte Ausbreitung der Zellen auf Fibronectin beobachtet werden. Dieser Effekt wird von einer verminderten r-MLC-Phosphorylierung in den transfizierten Zellen, welche auf eine inhibitorische Phosphorylierung der MLCK durch PAK1 zurückgeführt werden konnte, begleitet [Sanders et al., 1999]. In PC12-Zellen kann das durch den Nervenwachstumsfaktor NGF (*nerve growth factor*) induzierte Neuritenwachstum durch dominant-negatives Cdc42 und Rac unterbunden werden. Mittels einer CAAX-Box an die Membran translozierte PAK1 dagegen bewirkt das Auswachsen von Nervenendigungen, so daß eine Signalkaskade ausgehend von NGF über Cdc42/Rac zu PAK1 vermutet wird [Daniels et al., 1998].

Ein mögliches Bindeglied zwischen PAK und dem Aktincytoskelett stellt die LIM-Kinase (LIMK) dar. Diese phosphoryliert das Aktin-bindende Protein Cofilin, welches in der Lage ist, F-Aktin zu depolymerisieren, und somit zur Dynamik des Aktincytoskeletts beiträgt. Die Phosphorylierung des Cofilin hemmt diese Aktivität. Eine Stimulierung der LIMK durch PAK-gesteuerte Phosphorylierung konnte bei *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen werden, aktiviertes Cdc42/Rac fördert die Assoziation von PAK und der LIMK *in vivo* [Edwards et al., 1999]. So könnten Cdc42 und Rac in ihrer aktiven Form eine Depolymerisierung des Aktincytoskeletts über PAK und LIMK verhindern.

Darüber hinaus werden auch Proteine der Intermediärfilamente, die im glatten Muskel für die Verankerung der Aktinfilamente in den „*dense plaques*“ und „*dense bodies*“ verantwortlich sind (s. I; 1.2), durch die PAK beeinflusst. Sowohl Desmin als auch Vimentin büßen nach Phosphorylierung durch PAK ihre Fähigkeit zur Filamentbildung deutlich ein [Ohtakara et al., 2000; Goto et al., 2002].

Umstrukturierungen des Cytoskeletts, insbesondere die Migration von Zellen, sind direkt von den Zellkontakten zur extrazellulären Matrix (ECM) abhängig. Eine wechselseitige Beeinflussung der Zell-ECM-Interaktion und der PAK-Aktivität ist in einigen Studien untersucht worden [del Pozo et al., 2000; Howe und Juliano, 2000]. Befinden sich NIH-3T3-Zellen in Suspension, ist der Großteil des Rac-Proteins cytosolisch, kann durch

Serumgabe nicht stimuliert werden und aktiviert PAK nicht. In adhärenenten Zellen jedoch kommt es durch Serum zu einer Translokation der GTPase zur Membran und dann auch zu einer Aktivierung von PAK [del Pozo et al., 2000]. Erst durch den Zell-ECM-Kontakt wird hier eine erfolgreiche Kopplung und Aktivierung von G-Protein und Effektor kinase möglich. Ebenso scheint die Interaktion von PAK mit dem Adaptor molekül Nck von der Zelladhäsion abhängig zu sein [Howe, 2001]. Damit käme der Zelladhäsion sowohl eine Rolle bei der Regulation der Aktivität als auch der zellulären Lokalisation der PAK zu.

Bisher liegen nur vereinzelt experimentelle Daten vor, die die Bedeutung der PAK in glatten Muskelzellen und in glattem Muskelgewebe untersuchen. In kultivierten Gefäßmuskelzellen wird PAK1 durch Angiotensin-II (Ang-II) stimuliert [Schmitz et al., 1998]. Ang-II ist ein Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Systems, der über Regulation der Proteinsynthese das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen [Berk et al., 1989] und Cardiomyocyten [Sadoshima et al., 1993] fördert, und somit an der Induktion vaskulärer und cardialer Hypertrophie beteiligt ist. Die Stimulierung der PAK1-Aktivität durch Ang-II führt im Folgenden zu einer Aktivierung der JNK [Schmitz et al., 1998]. Die zugrunde liegende Signalkaskade scheint komplex zu sein, und sowohl eine Tyrosinkinase als auch eine PKC-Isoform zu enthalten. Außerdem wird das Adaptorprotein Nck für die Translokation von PAK zur Membran nach Stimulation mit Ang-II benötigt [Schmitz et al., 2001]. Auch Lysophosphatidsäure, die ebenfalls ein potentes Mitogen glatter Gefäßmuskelzellen darstellt, induziert in kultivierten vaskulären Muskelzellen eine Stimulierung von PAK [Schmitz et al., 2002]. Inhibitoren des G-Proteins  $G_{\alpha_i}$  und der Tyrosinkinase Src verhindern diese Aktivierung, während die beiden Wachstumsfaktor-Rezeptoren EGFR und PDGFR offenbar nicht beteiligt sind.

In kultivierten glatten Muskelzellen der Trachea wurde eine Beteiligung von PAK1 an der Weiterleitung des PDGF-Signals gezeigt [Dechert et al., 2001]. Stimulierung der Zellen mit PDGF führt zu einer zeitabhängigen Aktivierung von PAK1. Die Expression einer Kinase-defekten PAK1-Mutante bewirkt eine signifikant verminderte Phosphorylierung der p38 auf den PDGF-Stimulus.

Für Untersuchungen an glattmuskulärem Gewebe liegt bisher erst eine Arbeit vor. Van Eyk et al. [Van Eyk et al., 1998] haben den Effekt von konstitutiv aktiver PAK3 auf die Kontraktion glatter Muskulatur untersucht. Bei der Inkubation von Triton-gehäuteten Taenia caeci-Fasern des Meerschweinchens mit dem rekombinanten Fusionsprotein

GST-PAK3 wurde die Entwicklung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion beobachtet, die mehr als 50 % der Maximalkraft erreicht und durch einen MLCK-Inhibitor nicht aufgehoben werden kann. Obwohl gezeigt werden konnte, daß die rekombinante PAK3 die r-MLC *in vitro* phosphoryliert, war die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion nicht von einer erhöhten r-MLC-Phosphorylierung begleitet. Statt dessen wurden in den PAK3-inkubierten Fasern zwei andere Proteine, Caldesmon und Desmin, phosphoryliert. *In vitro*-Untersuchungen zeigen, daß durch PAK3 phosphoryliertes Caldesmon eine geringere Hemmung der Myosin-ATPase bewirkt und daß die Phosphorylierung des Caldesmons durch die Bindung von Calmodulin gestört wird [Foster et al., 2000].

## 7 Adenovirale Infektion glatter Muskulatur

Die Analyse der intrazellulären Signalkaskaden, die an der Regulation der Kontraktion differenzierter glatter Muskulatur beteiligt sind, findet häufig an permeabilisierten Geweben statt, da die Beladung intakter glattmuskulärer Gewebe mit herkömmlichen Transfektionsmethoden, wie z.B. Liposomen-gesteuerter Transfektion, mit diversen Schwierigkeiten behaftet ist. Permeabilisierte Gewebe stellen jedoch ein experimentelles System dar, das die Situation *in vivo* nur bedingt widerspiegelt. Die Infektion von Zellen und Geweben mit rekombinanten Adenoviren ist eine für andere Fragestellungen häufig verwendete Methode zur Untersuchung von intrazellulären Signalkaskaden. Mittels dieser Methode ist die gezielte Überexpression von Signalproteinen in der Zelle möglich, so daß dann am intakten Präparat Untersuchungen durchgeführt werden können.

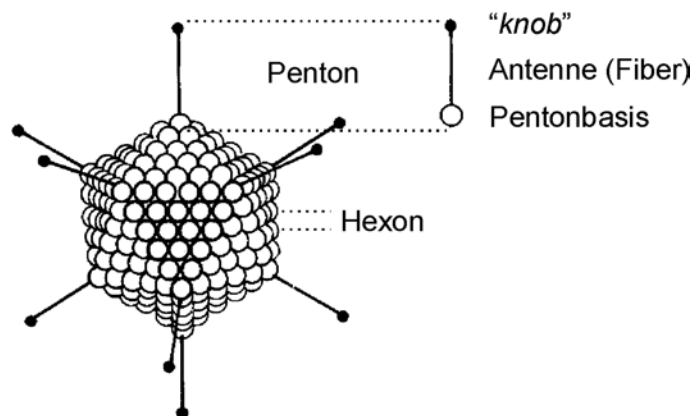
### 7.1 Adenoviren und ihre Manipulation

Die Adenoviren wurden 1953 [Rowe et al., 1953] erstmals als virale Agentien beschrieben und kultiviert. Im Menschen wurden mittlerweile 47 unterschiedliche Adenoviren gefunden, die anhand von mehreren Kriterien in sechs Untergruppen (A-F) eingeteilt werden [Übersicht bei Horwitz, 1985; Bergelson, 1999]. Gruppe C und in ihr vor allem die Adenoviren 2 und 5 sind am intensivsten untersucht worden und finden als rekombinante Viren Verwendung in experimentellen Infektionsstudien.



Die Adenoviren (Abb. I-13) bestehen aus einem ca. 65-80 nm großen Proteincapsid, das eine regelmäßige ikosahedrale Form aufweist. Es setzt sich aus einzelnen Untereinheiten, den Capsomeren, zusammen, von denen der Großteil als Hexone bezeichnet wird, da sie von je sechs gleichen Strukturen umgeben sind. Lediglich zwölf Pentone, die also nur von fünf Capsomeren umgeben sind, existieren an den Eckpunkten des Capsids. Diese Pentone sind die Träger der Pentonbasis, von der je ein filamentöser Fortsatz, die sogenannte „Fiber“, ausgeht. Diese Fortsätze variieren je nach Serotyp in ihrer Länge und laufen an ihrem distalen Ende in eine globuläre Domäne, den „knob“, aus. Dieser hat die Form eines dreischneidigen Propellers mit einer tiefen Einfurchung in der Mitte der Symmetrieachse. Die in diesem Spalt lokalisierten Aminosäuren sind für die Bindungseigenschaften des Virus verantwortlich und unterscheiden sich bei den einzelnen Serotypen leicht.

Adenoviren bestehen aus ca. 13 % DNA und 87 % Protein und haben keine Membranen oder Lipidanteile. Das Genom der Adenoviren ist ein lineares, doppelsträngiges Molekül mit einer Größe von ca. 36 kb, das im Capsid durch Interaktion mit Proteinen in sich und am Capsid verankert wird.



**Abb. I-13:** Schematische Darstellung der Struktur eines Adenovirus.  
Nach [Horzinek, 1985].

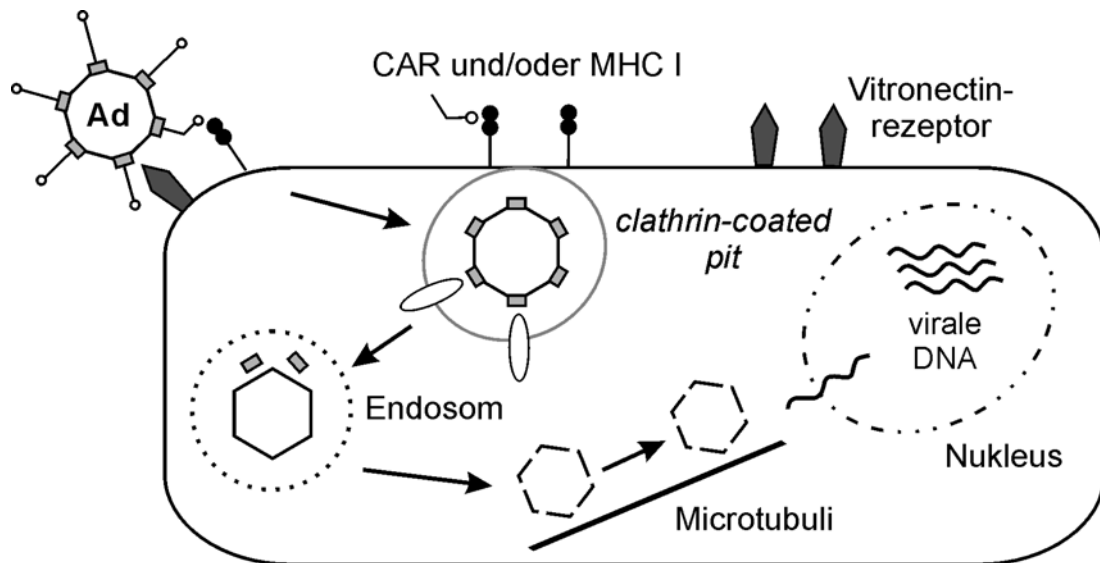
Bei der Herstellung rekombinanter Viren werden Teile des Virengenoms deletiert und durch Fremdgene ersetzt. Für die Replikation des Virus essentielle Gene werden dabei entfernt, so daß Replikations-defiziente Viren entstehen, die für ihre Propagation auf Helferzellen angewiesen sind und die daher auch nach der Infektion von Zellen oder Gewebe nicht in der Lage sind, diese wieder zu verlassen und dabei zu zerstören. Bei den rekombinanten Adenoviren der ersten Generation ist es möglich, ca. 5-7 kb Fremd-DNA in das Virengenom einzubringen.

## 7.2 Infektionszyklus der Adenoviren und die daran beteiligten Rezeptoren

### 7.2.1 Ablauf des Infektionszyklus

Der erste Schritt der Infektion einer Zelle durch Adenoviren ist die Bindung des Virus an die Zelle (Abb. I-14). Bei diesem Vorgang bindet der „*knob*“ der Virusfiber an einen spezifischen Rezeptor, CAR (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor), kann aber auch Mitglieder der MHC-I-Familie (*major histocompatibility complex*) binden. Die Interaktion mit diesen membranständigen Proteinen dient zunächst lediglich der Anheftung des Virus an die Zelle. Für die Internalisierung des Virus ist eine zweite Gruppe von Membranproteinen, die Integrine, essentiell. Vor allem die Vitronectinrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  scheinen in diesem Vorgang wichtig zu sein. Die Integrine binden an ein hoch konserviertes RGD-Motiv (Arginin-Glycin-Aspartat) an der Pentonbasis des Virus und leiten die Internalisierung der Viruspartikel in *clathrin-coated pits* ein, wobei die Fiberstruktur außerhalb der Zelle verbleibt. Die Interaktion der Pentonbasis mit den Integrinen ist von relativ geringer Affinität und ist daher primär nicht für die Bindung des Virus an die Zelle wichtig. Die Bedeutung dieser Interaktion des Virus mit den Integrinen liegt vielmehr in der Stimulierung intrazellulärer Signalkaskaden, die unter anderem die *focal adhesion* Kinase (FAK) und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) einschließen [Li et al., 1998b]. Über diese und andere Signalproteine könnte eine Verbindung zum Aktincytoskelett der Zelle hergestellt werden, dessen Beteiligung am Infektionsvorgang diskutiert wird.

Im frühen endosomalen Kompartiment kommt es im weiteren Verlauf der Infektion aufgrund der leicht sauren Bedingungen schrittweise zum Abbau des Viruscapsids und am Ende zur Durchbrechung der Endosomenmembran und zur Freisetzung der Viruspartikel ins Cytosol. Diese werden dann, wahrscheinlich unter Beteiligung der Microtubuli, zum Zellkern transportiert und die Virus-DNA mit Hilfe der Kernporenproteine Importin- $\alpha$  und - $\beta$  durch den Kernporenkomplex ins Innere des Nukleus befördert. Die starken Promotoren des Virus ermöglichen es ihm, die zelluläre Transkriptionsmaschinerie zu kontrollieren und die Synthese zelleigener Proteine zu reduzieren. Bei erfolgreicher Infektion der Zelle und Replikation des Virengensoms kann die zelluläre DNA- und Proteinsynthese um bis zu 90 % verringert werden.



**Abb. I-14:** Schematische Darstellung des Infektionszyklus der Adenoviren.  
 Ad: Adenovirus; CAR: Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor; MHC-I: *major histocompatibility complex I*-Molekül  
 Nach [Nemerow, 2000].

## 7.2.2 Rezeptoren der Virusinfektion und ihre Expressionsmuster

### CAR

Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor war der erste Rezeptor, für den eine direkte Bindung des Virus gezeigt werden konnte [Bergelson et al., 1997]. Der CAR ist ein 46 kDa schweres membranständiges Glykoprotein, das extrazellulär zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzt, die für die Bindung des Virus benötigt werden [Freimuth et al., 1999]. CAR bindet sowohl an gereinigte „*knob*“-Domänen als auch an ganze Viruspartikel verschiedener Adenovirengruppen [Roelvink et al., 1998]. Die eigentliche zelluläre Funktion des CAR ist noch nicht identifiziert, obwohl neuere Untersuchungen zeigen konnten, daß CAR an den Stellen sehr enger Zellkontakte, den *tight junctions*, lokalisiert ist und am Transport zwischen den Zellen regulierend mitwirkt [Cohen et al., 2001].

Die Proteinexpression des CAR ist bisher noch nicht eingehend untersucht, doch liegen Daten zur mRNA vor [Übersicht bei Bergelson, 1999]. Demnach findet man die CAR mRNA vor allem in Herz, Hirn, Pankreas und Darmtrakt, weniger in Lunge und Leber. Kaum nachweisbar ist sie dagegen in Leukozyten, Skelettmuskel und Milz. Die Daten variieren je nach untersuchter Spezies.

### **MHC-I**

Mit Hilfe der „knob“-Domäne des Adenovirus 5 und einer Phagen-Peptidbank wurde die schwere Kette der MHC-I-Moleküle als Bindungspartner der Viren entdeckt [Hong et al., 1997]. MHC-Moleküle setzen sich aus einer 44 kDa schweren Kette, einer kleineren Untereinheit von 12 kDa und dem  $\beta$ 2-Microglobulin zusammen. Die Diversität unter den MHC-I-Molekülen ist sehr hoch und es ist nicht geklärt, welche dieser Proteine *in vivo* zur Bindung der Adenoviren beitragen, und ob die MHC-I-Moleküle überhaupt für die adenovirale Infektion essentiell notwendig sind.

MHC-I-Moleküle sind generell auf allen Zellen mit Zellkern exprimiert. Welche Zelltypen die „richtige“ Subpopulation an MHC-I für die adenovirale Infektion tragen, ist nicht bekannt.

### **Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Vitronectinrezeptoren)**

Die Integrine bilden die größte und weit verbreitete Familie der Zelladhäsionsrezeptoren. Integrine sind nicht-kovalent verbundene Heterodimere aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die je nach Komposition an bestimmte Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und/oder Oberflächenrezeptoren anderer Zellen binden können [Übersicht bei van der Flier und Sonnenberg, 2001]. Vor allem das Dimer  $\alpha_v\beta_3$  spielt eine bedeutende Rolle in der Gefäßmuskulatur, da es an eine Vielzahl von ECM-Bestandteilen binden kann [Übersicht bei Byzova et al., 1998]. Sein Vorkommen ist daher im vaskulären Muskelgewebe relativ häufig. Auch der Vitronectinrezeptor  $\alpha_v\beta_5$  wird von glatten Muskelzellen exprimiert. Beide Rezeptoren können durch vielfältige Stimuli in ihrer Expression verändert werden. So konnte für Gefäßmuskulatur gezeigt werden, daß es nach Verletzung des Gewebes zu einer deutlich verstärkten Synthese dieser Integrine kommt, die offensichtlich mit der Neointimabildung und der dafür nötigen Migration der glatten Muskelzellen zusammenhängt [Corjay et al., 1999; Kappert et al., 2001]. Außerdem konnte für viele Integrine an unterschiedlichen Zell- und Gewebesystemen gezeigt werden, daß diverse Wachstumsfaktoren ihre Expression regulieren können. In glatten Muskelzellen konnte eine gesteigerte Expression des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  bzw. eine verstärkte Interaktion dieses Rezeptors mit seinen Liganden unter anderem nach Behandlung der Zellen mit dem transformierenden Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  [Janat et al., 1992; Brown et al., 1994], Thrombin [Brown et al., 1994] und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und -II [Jones et al., 1996] beobachtet werden.

### 7.3 Adenovirale Infektion glatter Muskelzellen im Gewebe

In Bezug auf die Effizienz der adenoviralen Infektion glatter Muskelzellen im Gewebe sind sehr widersprüchliche Daten publiziert, wobei die Gründe dafür vor allem in den unterschiedlichen verwendeten Geweben, viralen Konstrukten und den experimentellen Ansätzen liegen dürften. Im Jahr 1993 wurde eine Studie veröffentlicht [Guzman et al., 1993], die zeigt, daß in der unverletzten A. carotis der Ratte lediglich das Endothel infiziert wird. Wird das Gewebe allerdings geschädigt und die Infektion deutlich nach dieser Verletzung (7-12 Tage p.i.; *post infection*) durchgeführt, kann man eine positive Reaktion der neointimalen glatten Muskelzellen beobachten, wogegen glatte Muskelzellen der Media weiterhin kaum infiziert sind. Ebenfalls 1993 präsentierten Lee et al. dagegen Daten von Ballon-denudierter A. carotis der Ratte, die eine 30 %ige Infektion zeigt, wobei die infizierten Zellen spezifisch in der Media des Gefäßes lokalisiert und glattmuskulären Ursprungs sind [Lee et al., 1993]. Generell scheint es im intakten Gefäß natürliche anatomische Barrieren, vor allem das Endothel und die Lamina elastica interna, zu geben, die eine Infektion der glatten Muskelzellen in der Media erschweren [Rome et al., 1994]. Dies belegen einige Infektionsstudien mit intakter Gefäßmuskulatur, bei denen nur in Endothel und Adventitia ein positives Ergebnis erzielt werden konnte [Yao und Wang, 1995; Ooboshi et al., 1997]. Interessanterweise konnten Yao und Wang in ihrer Studie auch zeigen, daß die Infektion verschiedener Gefäße des gleichen Tieres, in diesem Fall der A. renalis (Nierenarterie) und der Aorta abdominales (Bauchaorta), unterschiedlich effizient verläuft [Yao und Wang, 1995]. Die A. renalis wird besser infiziert als die Aorta, was die Autoren auf die höhere Proliferationsrate dieser Arterie zurückführen [Yao und Wang, 1995].

Um das Problem der Schrankenfunktion des Endothels zu umgehen, geht der Infektion häufig eine Entfernung der endothelialen Zellen, die Denudierung des Gefäßes, voran. Des weiteren arbeiten viele Arbeitsgruppen am lebenden Tier und applizieren das Virus unter physiologischen Bedingungen, z.B. bei normalem Blutdruck. Die Tiere können anschließend über einen längeren Zeitraum von bis zu mehreren Wochen am Leben gehalten werden, bevor eine Analyse des infizierten Gewebes vorgenommen wird. Mit solchen Versuchsansätzen ist in mehreren Arbeiten von einer erfolgreichen Infektion der glattmuskulären Gefäßwand berichtet worden [z.B. Gaballa et al., 1998; Shears et al., 1998]. Die Angaben über die Effizienz dieser Infektionen schwanken sehr stark, teilweise innerhalb eines experimentellen Ansatzes zwischen 1-90 % [Yu et al., 1996].

### II Zielsetzung der Arbeit

Die monomeren G-Proteine RhoA, Rac und Cdc42 haben über ihre Effektorproteine Rho-Kinase (ROK) [Leung et al., 1995; Matsui et al., 1996] im Falle des RhoA, bzw. die p21-aktivierten Proteinkinase (PAK) [Manser et al., 1994] im Fall von Cdc42 und Rac, bekanntermaßen einen bedeutenden Einfluß auf die Regulation diverser Cytoskelett-gesteuerter Vorgänge in nicht-muskulären Systemen. Für muskuläre Systeme und speziell für die Regulation der glattmuskulären Kontraktion ist bisher nur die Funktion des RhoA genauer untersucht. Von den Rac/Cdc42-Effektoren ist lediglich die PAK3 auf ihre Wirkung am glatten Muskelgewebe hin untersucht worden: Van Eyk et al. [Van Eyk et al., 1998] beobachten eine durch PAK3 induzierte  $Ca^{2+}$ -unabhängige Kontraktion in Triton-gehäuteten Muskelfasern der *Taenia caeci* des Meerschweinchens.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher zunächst grundlegend untersucht werden, ob eine weitere PAK-Isoform, nämlich die im glatten Muskelgewebe dominante p21-aktivierte Proteinkinase 1 (PAK1), an der Regulation der Myosin II-Phosphorylierung und der Kontraktion der glatten Muskulatur beteiligt ist und welcher Wirkmechanismus bzw. welche Substratspezifität den Effekten zugrunde liegt.

Wie einleitend erwähnt, sind in der Literatur drei direkt am Aktin-Myosin-Apparat der Zelle lokalisierte Substrate der p21-aktivierten Proteinkinase identifiziert worden: die regulatorischen leichten Ketten des Myosins II (r-MLC), die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK) und das regulatorische Protein Caldesmon. Diese drei Substrate sollen im Rahmen dieser Arbeit unter folgenden Gesichtspunkten untersucht werden:

- 1.) Wird die Phosphorylierung der r-MLC durch PAK1 reguliert und kommt es unter Einfluß von PAK1 zu einer Steigerung oder Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung?
- 2.) Führt PAK1 zu einer Phosphorylierung der MLCK und wenn ja, welche Auswirkung hat diese Phosphorylierung auf die Aktivität der MLCK?
- 3.) Wird das regulatorische Protein Caldesmon von PAK1 phosphoryliert und damit ein Einfluß auf die glattmuskuläre Kontraktion ausgeübt?

Da die glattmuskuläre Kontraktion primär durch das Aktivitätsgleichgewicht von MLCK und MLCP reguliert wird, soll zusätzlich zu den drei gerade beschriebenen Substraten analysiert werden, ob PAK1 die Aktivität der MLCP beeinflusst.

## II Zielsetzung

---

Um eine Untersuchung der Bedeutung von PAK1 in intaktem glatten Muskelgewebe zu ermöglichen, soll die Methode der adenoviral vermittelten Überexpression verwendet werden, wobei aufgrund der bisher vorhandenen uneindeutigen Datenlage zunächst eine reproduzierbare und aussagekräftige Datenbasis für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete experimentelle Modell geschaffen werden muß. Dies bezieht sich sowohl auf die Analyse der tatsächlichen Infektionseffizienz von glatten Muskelzellen im Gewebeverband als auch auf eine Optimierung der Kontraktilitätserhaltung der intakten Muskelpräparate während der Organkultur.

Darüber hinaus sollen die Effekte von PAK1 an permeabilisierten glatten Muskelgeweben untersucht werden; diese Experimente ermöglichen eine erste Einschätzung der Bedeutung von PAK1 für die glattmuskuläre Kontraktion. Außerdem ist die Bearbeitung einiger zentraler Fragestellungen, wie z.B. die Bestimmung von Enzymaktivitäten im Muskelpräparat, nur in permeabilisierten Muskelgeweben möglich. Als glattmuskuläre Präparate sollen sowohl die Taenia caeci des Meerschweinchens als auch Gefäßmuskulatur verwendet werden, um Aussagen über eventuelle gewebespezifische Einflüsse der p21-aktivierten Proteinkinasen zu ermöglichen.

## **III Material und Methoden**

### **1 Kraftmessungen an glattmuskulären Gewebepreparaten**

#### **1.1 Herkunft der Gewebe und Lösungen für intakte Präparate**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten glattmuskulären Präparate entstammen unterschiedlichen Tierarten und verschiedenen Geweben. Neben den zur Darmmuskulatur gehörenden Longitudinalmuskeln des Ileums und der Taenia caeci wird außerdem mit der Gefäßmuskulatur der A. carotis communis und der A. coronaris gearbeitet. Die glattmuskulären Darmgewebe werden ausschließlich vom Meerschweinchen verwendet, wogegen die Gefäßmuskulatur von Kaninchen, Maus, Ratte, Meerschweinchen und Schwein präpariert wird. Die Kleintiere (Kaninchen, Maus, Ratte, Meerschweinchen) werden im hauseigenen Tierstall nach den Empfehlungen der „Gesellschaft für Versuchstierkunde“ (Society for Laboratory Animal Science, [www.GV-Solas.de](http://www.GV-Solas.de)) gehalten und mit Standardhaltungsfutter versorgt.

Zur Organentnahme werden Meerschweinchen der Rasse „Dunkin Harley“ beiderlei Geschlechts und männliche Ratten der Rasse „Whister“ mit dem Inhalationsnarkotikum Halothan betäubt und durch rasches Ausbluten getötet. Auch bei den Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ werden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Die Tiere werden durch intramuskuläre Injektion der Anästhetika und Analgetika Ketanest und Rompun betäubt und anschließend durch eine Überdosis Halothan und rasches Ausbluten getötet. Mäuse werden durch rasche cervikale Dislokation getötet. Die Gewebe vom Schwein werden Schlachthoftieren entnommen.

Die Präparation aller Gewebe erfolgt in physiologischer Salzlösung (PSS), welche vor der Verwendung mit Sauerstoff (100 % O<sub>2</sub>) begast wird. Intakte Muskelpräparate können in dieser Lösung bei Raumtemperatur bis zu 36 h gelagert werden.

Die PSS wird bei Meßtemperatur mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente werden, wenn nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt.



**Physiologische Salzlösung (PSS, modifiziert nach Krebs-Henseleit)**

	<b>PSS</b>	<b>Ca<sup>2+</sup>-freie PSS</b>	<b>K<sup>+</sup>PSS</b>
NaCl	118 mM	118 mM	43 mM
KCl	5 mM	5 mM	80 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,6 mM	/ /	1,6 mM
EGTA	/ /	2 mM	/ /
HEPES	24 mM	24 mM	24 mM
Glukose	10 mM	10 mM	10 mM

Für die Herstellung calciumfreier PSS wird selbstverständlich kein CaCl<sub>2</sub> in die Lösung gegeben und zusätzlich der Chelatbildner EGTA in einer Konzentration von 2 mM hinzugefügt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt auch hier mit 1 M NaOH auf pH 7,4.

Bei kaliumreicher PSS (K<sup>+</sup>PSS), die zur Kontraktion der Gefäßmuskelringe verwendet wird, wird die KCl-Konzentration auf 80 mM erhöht und zur Aufrechterhaltung der Ionenstärke entsprechend die NaCl-Konzentration auf 43 mM gesenkt. Auch hier wird pH 7,4 mit 1 M NaOH eingestellt.

**1.2 Präparation der glattmuskulären Darmpräparate vom Meerschweinchen**

**1.2.1 Präparation der Längsmuskulatur vom Ileum**

Nach der Tötung des Tieres wird der Bauchraum geöffnet und das Ileum rasch entfernt, ohne daß Fäzes auf das Gewebe gelangen. Der Darm wird direkt nach der Entnahme gründlich mit PSS gespült und anschließend in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten. Diese Darmabschnitte werden auf einen Glasstab aufgezogen (Ø ca. 5 mm) und mittels einer Skalpellklinge beiderseits des Mesenterialansatzes angeschnitten. Die longitudinale Muskelschicht des Darms kann nun mit einer Pinzette abgelöst werden, wobei eine Dehnung der Muskulatur vermieden wird. Das Muskelgewebe wird anschließend auf einem Objektträger flach ausgebreitet und in Längsrichtung in dünne Streifen von

200 -250  $\mu\text{m}$  Breite geschnitten. Bei der Präparation ist darauf zu achten, daß das Muskelgewebe stets mit ausreichend PSS benetzt ist, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern.

#### **1.2.2 Präparation der Taenia caeci**

Bei den Taenia caeci handelt es sich um schmale Muskelbündel, die auf dem Blinddarm (Caecum) des Meerschweinchens verlaufen. Bei der Präparation dieser Muskeln muß darauf geachtet werden, den Darm nicht zu verletzen, da der Kontakt mit den Fäzes des Tieres zur Schädigung des Gewebes führen kann. Die Muskelstreifen werden heraus präpariert und bis zur direkt anschließend durchgeführten Permeabilisierung mit Triton X-100 (s. III; 1.4.3) in eisgekühlter PSS aufbewahrt. Die Muskeln der Taenia caeci werden in dieser Arbeit nur in gehäutetem Zustand verwendet.

#### **1.3 Präparation der Gefäßmuskulatur verschiedener Spezies**

##### **1.3.1 Präparation der Arteria carotis communis verschiedener Spezies**

Nach der Tötung des Tieres wird der Hals geöffnet und die A. carotis communis frei präpariert. Dabei wird darauf geachtet, größere Blutgefäße, wie z.B. die V. jugularis (Jugularvene), nicht zu verletzen, da das austretende Blut die weitere Präparation behindert. Sind die Halsschlagadern freigelegt und weitestgehend von Bindegewebe befreit, werden sie auf beiden Seiten abgeklemmt und mit zwei kleinen Schnitten innerhalb des abgeklemmten Bereichs geöffnet. Ein Katheter wird in einen der beiden Schnitte eingeführt und das Blut und eventuell gebildete Gerinnsel mit PSS aus dem Gefäßlumen heraus gespült. Durch den zweiten Schnitt wird verhindert, daß es zu einem Stau der Lösung im Gefäß und damit zu einer Überdehnung der Muskulatur kommt. Die weitere Präparation richtet sich nach der Verwendung des Gefäßes.

Für die Experimente mit gehäuteter Gefäßmuskulatur wird die A. carotis communis nach dem Entfernen des Blutes entnommen und unter dem Binokular von noch verbliebenem Bindegewebe befreit. Das Gefäß wird in Ringe geschnitten und dem Häutungsprozeß (s. III; 1.4.3) unterzogen. Für die Breite der Muskelringe wird beim Kaninchen  $\sim 250 \mu\text{m}$

gewählt, beim Meerschweinchen wird aufgrund der dünneren Gefäßwand mit ~500 µm breiten Ringen gearbeitet, um stabile Präparate zu erhalten und somit optimale Kraftmessungen zu ermöglichen.

Für Experimente mit intakter Muskulatur der A. carotis communis, bei denen Gewebe auch teilweise in Kultur genommen und für die adenovirale Infektion verwendet wird, wird zunächst das Endothel mit Hilfe einer aufgerauhten Plastikkanüle entfernt. Anschließend wird erneut ein Katheter in das Gefäßlumen eingeführt und mit PSS gespült. Das Gewebe wird dann entnommen, unter dem Binokular von restlichem Bindegewebe befreit und als Gewebeabschnitte von mehreren Millimetern Länge oder als Ringpräparate in den Versuchen eingesetzt. Die Breite der Ringe beträgt hier ~500 µm.

#### **1.3.2 Präparation der Arteria carotis communis für die Experimente zur Druckapplikation *ex vivo***

Für die Untersuchungen zum Einfluß von Druckapplikation auf die Kontraktilität des Gewebes, wie sie im Rahmen der viralen Infektionsexperimente durchgeführt werden, muß die Präparation der A. carotis communis, wie sie in Kapitel III 1.3.1 beschrieben ist, leicht variiert werden. Da für diese Experimente ein geschlossener Gefäßabschnitt benötigt wird, muß von Beginn der Präparation an auf kleine Verzweigungen und zuführende Versorgungsgefäße (Vasa vasorum) geachtet, und diese einzeln durch Ligaturen verschlossen werden. Die Präparation wird dadurch sehr arbeits- und zeitaufwendig, da vor allem die Versorgungsgefäße sehr klein und häufig schlecht zu erkennen sind. Ist dieser Teil der Präparation abgeschlossen, wird das Gefäßlumen vom Blut befreit und das Endothel entfernt (s. III; 1.3.1). Anschließend wird ein Katheter mittels einer Ligatur im Gefäß befestigt und die Arterie auf der anderen Seite durch eine zweite Ligatur geschlossen. In diesen abgeschlossenen Gefäßabschnitt kann nun über einen Druckmesser kontrolliert Lösung in die A. carotis communis gegeben werden. Ist der gewünschte Druck eingestellt, wird der Schlauch des Katheters abgeklemmt und das Gefäß unter diesem Druck bei den jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wird der Katheter geöffnet und sowohl der Katheter als auch sämtliche Ligaturen entfernt. Aus dem Gefäßabschnitt werden schmale Ringe (~ 500 µm breit) präpariert, mit denen die Kraftmessungen erfolgen.

#### 1.3.3 Präparation der Arteria coronaris des Schweins

Die A. coronaris des Schweins wird für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperimente vom Schlachthof bezogen. Die Coronarien werden nach der Tötung des Tieres zügig entnommen und bis zur weiteren Präparation in eisgekühlter PSS aufbewahrt. Das Gewebe wird unter dem Binokular von Bindegewebe befreit und das Endothel entfernt. Für die anschließende adenovirale Infektion werden Gefäßabschnitte von mehreren Millimetern Länge verwendet.

#### 1.4 Permeabilisierung von Muskelpräparaten

Die Permeabilisierung von Muskelpräparaten ist eine Methode zur Manipulation der Physiologie der Gewebe. Die äußere Zellmembran, die als natürliche Barriere zwischen dem extrazellulären Milieu und dem Cytosol steht, wird dieser Funktion je nach Art der Permeabilisierung mehr oder weniger stark enthoben. Extra- und Intrazellulärraum stehen somit in direktem Kontakt miteinander. Der daraus entstehende Vorteil beruht vor allem auf zwei Aspekten: Zum einen kann die intrazelluläre Ionenkonzentration direkt durch die extrazelluläre Reaktionslösung reguliert werden. Dies ist besonders bei den Calciumionen, die an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion maßgeblich beteiligt sind, von großem Interesse. Der Grad der Aktivierung des Muskelgewebes ist hier prinzipiell unmittelbar durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Reaktionslösung regulierbar, auch ist es möglich, den pH-Wert konstant zu halten. Zum anderen können niedermolekulare Substanzen, wie z.B. Enzyminhibitoren, die die Zellmembran nicht penetrieren können, in das Gewebe gebracht werden. Selbst für große Moleküle, wie z.B. Antikörper, ist es auf diesem Weg möglich, ins Zellinnere bzw. an den kontraktilen Apparat des Muskelgewebes zu gelangen.

Aus diesen eben genannten Vorteilen ergibt sich zwangsläufig ein Nachteil der Permeabilisierungsmethoden. Durch die Aufhebung der Membranbarriere kommt es zum Verlust einiger Proteine, wie z.B. dem Calmodulin (17 kDa). Ausschlaggebend für die Art und den Ausmaß des Verlusts ist in diesem Zusammenhang die angewandte Permeabilisierungsmethode [Übersicht bei Pfitzer, 1996]. Je nach Art der Permeabilisierung variiert mit dem Grad der Membranzerstörung auch Quantität und Qualität der aus den Zellen diffundierenden Proteine. Dieser Proteinverlust ist nicht allein

von der Größe des jeweiligen Proteins abhängig, sondern wird auch maßgeblich von den Wechelswirkungen des Proteins in der Zelle bestimmt. Je mehr und stabilere Bindungspartner ein Protein am kontraktilen Apparat oder, je nach angewandter Permeabilisierungsmethode, an der Zellmembran hat, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für den Verbleib dieses Proteins im Gewebepräparat. Inwieweit der physiologische Zustand des Gewebes erhalten bleibt, muß für jede Art der Permeabilisierung neu abgeschätzt werden.

#### 1.4.1 Permeabilisierung mit $\beta$ -Escin

Bei der Substanz  $\beta$ -Escin handelt es sich um einen aus der Roßkastanie (*Aesculentum hippocastaneum*) stammenden Saponinester, der durch das Herauslösen von Cholesterol die Fluidität der Zellmembran verändert. Dadurch wird die Zellmembran hoch permeabel für niedermolekulare Stoffe wie z.B. ATP, aber auch Proteine bis zur Größe von Antikörpern (ca. 150 kDa) können in die Zelle gelangen [Iizuka et al., 1994]. Sowohl die Diffusion, die bei hochmolekularen Substanzen vergleichsweise gering ist, als auch die Existenz von Interaktionspartnern in der Zelle sind ausschlaggebend für die Homogenität der Beladung des Gewebes mit einer exogenen Substanz.

Auch bei dieser vergleichsweise schonenden Methode der Permeabilisierung, bei der die Membran in weiten Teilen intakt bleibt, kommt es schon zumindest teilweise zum Verlust kleiner cytosolischer Proteine (z.B. CaM). Die Signalweiterleitung über membranständige Rezeptoren und die intrazellulären Signalkaskaden bleiben allerdings funktionell erhalten. So ist z.B. bekannt, daß die kleinen monomeren G-Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa bei der  $\beta$ -Escin-Permeabilisierung im Gewebe verbleiben [Sato et al., 1992].

Der Grad der Permeabilisierung mit  $\beta$ -Escin hängt sowohl von der eingesetzten Konzentration des Saponinesters als auch von der Inkubationszeit ab. Bei zu schwacher Permeabilisierung gelangen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stark diffusionslimitiert in die Zelle, was zu einer sehr langsamen, „kriechenden“ Kontraktion des Gewebes führt; bei zu starker Permeabilisierung mit  $\beta$ -Escin wird die Membran so stark zerstört, daß keine Signalweiterleitung über membrangebundene Rezeptoren mehr gewährleistet ist und kleine cytosolische Proteine vollständig verloren gehen. Die für eine optimale Häutung des

jeweiligen Gewebes nötigen Bedingungen hängen mit der Spezies- und Gewebeherkunft zusammen und müssen daher für jedes Präparat neu optimiert werden.

Die Permeabilisierung mit  $\beta$ -Escin findet an den eingespannten Gewebepräparaten in der Meßapparatur statt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit  $\beta$ -Escin permeabilisierten Muskelfasern des Ileums wird folgendes Permeabilisierungsprotokoll verwendet:

Die Fasern werden in die Meßapparatur eingespannt und für ca. 20-30 min in PSS äquilibriert. Es folgen eine 10-15-minütige Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier PSS und eine 5-minütige Inkubation in Relaxationslösung (s. III; 1.4.2). Diese Schritte dienen dazu, die Calciumionen aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend erfolgt die Permeabilisierung für 35 Minuten bei Raumtemperatur in Relaxationslösung mit  $50 \mu\text{M}$   $\beta$ -Escin. Die  $\beta$ -Escin-Stammlösung wird  $10 \text{ mM}$  in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Vor der Fortsetzung der Messungen wird  $\beta$ -Escin in Relaxationslösung (10 min) ausgewaschen.

#### **1.4.2 Lösungen für die mit $\beta$ -Escin permeabilisierten Präparate**

Da durch die Permeabilisierung der Muskelpräparate der Intrazellulärraum und die Reaktionslösung in direktem Kontakt miteinander stehen, muß die Ionenkonzentration der Badlösung der physiologischen Ionenverteilung in der Zelle soweit wie möglich angepaßt werden. Die Berechnung der freien Ionenkonzentrationen in der Lösung, vor allem der freien Calciumionen, erfolgt mit speziellen Computerprogrammen [Fabiato und Fabiato, 1979], die Ionenstärke wird mit  $0,5 \text{ M}$  Kaliummethansulfonsäure (KMS) auf  $150 \text{ mM}$  eingestellt. Für die Experimente werden zwei Ausgangs-Lösungen verwendet: eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Relaxationslösung ( $\text{pCa} > 8$ ) und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Kontraktionslösung ( $\text{pCa} 4,35$ ), deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration so gewählt ist, daß mit dieser Lösung eine nominell maximale Kontraktion der Muskelpräparate ausgelöst werden kann. Durch Mischung dieser beiden Lösungen kann die jeweils gewünschte Calciumionenkonzentration in der Reaktionslösung eingestellt werden.

Beide Lösungen werden in Milli-Q-Wasser angesetzt, da die Kontamination mit  $\text{Ca}^{2+}$  in diesem Wasser am geringsten ist. Außerdem werden Plastikgefäße verwendet, um eine Verunreinigung durch Auslösen von Calciumionen aus Glas zu vermeiden.

#### Relaxationslösung

Imidazol	20 mM
Na <sub>2</sub> ATP	7,5 mM
EGTA	10 mM
MgAcetat	10 mM
Kreatinphosphat	10 mM
NaN <sub>3</sub>	5 mM
Kaliummethansulfonsäure (KMS)	31,25 mM

#### Kontraktionslösung

Relaxationslösung + 10 mM CaCl<sub>2</sub>

Der pH-Wert wird bei Versuchstemperatur (ca. 23 °C) mit KOH (1 M, calciumfrei) auf pH 7,0 eingestellt, wobei die saurere Kontraktionslösung größere Mengen KOH zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes benötigt als die Relaxationslösung. Dadurch kommt es zu einer ungleichen Ionenstärke der Lösungen, die eines Ausgleichs bedarf.

Zu diesem Zweck wird die Differenz der benötigten Volumina an KOH ( $\text{KOH}_{\text{Kontraktionslösung}} - \text{KOH}_{\text{Relaxationslösung}}$ , 1 M) als entsprechendes Volumen 0,5 M KMS der Relaxationslösung zugegeben.

Beide Lösungen werden als doppelt konzentrierte Stammlösungen angesetzt und portioniert bei -20 °C gelagert.

Vor der Durchführung der Experimente werden die Stammlösungen mit einer Endkonzentration von 2 mM DTT (Dithiothreitol) und 1 µM Leupeptin versetzt. Da bei der Permeabilisierung das für die Regulation der glattmuskulären Kontraktion essentielle Calmodulin nachgewiesener Weise zum Großteil verloren geht, wird allen Reaktionslösungen aufgereinigtes Calmodulin in einer Endkonzentration von 500 nM bis maximal 1 µM zugesetzt. Für die Methode zur Gewinnung des Calmodulins siehe Kapitel III 1.6. Außerdem können weitere Substanzen, wie z.B. Enzyminhibitoren, zugegeben werden, bevor die Lösungen mit 20 mM Imidazol, pH 7,0 (eingestellt mit Methansulfonsäure) auf die einfache Endkonzentration verdünnt werden.

#### 1.4.3 Permeabilisierung mit Triton X-100

Die Permeabilisierung mit Triton X-100 stellt im Gegensatz zu der oben geschilderten Methode mit  $\beta$ -Escin einen sehr starken Eingriff in die Physiologie der Muskelzellen dar. Mit dem Detergenz Triton X-100 werden sämtliche Membransysteme des Gewebes, also neben der äußeren Zellmembran z.B. auch die Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums, komplett entfernt. Man erhält so eine Reduktion der Muskelzelle auf ihren kontraktilem Apparat und die daran fest assoziierten Proteine. Sämtliche löslichen cytosolischen Proteine gehen bei dieser Methode verloren; die von membrangebundenen Rezeptoren vermittelte Signalweiterleitung ist aufgehoben.

Die Permeabilisierung mit Triton X-100 kann an Gewebepräparaten unterschiedlicher Größe durchgeführt werden. In dieser Arbeit werden die Muskelbündel der Taenia caeci des Meerschweinchens in 15-20 mm langen Abschnitten, die A. carotis communis des Kaninchens direkt als schmale Ringpräparate der Permeabilisierung mit Triton X-100 unterzogen. Die Permeabilisierung folgt folgendem Protokoll: Die Muskelbündel der Taenia caeci werden ihrer *in vivo*-Länge entsprechend in einer mit Silgard beschichteten Kulturschale befestigt, die Ringe der A. carotis communis in einem Reaktionsgefäß frei beweglich den unterschiedlichen Inkubationen unterzogen. Alle Inkubationsschritte werden unter Eiskühlung durchgeführt. Einer 30-minütigen Inkubation in Lösung 1 folgt die 4-stündige Permeabilisierung in der 1 % Triton X-100 enthaltenden Lösung 2. Überschüssiges Detergenz wird kurz mit Lösung 1 ausgewaschen und die Präparate anschließend in einer 50 % Glycerin-haltigen Aufbewahrungslösung (Lösung 3) für 10-15 Minuten inkubiert. Vor der Lagerung in Lösung 3 bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  muß sichergestellt sein, daß die Muskelpräparate komplett mit der Glycerinlösung getränkt sind, damit sie nicht einfrieren. Dies würde ansonsten zu einer starken Schädigung des Gewebes führen. In Lösung 3 können die Präparate für mehrere Wochen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, ohne ihre Kontraktilität einzubüßen. Da sich während der Lagerung jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und die Regulation kontraktilem Parameter verändern, werden die gehäuteten Taeniamuskeln in dieser Arbeit nur eine Woche lang für die Durchführung von Kraftmessungen verwendet, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten.



#### Lösung 1

Imidazol	20 mM
EGTA	5 mM
KCl	50 mM
Saccharose	150 mM

Der pH der Lösung wird mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

#### Lösung 2

Lösung 1 + 1 % (v/v) Triton X-100

#### Lösung 3

Zur Herstellung dieser Lösung wird einfach konzentrierte Relaxationslösung (s. III; 1.4.4) mit einer Endkonzentration von 2 mM DTT versetzt und anschließend zu gleichen Anteilen mit wasserfreiem Glycerin gemischt.

#### 1.4.4 Lösungen für die mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate

Für Triton X-100-permeabilisierte Präparate sind ebenfalls spezielle Meßlösungen notwendig. Die Ionenzusammensetzung ähnelt der für die  $\beta$ -Escin-Präparate verwendeten Lösungen; die Ionenstärke muß allerdings für mit Triton X-100 permeabilisierte Präparate gesenkt werden (~100 mM), um später im Experiment eine optimale Kraftentwicklung zu erreichen. Auch hier kommen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Relaxationslösung ( $\text{pCa} > 8$ ) und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige maximale Kontraktionslösung ( $\text{pCa} 4,35$ ) zur Verwendung.

#### Relaxationslösung

Imidazol	20 mM
$\text{Na}_2\text{ATP}$	7,5 mM
EGTA	4 mM
$\text{MgCl}_2$	10 mM
Kreatinphosphat	10 mM
$\text{NaN}_3$	1 mM

#### **Kontraktionslösung**

Relaxationslösung + 4 mM CaCl<sub>2</sub>

In manchen Experimenten wird eine Ca<sup>2+</sup>- und ATP-freie Rigor-Lösung verwendet, der nicht nur das ATP, sondern auch das für die ATP-Regenerierung in der Zelle benötigte Kreatinphosphat fehlt.

#### **Rigorlösung**

Imidazol	20 mM
EGTA	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
KCl	50 mM
NaN <sub>3</sub>	1 mM

Bei allen Lösungen wird pH 6,7 bei Raumtemperatur mit KOH (1 M, calciumfrei) eingestellt. Der Ausgleich der Ionenstärke erfolgt bei diesen Lösungen mit 1 M KCl. Ansonsten erfolgt die Herstellung dieser Lösungen analog zu der unter III 1.4.2 geschilderten Vorgehensweise für die Lösungen der mit  $\beta$ -Escin permeabilisierten Präparate.

Da in den Triton-gehäuteten Geweben die Kreatinkinase, die zusammen mit dem Kreatinphosphat ein ATP-regenerierendes System bildet, nicht mehr vorhanden ist, wird diese den Reaktionslösungen vor Durchführung der Experimente in einer Aktivität von 140 U/ml zugegeben.

## **1.5 Aufbau der Versuchsanordnung**

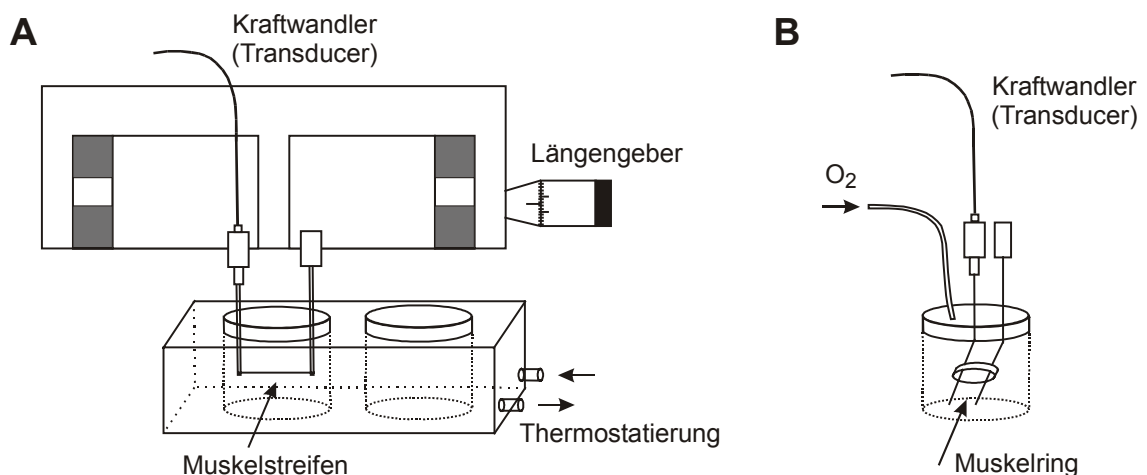
### **1.5.1 Muskelstreifen der Longitudinalmuskulatur des Ileums und der Taenia caeci**

Die Muskelstreifen der Darmmuskulatur werden zwischen einem feststehenden Längengeber und einem Kraftaufnehmer (Transducer; KG4, Scientific Instruments, Heidelberg) mit einer pinzettenartigen Halterung isometrisch fixiert.

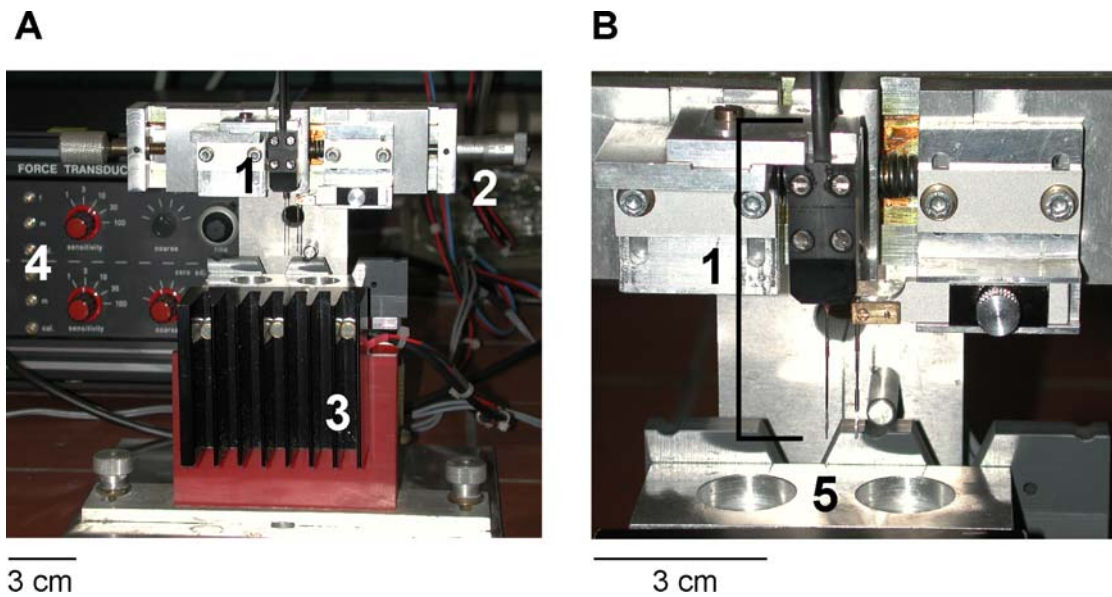
Die Erzeugung des Kraftsignals der Muskelpräparate findet mittels des Prinzips der Differenzphotozelle im Inneren des Transducers statt. Bei einer Auslenkung des Transducers kommt es zur proportionalen Änderungen der Photoströme in den beiden Halbzellen, deren Differenz nach Ableitung in Spannungspotentiale ( $\Delta V$ ) an eine Meßbrücke weitergeleitet und verstärkt wird. Die Kalibrierung des Transducers erfolgt über das Anhängen verschiedener Gewichte (0,3-5 mN) entsprechend den erwarteten Kontraktionskräften.

Um die Isometrie der Kraftmessungen zu erhalten, sollte die Steifheit des Transducers (*stiffness*,  $\Delta F/\Delta x$ ) möglichst groß, der reziproke Wert, die Elastizität (*compliance*,  $\Delta x/\Delta F$ ), möglichst gering sein. Da eine gewisse Elastizität natürlich nötig ist, um die durch eine Kontraktion der Muskelpräparate bewirkte Auslenkung der Halterung des Transducers registrieren zu können, muß das Verhältnis von Steifheit und Elastizität der Kraftentwicklung des jeweiligen Muskelpräparats optimal angepaßt sein.

Die Reaktionslösungen befinden sich in kleinen Plexiglasschalen (0,25-1 ml Volumen), die in einem entlang seiner Längsachse verschiebbaren Metallblock stehen. Die Temperatur des Metallblocks und somit der Badlösung kann sowohl über ein Wasserbad als auch über fest montierte Peltier-Elemente reguliert werden. Der Wechsel der jeweiligen Badlösung geschieht durch den Austausch der Schalen (Abb. III-1; A; Abb. III-2).



**Abb. III-1:** Schematischer Aufbau der Versuchsaapparaturen für die Kraftmessungen.  
**A** Meßstand der Muskelfasern des Darmgewebes.  
**B** Halterung zur Messung von Gefäßmuskelringen.



**Abb. III-2:** Die Versuchsapparatur für Kontraktilitätsmessungen an Muskelfasern.  
**A** Komplettansicht eines Meßstandes für Muskelfasern.  
**B** Vergrößerte Ansicht der Halterung zum Einspannen von Muskelfasern.  
1: Kraftwandler (Transducer); 2: Längengeber; 3: Peltier-Element; 4: Meßbrücke;  
5: Halterung für die Reaktionsgefäße

#### 1.5.2 Ringpräparate der *A. carotis communis*

Auch diese Muskelpräparate werden zwischen einem feststehenden Metallstab und einem Kraftwandler (Transducer) fixiert. Die Halterungen sind hierbei jedoch so geformt, daß ihre Enden rechtwinklig zur Auslenkungsrichtung verlaufen (Abb. III-1; B). Über die beiden parallel stehenden Metalldrähte kann der Muskelring aufgezogen werden und lenkt den Transducer bei seiner Kontraktion aus. Die Stärke dieser Metalldrähte richtet sich nach der Größe des jeweils verwendeten Gewebepreparats. Der weitere Aufbau der Apparatur entspricht dem der Darmmuskelpreparate.

Für die Experimente mit intakter Gefäßmuskulatur ist der Sauerstoffgehalt der begasten Lösung nicht ausreichend. Daher wird während dieser Messungen permanent Sauerstoff auf die Oberfläche der Reaktionslösung geleitet. Eine direkte Begasung innerhalb der Lösung würde zu Vibrationen und damit zu störenden Auslenkungen des Transducers führen.

#### 1.6 Calmodulin

Wie schon erwähnt stellt der Verlust kleinerer cytosolischer Proteine durch die Permeabilisierung einen Nachteil dieser Methode dar. Neben diversen, für die Kontraktion direkt nicht relevanten Proteinen, geht nachgewiesener Weise auch das Calmodulin aufgrund seiner geringen molekularen Größe von 17 kDa zum Großteil verloren. Für die Kontraktion der glatten Muskulatur ist dieses Protein allerdings essentiell, so daß nach der Permeabilisierung allen Reaktionslösungen aufgereinigtes Calmodulin in einer Endkonzentration von 500 nM bis maximal 1 µM zugesetzt werden muß. Das für diese Arbeit verwendete Calmodulin wird nach einer Methode von Gopalakrishna und Anderson [Gopalakrishna und Anderson, 1982 und 1985] aus Rinderhoden gewonnen.

#### 1.7 GST-Fusionsprotein der p21-aktivierten Proteinkinase 1 (GST-PAK1<sup>T422E</sup>)

Das Fusionsprotein GST-PAK1<sup>T422E</sup> wird kloniert, exprimiert und gereinigt wie bei Manser beschrieben [Manser et al., 1997]. Es wird mit der cDNA des Rattenproteins αPAK gearbeitet, die sich von der humanen PAK1 darin unterscheidet, daß sie im sauren N-terminale Bereich des Proteins für einen Aspartatrest weniger kodiert (zusätzlich Asp<sub>180</sub> in PAK1). Die Autophosphorylierungsstelle im Aktivierungsloop ist mutiert (T422E), um die basale Aktivität des gereinigten Enzyms zu erhöhen. Die cDNA wird in einen pGEX-Vektor kloniert und in dem E. coli-Stamm BL21 exprimiert. Die Aufreinigung erfolgt nach einem Standardprotokoll (Pharmacia). Die Elution von der Glutathion-Sepharose wird mit 10 mM Glutathion in Reinigungspuffer durchgeführt.

Das gereinigte Protein wird gegen den unten angegebenen Puffer dialysiert; die Proteinkonzentration beträgt 1,8 mg/ml.

#### Reinigungspuffer

PBS + 50 mM Tris/HCl, pH 7,8  
+ 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Dialysepuffer**

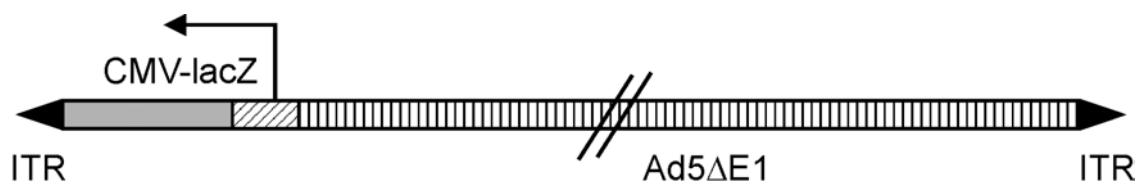
KCl	100 mM
Imidazol, pH 7,0	10 mM
DTT	1 mM

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wird die aufgereinigte GST-PAK1<sup>T422E</sup> von E. Manser (Glaxo-IMCB Laboratory, Institute for Molecular and Cell Biology, National University of Singapore) zur Verfügung gestellt.

**2 Herstellung des adenoviralen Vektors und Methoden zum Nachweis der adenovirale Infektion von Geweben**

**2.1 Herstellung des adenoviralen Vektors**

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete adenovirale Vektor basiert auf dem Genom des humanen Adenovirus 5 und trägt neben den adenoviralen Sequenzen (nt. 1-440 und nt. 3523-35935) den Promotor des Cytomegalovirus (CMV), sowie ein SV40-Spleißsignal und das  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) aus *E. coli* (Abb. III-3). Die E1-Region des viralen Genoms ist deletiert ( $\Delta E1$ ), so daß bei der Klonierung replikationsdefiziente Viren erzeugt werden.



**Abb. III-3:** Vektorkarte des Kontrollvirus AdGS74.

Ad5  $\Delta E1$ : Sequenz des humanen Adenovirus 5 mit deletierter  $\Delta E1$ -Region;  
 CMV: Promotorregion des Cytomegalovirus; *lacZ*:  $\beta$ -Galactosidase Gen aus *E. coli*;  
 ITR: *inverted terminal repeats*

Bei der Herstellung des Vektors wird die CMV-lacZ Expressionskassette in die unique PacI Restriktionsstelle des Vektors pGS66 [Schiedner et al., 2000] kloniert. Das so entstandene Plasmid pGS74 beruht auf pBluescript.

Das Plasmid pGS74 wird mit SmaI endonukleolytisch gespalten, über Phenol/Chloroform/EtOH gereinigt, in N52/E6 Zellen [Schiedner et al., 2000] mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert und mit agarosehaltigem Wachstumsmedium überschichtet. Nach 6-10 Tagen werden Virus-haltige Plaques isoliert und nach einer weiteren Plaque-Aufreinigung wird AdGS74 in N52/E6Zellen amplifiziert. Der gewonnene Virus AdGS74 wird in zwei aufeinander folgenden CsCl-Gleichgewichtszentrifugationen gereinigt, entsalzt und in Tris Saline/10 % Glycerol eingefroren.

Für die Titration werden N52/E6 Zellen mit unterschiedlichen Mengen AdGS74 infiziert und mit Hilfe einer anschließenden  $\beta$ -gal-Färbung die Menge an *blue forming units/ml* (bfu/ml) ermittelt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Adenoviren werden von Fr. Dr. G. Schiedner aus der Arbeitsgruppe von Hr. Priv.-Doz. Dr. S. Kochanek kloniert, aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.

Die Infektion von Zellen und Geweben mit dem Virus AdGS74 führt zur Überexpression des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase, das mit verschiedenen Nachweismethoden (s. III; 2.2 bzw. III; 2.3) detektiert werden kann.

#### **2.2 Enzymhistochemischer Nachweis der $\beta$ -Galactosidase mittels X-gal-Färbung und histologischer Analyse**

Mit Hilfe dieser Nachweismethode ist es möglich, in einem Gewebepräparat einzelne infizierte Zellen zu detektieren und anhand ihrer Morphologie zu charakterisieren. Das infizierte Gewebe wird dazu zunächst fixiert und dann mit einer speziellen Färbelösung inkubiert. Das überexprimierte Enzym  $\beta$ -Galactosidase katalysiert dann die Reaktion vom farblosen 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-gal) zum entsprechenden Indoxylderivat, das an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert [Winnacker, 1990]. Anschließend wird das Gewebe mit histologischen Methoden weiter verarbeitet und mikroskopisch analysiert.

Der Vorteil dieser Methode liegt eindeutig in der Möglichkeit, einzelne infizierte Zelltypen im Gewebeverband zu unterscheiden und zu identifizieren. Es handelt sich bei diesem Verfahren allerdings um keine lineare Nachweismethode. Das vom Enzym gebildete Produkt muß, um eine eindeutige Lokalisierung des überexprimierten Proteins zu ermöglichen, nah beim Enzym verbleiben und darf dem System nicht diffusiv entweichen. Das bedeutet aber gleichzeitig, daß es nach einiger Zeit zu einer Blockierung des Enzyms kommt, so daß bei einer Verlängerung der Reaktionszeit nicht eine linear zunehmende Färbung erreicht wird.

Zur Durchführung der hier beschriebenen Experimente wird das Gewebe nach Abschluß der Infektion kurz in PBS gewaschen, um Reste des Kulturmediums zu entfernen, und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Für die schmalen Muskelringe der *A. carotis communis* ist es für eine gute Fixierung ausreichend, das Gewebe in der Fixierungslösung zu inkubieren. In den längeren Gefäßabschnitten kommt es jedoch aufgrund des kleinen Gefäßdurchmessers zu keinem ausreichenden Austausch der Fixierungslösung im Inneren der Arterie, so daß eine gleichmäßige Fixierung des Gewebes nicht gewährleistet ist. Aus diesem Grund wird in diesen Gefäßabschnitten zunächst ein Katheter befestigt, so daß die Fixierungslösung mit Hilfe einer Spritze wiederholt durch das Gefäß gespült werden kann. Da der Kontakt der Muskelzellen mit dem Fixiermedium zu einer starken Überkontraktion der Zellen führt, werden die ausgebreiteten Ileumpräparate vor der Fixierung mit Hilfe von kleinen Stahlnadeln auf einer Silgardoberfläche befestigt. Die Geometrie des Präparates und die Ausrichtung der Muskelzellen in dem Gewebe bleiben so bei der Fixierung erhalten, da der Kontraktion des Gewebes entgegen gewirkt wird. Nach der Fixierung werden die Muskelpräparate fünfmal für ca. 2 Minuten mit PBS gewaschen, um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen. Die längeren Gefäßabschnitten werden auch beim Waschen mit Hilfe des Katheters und einer Spritze wiederholt mit dem Waschpuffer durchspült. Anschließend erfolgt eine 5-6-stündige Inkubation der Gewebe in der Färbelösung. Die Ringe der *A. carotis communis* und die Ileummuskulatur werden dabei frei schwimmend in der Lösung inkubiert, die Gefäßabschnitte der Arterien mit Hilfe einer Peristaltikpumpe unter permanenter Perfusion, um eine Verarmung des Edukts im Innern der Gefäße zu verhindern. Die Farbreaktion wird bei 37 °C im Dunkeln durchgeführt.



#### **Färbelösung**

Tris HCl, pH 7,5	50	mM
MgCl <sub>2</sub>	1	mM
NaCl	15	mM
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	2,5	mM
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	2,5	mM
X-gal	0,5	mg/ml

Die Lösungen der Eisenkomplexe werden getrennt als 50 mM Stammlösungen angesetzt und durch Faltenfilter filtriert, um sie von ungelösten Salzkomponenten zu befreien. Werden die beiden Substanzen in getrennten Lösungen angesetzt, sind sie stabil und können über einen längeren Zeitraum gelagert werden, wobei man wegen der Lichtempfindlichkeit der Komplexe eine Lagerung im Dunkeln vornehmen sollte.

#### **X-gal-Lösung**

10 mg/ml X-gal in 100 % N,N-Dimethylformamid

Die X-gal-Lösung wird jeweils direkt vor der Färbung frisch angesetzt und bis zu ihrer Verwendung bei –20 °C im Dunkeln gelagert.

Nach Beendigung der Färbung und kurzem Waschen der Präparate in Wasser folgt die histologische Analyse der Gewebepreparate. Die Gefäßabschnitte werden zunächst in 30 %iger Saccharoselösung inkubiert und nach Sättigung mit dieser Lösung in Einbettmedium unter flüssigem Stickstoff schnell eingefroren (Einfrierzeit 45 sec). Die Gewebelöcke können bis zur weiteren Aufarbeitung bei –80 °C gelagert werden. Zur Analyse des Gewebes werden Kryoschnitte unterschiedlicher Dicke (16, 20 und 25 µm) angefertigt und auf mit Chrom-Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Temperatur des Kryostaten beträgt –29 °C, die der Objekte –21 °C. Die Gewebeschnitte werden auf den Objektträgern an der Luft getrocknet und anschließend das Einbettmedium durch 5-minütiges Waschen in Wasser entfernt. Nach erneutem Lufttrocknen werden die Präparate abschließend mit Entellan eingedeckelt.

Die glatte Muskulatur des Ileums wird anschließend an die Farbreaktion erneut ausgebreitet auf einer Silgardoberfläche befestigt und mit 0,2 % Glutaraldehyd für weitere 48 h nachfixiert. Danach folgt auch hier die histologische Analyse der Präparate.

Die histologische Aufarbeitung der Gewebepreparate nach Abschluß der Färbereaktion wird von Fr. Ilona Rohrmann in der Arbeitsgruppe von Hr. Prof. W.F. Neiss, Institut für Anatomie der Universität zu Köln, durchgeführt.

#### 2.3 $\beta$ -Galactosidase-Assay mit Gewebeextrakten

Mit dieser Nachweismethode ist eine Analyse der Infektionseffizienz in Gewebehomogenaten möglich. Man erhält dabei Angaben über das Verhältnis der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in infizierten und Kontrollgeweben. Es ist mit dieser Methode allerdings nur eine Bestimmung der Gesamtinfektion möglich; die Unterscheidung einzelner infizierter Zelltypen in einem Gewebe kann nicht erfolgen. Allerdings ist bei dieser Methode im Gegensatz zur oben erwähnten X-gal-Färbung (s. III; 2.1) im intakten Gewebe ein linearer Zusammenhang zwischen Reaktionszeit und Meßergebnis gegeben. Bei der hier induzierten Reaktion wird ein diffundierfähiges Produkt gebildet, so daß das Enzym über den ganzen Inkubationszeitraum eine gleichbleibende Aktivität aufrecht erhalten kann. Bei diesem Nachweis wird das synthetische Substrat Ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid (ONPG) von der  $\beta$ -Galactosidase in freies Ortho-nitrophenol, eine gelbe Substanz, und  $\beta$ -D-Galactose umgesetzt [Lederberg, 1950; Sambrook und Russel, 2001]. Das Ortho-nitrophenol kann photometrisch quantifiziert werden.

Nach Beendigung der Infektion werden die Gewebe kurz in Kaliumphosphatpuffer gewaschen und anschließend je nach Größe des Präparats in 50-100  $\mu$ l Homogenisationspuffer aufgearbeitet.

#### Homogenisationspuffer

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8	100 mM
DTT	1 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,6 mM
Triton X-100 (v/v)	0,1 %

Nach kurzer Extraktionszeit auf Eis werden die Proben abzentrifugiert (10 min,  $16100 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und die Überstände in einem Reaktionsendvolumen von  $300\text{ }\mu\text{l}$  für die Nachweisreaktion in folgenden Ansätzen eingesetzt:

Überstand	10-40	$\mu\text{l}$
Natriumphosphatpuffer, pH 7,3	100	mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	50	mM
ONPG	0,6	mg/ml

Die Proben werden für 30-60 Minuten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln inkubiert und die Farbreaktion durch Zugabe von  $500\text{ }\mu\text{l}$   $1\text{ M Na}_2\text{CO}_3$  zum Reaktionsansatz gestoppt. Der photometrische Nachweis des gebildeten Substrats erfolgt bei einer Wellenlänge von  $420\text{ nm}$  (DU 640 Spektrophotometer, Beckmann). Der Abgleich der Werte der infizierten und nicht infizierten Gewebe erfolgt über die Proteinkonzentration der Überstände, die mittels Bradford (s. III; 7) bestimmt wird.

### 3 Gelelektrophoretische Methoden

Elektrophoretische Methoden sind Standardverfahren zur analytischen Trennung biologischer Moleküle. Verschiedene Formen der Gelelektrophorese sind sehr effektive Trennmethoden, da die siebartige Struktur der Gele zu einer Verbesserung des Trenneffektes führt. Als Gelmaterial wird in der Regel Polyacrylamid oder Agarose verwendet.

Die Auftrennung von Proteingemischen in die einzelnen Bestandteile erfolgt nach Molekülgröße und elektrophoretischer Beweglichkeit, wobei die Gelporen als „molekulare Netze“ fungieren, die die Wanderung größerer Moleküle stärker behindern als die kleineren. Die Porengröße kann variiert und der Problemstellung angepaßt werden. Dies erfolgt bei Polyacrylamidgelen durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen an Acrylamid (AA) und Methylenbisacrylamid (BA).

### 3.1 Disk-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Gelelektrophorese lassen sich Proteingemische in einem Polyacrylamidgel in klare, scharfe Banden auftrennen. Dazu wird ein aus zwei Gelen und speziellen Puffern kombiniertes System benötigt.

Zunächst wird ein Trenngel in der Gelkammer vorgelegt, polymerisiert und dann mit Sammelgel-Lösung überschichtet. Die Gele unterscheiden sich sowohl in ihrem Polyacrylamidgehalt, und damit in ihrer Porengröße, als auch in ihrem pH-Wert.

Aufgrund elektrochemischer und physikalischer Effekte werden die makromolekularen Proteine während der Elektrophorese im Sammelgel gebündelt und bilden bei ihrem Eintritt ins Trenngel schmale Banden. Im Trenngel wandern die Proteine aufgrund ihrer Größe unterschiedlich schnell, wodurch sie effektiv getrennt werden. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Gelsysteme bewirkt eine deutliche Verbesserung der Auflösung im Vergleich zu anderen Methoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Form der Gelelektrophorese ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Als Detergenz wird dabei Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet, welches sowohl dem Probenpuffer als auch den Gellösungen beigelegt wird.

#### Trenngel

AA/BA (30/0,8) (v/v)	x	%
SDS (w/v)	0,1	%
Tris-HCl, pH 8,8	0,375	M
Glycerin (v/v)	2,5	%
APS (w/v)	0,05	%
TEMED (v/v)	0,05	%

Je nach aufzutrennendem Proteingemisch werden verschiedene Acrylamidkonzentrationen für das Trenngel gewählt. Für die optimale Auftrennung im hochmolekularen Bereich wie z.B. für MLCK und Caldesmon (~130 kDa) wird ein niedrigprozentiges Gel mit 7,5-10 % Polyacrylamid verwendet, während bei kleinen Proteinen (r-MLC: 20 kDa) eine höhere Prozentigkeit (15 %) zur Anwendung kommt. Das Sammelgel wird in allen Fällen gleich gehalten.

#### **Sammelgel**

AA/BA (30/0,8) (v/v)	3,3	%
SDS (w/v)	0,1	%
Tris-HCl, pH 6,8	0,125	M
APS (w/v)	0,3	%
TEMED (v/v)	0,3	%

Die Polymerbildung des Acrylamid und die Quervernetzung mit Bisacrylamid werden durch die Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) gestartet.

Zur Herstellung der Gele und zur Durchführung der Elektrophorese werden Minigelsysteme von Hoefer bzw. Biometra verwendet (Format ca.  $6,5 \times 8$  cm).

Die Proben werden entweder direkt in einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer hergestellt oder vor der Elektrophorese mit  $2 \times$  bzw.  $5 \times$  SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen fünf Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  aufgekocht. Da die Elektrophorese hier unter denaturierenden Bedingungen ablaufen soll, wird dem Probenpuffer vor jeder Verwendung frisch DTT zugegeben.

#### **SDS-Probenpuffer (Laemmlipuffer, $1 \times$ )**

Tris-HCl, pH 6,8	0,05	M
Harnstoff	4	M
SDS (w/v)	1	%
Bromphenolblau (w/v)	0,01	%
DTT	0,02	M

#### **SDS-Laufpuffer ( $1 \times$ )**

Tris	0,025	M
Glycin	0,192	M
SDS (w/v)	0,1	%

Als Größenreferenz dient entsprechend dem aufzutrennenden Proteingemisch ein Molekulargewichtsmarker (z.B. *SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker*, Novex). Die Stromstärke beträgt beim Einlaufen der Proben in das Sammelgel 10 mA und wird nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel auf 15 mA erhöht.

#### 3.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Jedes Protein besitzt aufgrund seiner Anzahl an positiv und negativ geladenen Aminosäuren eine bestimmte Gesamtladung, die vom pH-Wert der Umgebung abhängig ist. Für alle Proteine existiert daher ein sogenannter Isoelektrischer Punkt (pI), bei dessen pH-Wert die Anzahl der negativen und positiven Ladungen des Moleküls identisch ist und das Protein somit die Nettoladung Null trägt. Wird ein Proteingemisch über einen pH-Gradienten aufgetrennt, wird jedes Protein im elektrischen Feld wandern, bis es seinen pI erreicht und dort verbleiben. Auf diese Weise wird es möglich, Proteine, die sich nicht in ihrem Molekulargewicht, sondern lediglich in ihrer Aminosäurezusammensetzung, und damit in ihrer Ladung, unterscheiden, deutlich voneinander zu trennen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn man die unphosphorylierte und die phosphorylierte Form eines Proteins auftrennen möchte.

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wird in einem Polyacrylamidgel durchgeführt, dem amphotere Substanzen (Pharmalyte, Pharmacia) zugegeben werden. Bei den Ampholinen handelt es sich um Moleküle mit einer definierten Charakteristik bezüglich der sauren und basischen Eigenschaften, die sich im elektrischen Feld mit der angelegten Spannung ausrichten und so einen pH-Gradienten aufbauen. Bei der anschließenden Elektrophorese mit dem zu trennenden Proteingemisch werden die Proteine dann ihrem pI entsprechend im Gel verweilen. Eine IEF ist zeitunabhängig, wenn der pH-Gradient stabil bleibt.

In dieser Arbeit wird die IEF in Rundgelen nach O'Farrel [O'Farrel et al., 1977] durchgeführt. Die Komponenten der Acrylamidlösung werden gemischt und der Harnstoff durch Erwärmen (handwarm) gelöst. Die Polymerisierung wird durch Zugabe von APS und TEMED gestartet und die Gellösung in Einmal-Mikropipetten (100 µl, Brand) mit Hilfe einer aufgesetzten Spritze bis zu einer Höhe von ~7,5 cm aufgezogen.

#### Acrylamidlösung

AA/BA (28/1,6)	0,333 ml	(3,3%, w/v)
Harnstoff	1,375 g	
Triton X-100 (10 %, v/v)	0,25 %	
Aqua bidest.	0,75 ml	
APS	20 µl	(0,07 %, w/v)
TEMED	1,8 µl	(0,06 %, v/v)

#### IEF-Probenpuffer

Harnstoff	9,2 M	
Tris-HCl, pH 7,5	0,01 M	
Bromphenolblau (w/v)	0,002 %	
DTT	0,01 M	(frisch zugegeben)

Die Ampholine werden sowohl dem Probenpuffer als auch der Gellösung in einer Endkonzentration von 2 % (v/v) zugegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich mit einem pH-Gradienten von pH 4,5-5,4 gearbeitet.

Nach ca. 1,5 h sind die Rundgele auspolymerisiert und können in die IEF-Laufkammer (Mini-IEF Typ 646, Biometra) eingesetzt werden. Damit die Ampholine sich ausrichten und den pH-Gradienten ausbilden können, wird ein 30-minütiger Vorlauf bei einer konstanten Spannung von 300 V gestartet. Die Rundgele werden dafür mit je 30 µl Probenpuffer beladen und dann mit Kathodenpuffer aufgefüllt, um einen Kontakt zum Laufpuffer herzustellen. Dabei ist darauf zu achten, daß es nicht zu einer Durchmischung von Proben- und Kathodenpuffer kommt, da sonst kein optimaler Vorlauf möglich ist.

#### Kathodenpuffer

NaOH	0,02 M
------	--------

#### Anodenpuffer

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,01 M
--------------------------------	--------

Am Ende des Vorlaufs wird der Kathodenpuffer wieder von der Geloberfläche entfernt und die Probe aufgetragen. Auch hier wird anschließend wieder mit Probenpuffer und Kathodenpuffer überschichtet, bis die Kapillare komplett gefüllt ist, wobei wiederum auf eine Trennung der einzelnen Lösungen zu achten ist. Die Elektrophorese wird für 4 h bei 600 V durchgeführt. Anschließend werden die Rundgele bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Ausbildung des pH-Gradienten während der IEF und seine Stabilität für die Dauer der Elektrophorese können wie folgt kontrolliert werden: Eines der Rundgele wird nicht mit einer Probe, sondern lediglich mit Probenpuffer beladen. Anschließend an die Elektrophorese wird das Gel aus der Kapillare entfernt und in ca. 5 mm lange Stücke geschnitten. Diese Gelabschnitte werden für ca. 1-2 h in je 1 ml Aqua bidest. inkubiert und so die Ampholine aus dem Gel extrahiert. Der pH-Wert in dieser Lösung kann dann mittels einer pH-Elektrode ( $\varnothing$  3mm, Mettler Toledo InLab 423) bestimmt und der Verlauf des pH-Gradienten in dem Rundgel graphisch aufgetragen werden. Die Linearität des pH-Gradienten ist so unmittelbar kontrollierbar.

### 3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgt zunächst die Auftrennung eines Proteingemisches anhand der Ladungseigenschaften der einzelnen Proteine mittels einer Isoelektrischen Fokussierung (IEF: 1. Dimension) und anschließend die weitere Separierung anhand des Molekulargewichtes mit einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE: 2. Dimension). Diese Methode ermöglicht z.B. die Auftrennung von Proteinen des gleichen Molekulargewichtes oder von Proteinen mit unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden (Abb. III-4; s. III; 8).

Die 1. Dimension (IEF) wird durchgeführt wie unter III 3.2 beschrieben. Für die als 2. Dimension verwendete SDS-PAGE wird ein Polyacrylamidgel verwendet, dessen Herstellung im Wesentlichen der unter III 3.1 beschriebenen Anleitung folgt. Auch hier wird ein diskontinuierliches Gel verwendet, dessen Trenngelzusammensetzung sich nach der jeweiligen Problemstellung richtet. Für die Auftrennung der 20 kDa-schweren phosphorylierten und unphosphorylierten Form der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II wird z.B. ein 15 %iges Trenngel verwendet. Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel beträgt auch hier 3,3 %. Es wird jedoch kein Sammelgel mit ausgesparten



Geltaschen verwendet, sondern die Polyacrylamidlösung wird bis zur oberen Kante der Gelplatten gegossen, so daß ein durchgehendes Sammelgel entsteht. Anschließend wird das IEF-Rundgel aus dem Kapillarröhrchen auf einen Objektträger gegeben und für 10 min mit SDS-Probenpuffer äquilibriert. Dieser Schritt dient neben der Entfernung der Ampholine auch der Einstellung des für die SDS-PAGE benötigten pH-Wertes. Außerdem erfolgt die Bindung des SDS an die Proteine und führt damit zur einheitlichen negativen Ladung der Proteine, wie sie für die denaturierende SDS-PAGE essentiell ist. Das Rundgel wird dann horizontal auf das Sammelgel des Polyacrylamidgeles gelegt und mit einer 1 %igen Agaroselösung fixiert.

#### **1 %ige Agaroselösung**

Tris-HCl, pH 6,8	0,05	M
SDS (w/v)	1	%
Bromphenolblau (w/v)	0,01	%
Agarose (w/v)	1	%

Die anschließende Elektrophorese erfolgt wie für die SDS-PAGE (s. III; 3.1) beschrieben bei 10 mA im Sammelgel, bzw. 15 mA im Trenngel. Für die 2. Dimension der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II wird die Elektrophorese für 20 min fortgeführt, nachdem die Bromphenolblau -Front das Gel verlassen hat. So kann eine optimale Positionierung der r-MLC im SDS-Gel erfolgen (Abb. III-4; s. III; 8).

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine können anschließend angefärbt (s. III; 4) oder auf eine Nitrocellulose -Membran transferiert (s. III; 6.1) werden.

Für die dauerhafte Aufbewahrung in getrocknetem Zustand wird das Gel zwischen zwei Cellophanfolien mit dem Geltrocknungssystem „Easy Breeze“ von Hoefer getrocknet. Gele mit radioaktiv markierten Proteinen werden auf einem Filterpapier getrocknet (Geltrockner Modell 583, BioRad).

## 4 Nachweise von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Färbetechniken

### 4.1 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie BrilliantBlue R-250®

Bei dieser Methode erfolgt die Detektion der aufgetrennten Proteine mit Hilfe des organischen Farbstoffes Coomassie BrilliantBlue R-250®. Dieser bindet im sauren Medium durch elektrostatische Wechselwirkung an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,3-0,5 µg Protein pro Gelbande.

Für die Anfärbung wird das Gel für ca. 1 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärber 1 (0,5-1 h) und Entfärber 2 (0,5-1 h) entfärbt, bis die Gelbanden sich deutlich vom Hintergrund abheben.

#### Färbelösung

Coomassie BrilliantBlue R-250®	0,25 %
Methanol (v/v)	40 %
Eisessig (v/v)	10 %

#### Entfärbelösung 1

Ethanol (96 %, vergällt, v/v)	50 %
Eisessig (v/v)	7 %

#### Entfärbelösung 2

Ethanol (96 %, vergällt, v/v)	5 %
Eisessig (v/v)	7 %

Zum kompletten Entfärben eines Gels wird dieses über Nacht in Entfärbelösung 1 inkubiert.

#### 4.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit BioSafe®-Coomassie

BioSafe®-Coomassie enthält den Farbstoff G-250 und ist eine kolloidale Färbelösung. Sie ist hinsichtlich der Nachweisgrenze im Vergleich zur Färbung mit Coomassie BrilliantBlue R-250® etwa um den Faktor 10 sensitiver.

Nach der Elektrophorese wird das Gel zunächst dreimal für ca. 10 Minuten in bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend in der Färbelösung für 1 Stunde inkubiert. Um den Hintergrund aufzuhellen, und so eine optimale Beurteilung der angefärbten Proteinbanden sicherzustellen, wird das Gel mit Wasser gewaschen.

#### 4.3 Silberfärbung nach Schoenle [Schoenle et al., 1984]

Bei der Silberfärbung nach Schoenle [Schoenle et al., 1984] wird das Polyacrylamidgel mit Silberionen inkubiert. Diese binden an die Proteine und werden anschließend zu metallischem Silber reduziert, so daß die Gelbanden bräunlich angefärbt erscheinen. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode ist im Vergleich zur Coomassie BrilliantBlue Färbung um den Faktor 10 erhöht, so daß ~50 ng Protein pro Gelbande problemlos detektiert werden können.

Sollen SDS-Gele, die vorab bereits mit Coomassie BrilliantBlue R-250® angefärbt wurden, einer Silberfärbung unterzogen werden, muß zunächst eine vollständige Entfärbung des Gels erfolgen (s. III; 4.1). Wird das Polyacrylamidgel dagegen direkt nach Abschluß der Elektrophorese mit Silber angefärbt, muß zuerst eine Fixierung der Proteine im Gel erfolgen. Dazu wird das Gel für mindestens 1 h in Fixierlösung inkubiert.

##### Fixierlösung

Ethanol (96 %, vergällt, v/v)	30 %
Eisessig (v/v)	10 %

Für die anschließende Färbung erfolgt zunächst eine zweimalige Inkubation des Gels in 30 % Ethanol für jeweils 30 min, bevor gründlich mit Aqua bidest. gewaschen wird (dreimal 10 min). Darauf folgt eine 30-minütige Inkubation in der Silbernitratlösung. Vor der Entwicklung des Gels wird überschüssiges Silbernitrat durch kurzes Waschen mit

Aqua bidest. entfernt und das Gel anschließend bis zur gewünschten Farbintensität im Entwickler inkubiert. Die Färbereaktion wird durch 1%ige Essigsäure gestoppt und das Gel für ca. 15 min in dieser Lösung belassen.

#### **Silbernitratlösung**

Silbernitrat (w/v)	0,1	%
--------------------	-----	---

#### **Entwickler**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5	g
Formaldehyd (37 %)	220	µl
ad 200 ml mit Aqua bidest.		

Um den Hintergrund gegebenenfalls wieder etwas aufzuhellen, kann das Gel mit „Farmer’s Reducer“ behandelt werden. Dabei wird das metallische Silber wieder zu farblosen Ag<sup>+</sup> oxidiert [Rabilloud et al., 1988].

#### **Farmer’s Reducer**

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (w/v)	0,2	%
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (w/v)	0,01	%

## **4.4 Autoradiographie**

Mittels Autoradiographie können in spezifischen Phosphorylierungsreaktionen mit <sup>32</sup>P radioaktiv markierte Proteine z.B. in getrockneten Polyacrylamidgelen detektiert werden. Die β-Strahlung der radioaktiv markierten Proben bewirkt die Bildung von Silberkeimen in einem lichtempfindlichen Film. Diese Silberkeime werden durch das Einwirken von Entwicklerlösung zu elementarem Silber reduziert, so daß die Proteinbanden als Schwärzung auf dem Film erkennbar werden. Die Filmschwärzung ist nicht in allen Bereichen proportional zur Intensität der radioaktiven Strahlung, da durch das Einwirken hoher Strahlendosen eine Sättigung des Films erreicht werden kann.

Die Analyse der radioaktiven Proben erfolgt durch deren Exposition in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie auf KODAK X-Omat-Filmen. Effekte der störenden Streustrahlung werden weitgehend reduziert, indem die Exposition bei einer Temperatur von -80 °C erfolgt. Die Dauer der Belichtung richtet sich nach der Strahlungsintensität der Proben und liegt zwischen einigen Minuten und mehreren Tagen. Anschließend werden die Filme 2 Minuten entwickelt (GBX-Entwickler, Kodak) und nach kurzem Wässern ca. 2 Minuten fixiert (GBX-Fixierer, Kodak).

#### **4.5 PhosphoImager-Auswertung**

Radioaktive Proben können mit Hilfe eines PhosphoImagers (MolecularDynamics, Amersham Pharmacia) gleichzeitig quantitativ ausgewertet und bildlich dargestellt werden. Die Proben werden je nach Strahlungsintensität für einige Minuten bis zu einigen Tagen einem Screen (Amersham) exponiert. Die relativen Signalintensitäten können im PhosphoImager quantifiziert werden und sind innerhalb eines bestimmten Bereiches der Expositionszeit direkt proportional.

#### **5 Dokumentation und Auswertung von gefärbten Polyacrylamidgelen, Röntgenfilmen und Autoradiographien**

Sowohl die angefärbten Polyacrylamidgele als auch die Röntgenfilme der Western Blot Analysen und die Autoradiographien werden mit einem Desktop Scanner (GT-9600, Epson) aufgenommen und mit der Auswertungssoftware Phoretix (Biostep, Jahndorf) analysiert.

## 6 Immunologische Methoden

### 6.1 Western Blot

Bei dieser Methode werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Blotmembran übertragen und können auf dieser immunochemisch nachgewiesen und eindeutig identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde das Verfahren des Naß- oder Tankblottens verwendet.

#### 6.1.1 Proteintransfer

Der Transfer der Proteine erfolgt in dieser Arbeit auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN, Schleicher & Schuell) mit einer Porengröße von 0,1 µm. Der Aufbau des Blots wird wie folgt vorgenommen: Auf die Kathode der Apparatur (IdeaScientific) werden einige mit Blotpuffer getränkte Schwämme sowie drei bis vier Lagen ebenfalls in Puffer eingelegten Filterpapiers (Schleicher und Schuell, GB002) positioniert. Das Polyacrylamidgel wird auf den Filterpapieren plaziert und die für ca. 10 min in Blotpuffer äquilibrierte Membran exakt auf dem Gel ausgerichtet. Anschließend werden erneut einige Lagen Filterpapier und Schwämme aufgelegt, bevor die Anodenplatte eingesetzt wird. Beim Aufbau des Blots muß mit Hilfe einer ausreichenden Anzahl an Schwämmen und Filterpapieren ein gleichmäßig hoher Anpreßdruck aufgebaut werden, um einen homogenen und möglichst vollständigen Transfer der Proteine zu erreichen. Der Tank der Blotapparatur wird mit Blotpuffer gefüllt bis Gel und Membran komplett mit Flüssigkeit bedeckt sind. Der Methanolanteil des Blotpuffers wird je nach Größe des zu untersuchenden Proteins variiert. Für hochmolekulare Proteine wird 10 % Methanol eingesetzt, während für eher niedermolekulare Proteine mit 20 % Methanol gearbeitet wird.

#### Blotpuffer

Tris	0,025	M
Glycin	0,192	M
SDS (w/v)	0,1	%
Methanol (v/v)	10 oder 20	%

Der Transfer der Proteine erfolgt bei einer konstanten Spannung von 24 V für 1-2 h. Nach Beendigung des Proteintransfers wird die Membran kurz mit Aqua bidest. abgespült und kann dann bei Bedarf mit Ponceau S® (s. III; 6.1.2) gefärbt werden. Der immunochemische Nachweis der Proteine (s. III; 6.1.3) kann entweder direkt im Anschluß an das Blotten erfolgen oder die Membran bis zu ihrer weiteren Verwendung im getrockneten Zustand aufbewahrt werden.

#### **6.1.2 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S® nach Salinovich und Montelaro [Salinovich und Montelaro, 1986]**

Bei dieser Methode handelt es sich um eine reversible Anfärbung aller Proteine auf der Blotmembran, die durch Waschen mit Aqua bidest. oder Trispuffer leicht wieder entfernt werden kann [Salinovich und Montelaro, 1986]. Diese Methode wird hauptsächlich verwendet, um die Effizienz des Proteintransfers auf die Membran zu untersuchen. Die Nachweisgrenze dieses Farbstoffes liegt bei ca. 250-500 ng pro Proteinbande und ist damit im Vergleich zu den oben beschriebenen Färbemethoden für Polyacrylamidgele deutlich insensitiver.

Der Farbstoff Ponceau S® (Sigma) wird nach Herstellerangaben in Aqua bidest. angesetzt und die Membran für wenige Minuten in der Lösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff kann mit Wasser abgespült werden, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar sind.

#### **6.1.3 Western Blot-Entwicklung durch Antikörper-gebundene Peroxidase-Reaktion**

Der Nachweis eines spezifischen, durch das Verfahren des Western Blottings auf eine Nitrocellulose-Membran transferierten Proteins erfolgt durch Antikörperwechselwirkungen mit einer anschließenden Chemilumineszenzreaktion, die von der Horseradish Peroxidase katalysiert wird.

Bei diesem Nachweisverfahren bindet ein erster Antikörper direkt an das zu detektierende Protein, der zweite Antikörper, an den kovalent die Peroxidase gebunden ist, erkennt das F<sub>c</sub>-Fragment des ersten Antikörpers. Die Horseradish Peroxidase katalysiert die Bildung von Radikalen aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die wiederum in einem Substratmolekül Elektronen anregen können. Kehren diese Elektronen in ihren nicht angeregten Zustand zurück, wird die

freiwerdende Energie als Licht emittiert. Diese Lumineszenz kann auf einem Röntgenfilm, der auf die Blotmembran gelegt wird, sichtbar gemacht werden.

Für die Entwicklung wird die Membran nach dem Proteintransfer zunächst für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer für die verwendeten Antikörper optimalen Blockierungslösung inkubiert (Tab. III-1), um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran kurz mit TBST gewaschen. Das Tensid Tween®-20 wird der Pufferlösung zugegeben, um nicht spezifische Wechselwirkungen zwischen Antikörpern, Antigenen und Fremdmolekülen zu verhindern.

**TBS (Tris-gepufferte Salzlösung (*Tris buffered saline*))**

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM

**TBST (TBS plus Tween®-20)**

TBS + 0,05 % Tween®-20 (v/v)

Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Die Lösung, in der der jeweilige Erstantikörper angesetzt wird, und die Art der Inkubation sind je nach verwendetem Antikörper leicht unterschiedlich und können Tabelle III-1 entnommen werden.

**Tab. III-1:** Verwendete Erst- und Zweitantikörper und ihre Verdünnung.  
BSA: bovines Serumalbumin; TBS: Tris-gepufferte Salzlösung; %-Angaben in w/v

Nachweis von	Blockierungslösung	1. Antikörper	2. Antikörper
Caldesmon	1 % Bovines Serum Albumin (BSA) in TBST	Anti Caldesmon 1:2000 in TBST mit 1 % BSA	Donkey Anti Rabbit 1:15000 in TBST mit 5 % Milchpulver
Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK)	5 % Milchpulver in TBST	Anti MLCK 1:10000 in TBST	Donkey Anti Mouse 1: 20000 in TBST
p21-aktivierte Kinase (PAK)	5 % Milchpulver in TBST	Anti-Pak 1:100 in TBST	Donkey Anti-Rabbit 1:7500 in TBST mit 5 % Milchpulver



Nach der Erstantikörperreaktion wird die Membran erneut für ca. 30 Minuten mit TBST unter mehrfachem Wechseln des Puffers gewaschen und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Auch für die Verdünnung der Zweitantikörper werden unterschiedliche Lösungen, die sich für den jeweiligen Antikörper als optimal herausgestellt haben, verwendet (Tab. III-1). Anschließend wird erneut wie oben eine halbe Stunde lang mit TBST gewaschen.

Zur Entwicklung des Blots wird das *Enhanced Chemiluminescence*-System (ECL, Amersham oder Pierce) verwendet. Die beiden Komponenten des ECL werden zu gleichen Anteilen gemischt und die Membran je nach Herstellerangaben für 1 bzw. 5 min in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wird ein Röntgenfilm (Fuji RX) aufgelegt, wobei die Expositionszeit zwischen wenigen Sekunden und mehreren Minuten liegen kann. Sie richtet sich nach vielfältigen Parametern, wie z.B. der Gelbeladung und den verwendeten Antikörpern. Die Entwicklung und Fixierung des Films erfolgt für jeweils 2 Minuten (GBX-Entwickler bzw. GBX-Fixierer, Kodak).

#### 6.1.4 Entfernen von Antikörpern von Nitrocellulosemembranen

Es ist möglich, die auf der Nitrocellulosemembran gebundenen Antikörper zu entfernen und ein weiteres Protein auf derselben Membran mit einem zweiten Paar von Antikörpern nachzuweisen. Zu diesem Zweck wird die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Ablösepuffer inkubiert und anschließend für dreimal 5 min mit TBST gewaschen.

##### Ablösepuffer („*Stripping Buffer*“)

Glycin, pH 2,2	0,2	M
SDS (w/v)	0,1	%
Tween <sup>®</sup> -20 (v/v)	1	%

Da bei dieser Vorgehensweise neben den gebundenen Antikörpern auch die zum Blockieren verwendete Substanz abgelöst wird, muß eine erneute Entwicklung des Blots ab dem Blockierungsschritt erfolgen.

## 6.2 Immunpräzipitation

Auch bei der Methode der Immunpräzipitation wird die spezifische Bindung von Antikörpern an ein bestimmtes Protein genutzt, um dieses aus einem Proteingemisch gezielt zu isolieren. Dabei wird ein Zell- oder Gewebehomogenat zunächst unter nativen Bedingungen mit einem Antikörper gegen das zu untersuchende Protein für mehrere Stunden inkubiert, so daß eine Bindung des Antikörpers an das Antigen stattfinden kann. Anschließend folgt eine weitere Inkubationsphase in Gegenwart von Protein A-Sepharose. Protein A bindet spezifisch an Antikörpermoleküle, so daß bei dieser Bindung ein großer, stabiler Komplex aus zu untersuchendem Protein, Antikörper und der Protein A-Sepharose entsteht, der durch Zentrifugation vom Rest des Homogenats abgetrennt werden kann. Nach mehreren Waschrufen, die unspezifisch gebundene Proteine entfernen sollen, kann die Elution des gesuchten Proteins und des Antikörpers von der Protein A-Sepharose erfolgen und das Immunpräzipitat durch elektrophoretische Methoden (s. III; 3) und Western Blotting (s. III; 6.1) weiter untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK) und Caldesmon aus Gewebehomogenaten der *Taenia caeci* immunpräzipitiert. Für die MLCK-Immunpräzipitation werden sieben Fasern der *Taenia caeci* (200-250 µm Breite und 0,5-1 cm Länge) in einem Endvolumen von 500 µl in einem speziellen Homogenisationspuffer auf Eis aufgearbeitet. Dieser Puffer enthält neben Detergenzien zum Aufbrechen der Zellmembranen sowohl Kinase- als auch Phosphataseinhibitoren, um den Phosphorylierungszustand der Proteine während der Aufarbeitung stabil zu halten.

### Homogenisationspuffer (pH 7,4)

Na <sub>4</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	50 mM
NaF	100 mM
NaCl	300 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	10 mM
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
EGTA	10 mM
EDTA	2 mM
NP-40 (Nonidet P-40, v/v)	1 %
Okadainsäure	10 nM

Nach einer 30- bis 60-minütigen Extraktionsphase bei 4 °C wird das Homogenat zentrifugiert (20 Minuten, 21000 × g, 4 °C) und der Überstand für 2 Stunden mit 7,2 µg anti-MLCK Antikörper [de Lanerolle et al., 1991] auf einem Rolltaumelschüttler (RM5 Assistent, Merck) bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden 100 µl einer 50 %igen Protein A-Sepharose-Lösung in TBS mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> hinzugegeben und für weitere 1,5 Stunden bei 4 °C mit permanenter Durchmischung inkubiert. Der Sepharose-Komplex wird durch kurzes Zentrifugieren (10-15 sec, 21000 × g, 4 °C) pelletiert und der Überstand verworfen. Die anschließenden Waschschrte werden wie folgt durchgeführt: Der Waschpuffer wird auf das Sepharosepellet gegeben und durch 1-2-minütiges Schwenken des Reaktionsgefäßes mit dem Pellet durchmischt. Nach erneutem Abzentrifugieren des Sepharose-Komplexes und Entfernen des Überstandes erfolgt der nächste Waschschrte. Das Sepharosepellet wird insgesamt sechs Waschschrten unterzogen: zweimal mit dem Homogenisationspuffer, zweimal mit Waschpuffer 1 und zweimal mit Waschpuffer 2.

#### **Waschpuffer 1**

Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
NaCl	1 M

#### **Waschpuffer 2**

Tris-HCl, pH 7,5	5 mM
------------------	------

Für die anschließende Elution werden 150 µl Elutionspuffer auf die Sepharose gegeben und 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation kann der Überstand, der nun das eluierte Protein enthält, abgenommen werden. Dieser Elutionsschrte wird zweimal durchgeführt und die Eluate zusammengeführt. Das Eluat wird mit Hilfe einer SpeedVac (Univapo 100H, UniEquip) aufkonzentriert, mit 35 µl Probenpuffer versetzt und zur weiteren Analyse des isolierten Proteins mittels Gelelektrophorese und Western Blotting komplett auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### **Elutionspuffer**

SDS (w/v)	0,25 %
DTT	50 mM

#### **Probenpuffer**

Glycerol (v/v)	10 %
Tris-HCl, pH 6,7	100 mM
Bromphenolblau (w/v)	0,01 %

Für die Isolierung des Caldesmons aus den Gewebehomogenaten hat es sich in diversen Vorversuchen als nahezu unmöglich herausgestellt hat, das Caldesmon ohne Verunreinigung mit MLCK zu präzipitieren. Um eine möglichst saubere Präparation des Caldesmons zu ermöglichen, wird daher zunächst die MLCK möglichst vollständig aus dem Homogenat herausgefällt, um dann anschließend eine Caldesmon-Immunpräzipitation durchzuführen. Dazu wird die Gewebemenge im oben beschriebenen Protokoll auf drei Fasern reduziert und der eingesetzte MLCK-Antikörper auf 10,8 µg erhöht. Die anschließende Immunpräzipitation des Caldesmons wird mit leichten Abänderungen ebenfalls nach dem oben geschilderten Protokoll durchgeführt: Nachdem die MLCK aus dem Homogenat entfernt wurde, wird dieses mit 41 µg eines Affinitäts-gereinigten Antikörpers gegen Caldesmon für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation mit der Protein A-Sepharose erfolgt wie oben dargestellt. Das Sepharosepellet wird bei der Caldesmonimmunpräzipitation je zweimal mit den Waschpuffern 1 und 2 gewaschen. Elution, Aufkonzentrierung und Analyse des isolierten Proteins erfolgen wie für die MLCK beschrieben.

#### **7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford [Bradford, 1976]**

Das Verfahren der quantitativen Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976] beruht auf der spezifischen Anlagerung des Farbstoffes Coomassie BrilliantBlue G-250® an Proteine und Peptide, wobei die rote Farbe des in Phosphorsäure gelösten Farbstoffes in Blau umschlägt. Dieser Farbumschlag bewirkt eine erhöhte Absorption von Licht der Wellenlänge 595 nm. Die Extinktion der Proteinlösung wird photometrisch im Vergleich zu einer BSA-Kalibrationsreihe bestimmt. Der Vorteil

dieser Methode beruht darauf, daß äußerst geringe Proteinmengen zur Bestimmung der Konzentration ausreichen. Dennoch treten in einigen Fällen Ungenauigkeiten auf, da die Extinktion der Proteinlösung sehr stark vom Anteil der aromatischen Aminosäuren im zu bestimmenden Protein abhängt.

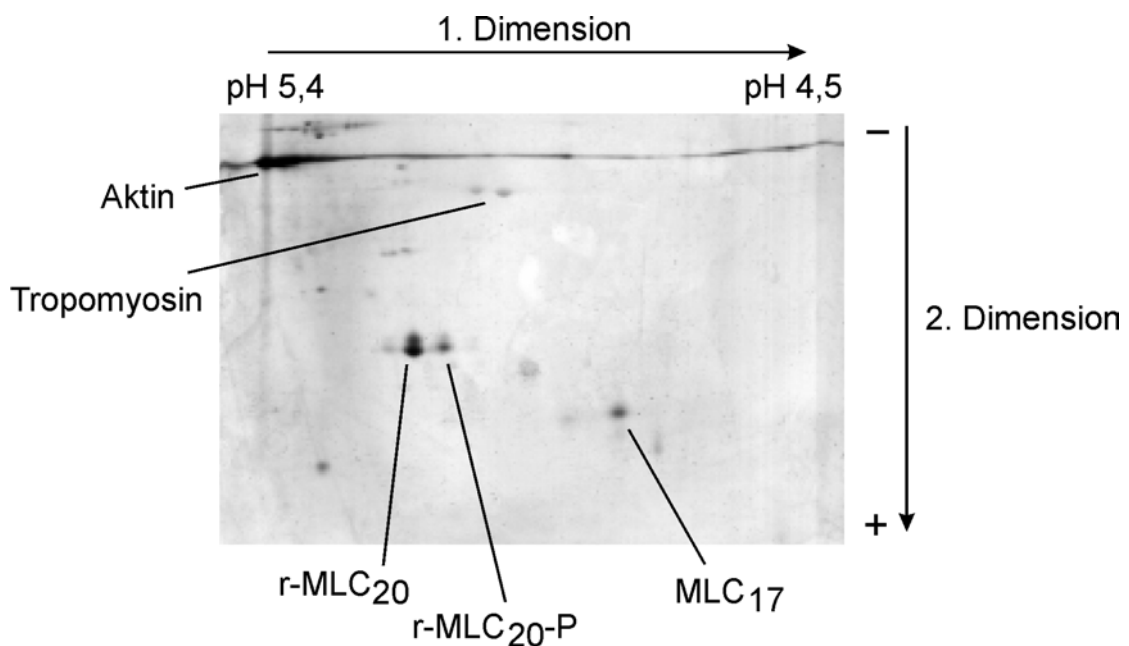
Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Proben bzw. die Kalibrierungslösungen im Verhältnis 1:100 mit Aqua bidest. verdünnt und mit dem Bradford Reagenz (BioRad Protein-Assay®) auf eine Endverdünnung von 1:1000 gebracht. Das Bradford Reagenz wird als Fertigreagenz verwendet, das vor der Anwendung mit Aqua bidest. angesetzt werden muß (je 200 µl Bradford Reagenz + 700 µl Aqua bidest.). Es werden jeweils drei unabhängige Konzentrationsbestimmungen einer Probe vorgenommen. Die Farbreaktion des Reagenz ist zeitabhängig und nur 10-30 Minuten nach dem Mischen mit der Proteinlösung stabil. Als Kalibrationskurve wird eine Verdünnungsreihe einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) von 0-8 µg Protein/ml verwendet. Die Pufferzusammensetzung der Kalibrierungsproben und der zu messenden Proteinproben ist identisch. Die Messung der Proben erfolgt bei einer Wellenlänge von 595 nm (DU 640 Spektrophotometer, Beckmann).

#### **8 Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der r-MLC**

Die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II während der Kontraktion der glatten Muskulatur führt durch den zusätzlichen Phosphatrest an Serin 19 des Proteins zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes (pI) des Moleküls von 5,05 der unphosphorylierten Form um 0,08 pH-Einheiten auf 4,97 der monophosphorylierten Form [Silver und Stull, 1982]. Bei einer zusätzlichen Phosphorylierung des Threonin 18 kommt es zu einer weiteren Verschiebung des pI's.

Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der r-MLC werden die Muskelfasern der *Taenia caeci* isometrisch auf einem U-förmig gebogenen, inerten Metalldraht mit Cyanacrylat Klebstoff (Superattak®, Firma Loctite) befestigt, während die Ringe der *A. carotis communis* des Kaninchens auf eine der Meßapparatur nachempfundenen Halterung aufgezogen werden und dort auch vorgedehnt werden können. Zum gewünschten Zeitpunkt wird das Gewebe in eiskalter 15 %iger Trichloressigsäure (TCA, w/v) fixiert. Sämtliche in der Zelle ablaufenden Enzymreaktionen werden dabei durch Denaturierung der Enzyme gestoppt, so daß keine weitere Phosphorylierung und auch

keine Dephosphorylierung der r-MLC stattfindet. Die Fixierungslösung enthält außerdem 5 % Natriumpyrophosphat (w/v), das ebenfalls weitere Dephosphorylierungen verhindert. Die Präparate werden anschließend von der Halterung abgeschnitten, wobei darauf zu achten ist, daß kein Klebstoff am Gewebe haften bleibt. Anschließend erfolgt die Analyse der Proben mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese. Die Präparate werden dazu zunächst in Glashomogenisatoren (Tissue grind micro, Typ 885470, Firma Kontes) in IEF-Probenpuffer aufgearbeitet und nach einer rund einstündigen Extraktion bei Raumtemperatur abzentrifugiert (20 min, 14000 rpm, RT). Die zweidimensionale Gelelektrophorese und die abschließende Silberfärbung erfolgen wie beschrieben (s. III; 3.3 bzw. 4.3). In Abbildung III-4 ist ein typisches Gel zur Analyse der r-MLC-Phosphorylierung dargestellt.



**Abb. III-4:** Silberfärbung eines SDS-Geles nach zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Aufgetragen ist das Gewebehomogenat von zwei Triton-permeabilisierten *Taenia caeci*-Fasern nach submaximaler Stimulierung der Präparate mit pCa 6,20. Angegeben sind für die erste Dimension der Verlauf des pH-Gradienten und für die zweite Dimension Anode und Kathode.

r-MLC<sub>20</sub>: regulatorische leichte Kette des Myosins II (20 kDa); MLC<sub>17</sub>: essentielle leichte Kette des Myosins II (17 kDa)

Für die Auswertung des Phosphorylierungsgrades werden die gefärbten Gele mit einem Durchlichtscanner (GT-9600, Epson) mit der Software Epson Twain Pro aufgenommen und mit dem Programm Phoretix ausgewertet. Die Anteile an phosphorylierter r-MLC werden als Prozent der Gesamtmenge der r-MLC angegeben:

$$r-MLC_{\text{phos.}} (\%) = (r-MLC_{\text{phos.}} / (r-MLC_{\text{unphos.}} + r-MLC_{\text{phos.}})) * 100$$

## 9 Analyse der Proteinphosphorylierung in Geweben mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP

Um den Phosphorylierungszustand von Proteinen in einem Gewebepräparat untersuchen zu können, bedient man sich in der Regel der Inkorporation des  $\beta$ -Strahlers  $^{32}\text{P}$ , die mit Hilfe von Autoradiographien (s. III; 4.4) sichtbar gemacht werden kann. Zu diesem Zweck wird das Muskelgewebe in einer Lösung, die radioaktiv markiertes [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP enthält, inkubiert. Die Kinase- und Phosphatasereaktionen werden anschließend rasch terminiert und der Phosphorylierungsgrad der Proteine analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Phosphorylierungsgrad der durch Immunpräzipitation aus Triton-gehäuteter *Taenia caeci* des Meerschweinchens isolierten Proteine MLCK und Caldesmon unter relaxierten Bedingungen in An- und Abwesenheit der p21-aktivierten Proteinkinase 1 (PAK1) untersucht. Die gehäuteten Muskelfasern werden in Relaxationslösung in einem Endvolumen von 250–400  $\mu\text{l}$  in Anwesenheit von 500  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (spezifische Aktivität  $\sim 5000$  Ci/mmol) und 64  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  PAK1 für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Relaxationslösung wird für die radioaktiven Experimente leicht modifiziert: die ATP-Konzentration wird auf 3 mM verringert, um die im Sinne einer kompetitiven Reaktion benötigte Menge an [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP möglichst niedrig zu halten. Dementsprechend wird die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration der Lösung auf 5,5 mM reduziert. Außerdem wird das Kreatinphosphat, das normalerweise für die Regenerierung von ATP zur Verfügung gestellt wird, aus der Lösung entfernt. Der Unterschied in der Ionenstärke, der vor allem durch das fehlende ATP entsteht, wird durch eine entsprechende Konzentration an KCl ersetzt.

#### **Relaxationslösung für radioaktive Experimente**

Imidazol	20 mM
Na <sub>2</sub> ATP	3 mM
EGTA	4 mM
MgCl	5,5 mM
NaN <sub>3</sub>	1 mM
KCl	30 mM

Die Lösung wird als doppelt konzentrierte Stammlösung angesetzt und der pH-Wert auf pH 6,7 bei 23 °C eingestellt. Für die Durchführung der Experimente wird die Stammlösung mit einer Endkonzentration von 2 mM DTT und 1 µM Leupeptin versetzt. Die Kreatinkinase, die in den Lösungen für Triton-gehäutete Gewebe normalerweise enthalten ist, wird für die radioaktiven Experimente nicht zugegeben, damit während der Inkubationszeiten kein nicht-radioaktives ATP neu gebildet werden kann. Da die Kreatinkinase als Protein jedoch auch stabilisierende Funktionen in der Lösung übernimmt, wird den Reaktionslösungen statt dessen BSA in einer Endkonzentration von 0,1 % (w/v) zugesetzt.

Am Ende der Inkubationszeit werden sämtliche Enzymreaktionen im Gewebe rasch terminiert. Dies geschieht bei diesem experimentellen Ansatz durch rasches Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff, um eine native Konformation der Proteine, die für die anschließende Immunpräzipitation wichtig ist, so weit wie möglich aufrecht zu erhalten. Da es sich bei den Triton-gehäuteten Fasern der *Taenia caeci* um sehr kleine Präparate handelt, ist ein direktes Einfrieren in flüssigem Stickstoff nur schwer möglich. Die Proben werden daher zunächst in ein Reaktionsgefäß, welches in einem Ethanol-Trockeneisgemisch vorgekühlt wird, gegeben und unmittelbar danach in diesem Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff überführt.

Die weitere Analyse der Gewebepreparate erfolgt über Immunpräzipitation (s. III; 6.2), elektrophoretische Auftrennung auf 10 %igen Polyacrylamidgelen (s. III; 3.1) und anschließende Autoradiographie (s. III; 4.4).



#### **10 Statistik**

Die Evaluierung der Meßdaten wird mit dem Programm GraphPad Prism (Version 2.01, 1996, 32bit Version für Windows 95 und NT, GraphPad Software, Inc.) vorgenommen.

Alle Daten sind, wenn nicht anders angeführt, als Mittelwerte  $\pm$ SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus n Experimenten angegeben.

Zum statistischen Vergleich wird eine Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt von einem Newman-Keuls Test. Als Signifikanzniveau wird  $P < 0,05$  festgesetzt.

## 11 Bezugsquellennachweis

<b>Stoff</b>	<b>Firma</b>
<b>11.1 Chemikalien</b>	
β-Escin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
<u>A</u> cteton	Baker
Acrylamid, 40 %ige Lösung	Pharmacia Biotech (Amersham Pharmacia) Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel30)	
Agarose	Serva
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampholine 4,5-5,4	Pharmacia Biotech (Amersham Pharmacia)
L-Ascorbinsäure	Sigma
<u>B</u> ioSafe®-Coomassie (G-250)	BioRad
BioRad Protein Assay	BioRad
Bisacrylamid	Roth
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto- pyranosid (X-gal)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA (Albumin bovine Fraction V)	Serva
<u>C</u> alciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ), Fixanal	Riedel-de-Häen
Coomassie BrilliantBlue R-250®	Serva
<u>D</u> imethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
<u>E</u> ssigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol DAB 96%	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), > 99 %	Fluka
<u>G</u> BX Entwickler (für Röntgenfilme)	Kodak (Sigma)
GBX Fixierer (für Röntgenfilme)	Kodak (Sigma)
D(+)-Glukose	Merck
Glutaraldehyd, 25 % aqueous solution, Grade II	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
<u>H</u> alothan	Zeneca
Harnstoff	BioRad
HCl Titrisol	Merck

Hexokinase	Boehringer, Mannheim (Roche)
HEPES (N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure)	Sigma
<b>I</b> midazol	Sigma
<b>K</b> aliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(II) ( $K_4Fe(CN)_6$ )	Sigma
Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $K_3Fe(CN)_6$ )	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Serva
Ketanest S	Parke-Davis GmbH
KOH (max.0,00004 % Ca)	Merck
KOH Titrisol	Merck
Kreatinkinase	Boehringer, Mannheim (Roche)
Kreatinphosphat	Boehringer, Mannheim (Roche)
<b>L</b> eupeptin	Sigma
<b>M</b> agermilchpulver	Heirler
Magnesiumacetat	Sigma
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )	Merck
Methanol	Roth
Methansulfonsäure (HMS)	Fluka
<b>N</b> , N, Dimethylformamid	Fluka
N,N,N',N' Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth
NaOH Titrisol	Merck
NP-40 (Nonidet P-40)	Boehringer, Mannheim (Roche)
Natriumazid ( $NaN_3$ )	Sigma
Natriumcarbonat ( $Na_2CO_3$ )	Fluka
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Merck
Natriummolybdat ( $Na_2MoO_4$ )	Sigma
Natriumpyrophosphat ( $Na_4O_7P_2$ )	Fluka
Natriumsulfit ( $Na_2S_2O_3$ )	Merck
o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)	Sigma
<b>P</b> BS-Tabletten	Gibco/Invitrogen
Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ )	Merck
Ponceau S®	Sigma
Protein A-Sepharose™ CL-4B	Pharmacia Biotech (Amersham Pharmacia)
<b>R</b> ompun (2 %)	BayerVital
<b>S</b> accharose	Merck
Silbernitrat ( $AgNO_3$ )	Merck

Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth
Triton X-100	Fluka
Tween® 20	Serva

### 11.2 Agonisten und Inhibitoren

9,11-Dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methano-epoxyprostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub> (U-46619)	Sigma
Histamin	Sigma
Microcystin-LR	Sigma
ML-9 (1-(5-Chloronaphthalen-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepin)	Sigma
Okadainsäure (high purity)	Alexis Biochemicals
Phenylephrin	Sigma
Wortmannin	Sigma

### 11.3 Nucleotide

Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer, Mannheim (Roche)
[ $\gamma$ <sup>32</sup> P] ATP (> 5000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic
Guanosin-3'-5'-cyclic-monophosphat, 8-(4-chloro-phenylthio)-triethylamoniumsalsz (8-pCPT-cGMP)	Calbiochem

### 11.4 Medien und Zusätze

1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Vitamin D3)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) w/o Na-Pyruvat, w Glukose 4500 mg/l	Gibco/Invitrogen
Elastase (276 U/mg, from porcine pancreas)	Serva
fötales Kälberserum (FCS), Lot.# 78H3355	Sigma
HEPES-Puffer, 1 M	Gibco/Invitrogen
Penicillin-Streptomycin	Gibco/Invitrogen
<i>all-trans</i> Retinolsäure	Sigma

### 11.5 Molekulargewichtsmarker

SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker	Novex
----------------------------------	-------

#### 11.6 Antikörper

Donkey Anti-Rabbit IgG (Peroxidase konjugiert Nr. 711-035-152, Charge 45344)	Jackson Immuno Research (Dianova)
Donkey Anti Mouse IgG (Peroxidase konjugiert Nr.715-035-150, Charge 45187)	Jackson Immuno Research (Dianova)
Anti MLCK (Klon K36 Maus, monoklonal) Anti $\alpha$ -PAK (C-19, Charge J089 Kaninchen, polyklonal)	Sigma Santa Cruz

Der Antikörper gegen Caldesmon, der für den immunologischen Nachweis auf Nitrocellulosemembranen verwendet wird, wurde von Dr. W. Lehmann (Boston-University) zur Verfügung gestellt.

Der MLCK-Antikörper für die Immunpräzipitation des Proteins wurde von Dr. P. de Lanerolle (Chicago-University) zur Verwendung überlassen. Um Caldesmon aus den Muskelpräparaten mittels Immunpräzipitation zu isolieren, wurde ein Affinitäts-gereinigter Antikörper unserer Arbeitsgruppe benutzt.

## **IV Ergebnisse**

### **A Kultur und adenovirale Infektion intakter glattmuskulärer Gewebe**

Um die Bedeutung der p21-aktivierten Proteinkinase 1 an intaktem glatten Muskelgewebe durchführen zu können, soll die Methode der adenoviral vermittelten Überexpression von Proteinen verwendet werden. Die hier durchgeführten Versuchsreihen dienen zunächst sowohl der Charakterisierung der Infektionseffizienz des verwendeten experimentellen Systems als auch der Optimierung der Kontraktilitäts-erhaltung der Muskelpräparate. Alle Untersuchungen finden in gepaarten Experimenten statt, so daß eventuelle Präparationsbedingte Einflüsse auf die Gewebe vergleichbar sind. Auch die Medienzusammensetzung ist bezüglich der Konzentration an Zusätzen bzw. bezüglich des Virentiters in parallelen Ansätzen gleich. Die Kraftmessungen finden bei Raumtemperatur (23 °C) unter permanenter Begasung der Meßlösungen mit Sauerstoff statt.

#### **1 Charakterisierung der intakten A. carotis communis des Kaninchens bezüglich der Stimulierung mit Agonisten**

Um die im weiteren Verlauf der Experimente nötigen Kontraktionsstudien durchführen zu können, muß zunächst ein reproduzierbarer Stimulus für die Kraftmessungen etabliert werden. Für die Stimulation von glatter Gefäßmuskulatur stehen prinzipiell verschiedene Agonisten zur Verfügung, die unter Verwendung unterschiedlicher Signaltransduktionswege eine Kontraktion des Gewebes induzieren. Dazu gehören unter anderem hohe Konzentrationen an Kaliumionen, die über Depolarisation der Membran eine Kontraktion auslösen. Der  $\alpha_1$ -adrenerge Agonist Phenylephrin z.B. erhöht über Aktivierung des IP<sub>3</sub>-Signalweges (s. I; 2.1.2) die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und führt damit zur Kontraktion.

Es werden verschieden Agonisten eingesetzt und die entwickelten Kontraktionskräfte miteinander verglichen. Dazu werden Muskelringe der A. carotis communis in die Meßapparatur eingespannt und für ca. 30 Minuten in PSS äquilibriert. Anschließend wird eine Kontraktion mit 100 µM Phenylephrin induziert, die als Referenzkontraktion dient. Nach Relaxation der Präparate in PSS und Auswaschen des Agonisten durch mehrfache Lösungswechsel, wird eine zweite Kontraktion mit einem anderen Agonisten induziert.

Das Kraftniveau dieser zweiten Kontraktion wird als Prozent der ersten Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  Phenylephrin ausgewertet.

Die höchsten Kraftniveaus können dabei mit einer kombinierten Stimulierung aus Depolarisation mit 80 mM  $\text{K}^+$  und dem Agonisten Histamin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Vergleichbar hohe Kräfte induziert Histamin (100  $\mu\text{M}$ ) alleine. Weitere getestete Agonisten wie Phenylephrin (10  $\mu\text{M}$ ) und das Thromboxan-Analog U-46619 (10  $\mu\text{M}$ ), sowie die einfache Depolarisation mit 80 mM  $\text{K}^+$  bei 37 °C Reaktionstemperatur lösen deutlich geringere Kontraktionen aus. Tabelle IV-1 zeigt die beim jeweiligen Stimulus entwickelten Kontraktionskräfte bezogen auf die Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  Phenylephrin.

In den weiteren Versuchen wird  $\text{K}^+$ -PSS ( $\text{K}^+$  80 mM) mit 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  Histamin zur Induktion der Kontraktionen verwendet, abgekürzt K+H 10 bzw. K+H 100.

**Tab. IV-1:** Relativer Vergleich der verschiedenen Agonisten bezogen auf die mit 100  $\mu\text{M}$  Phenylephrin (PE) entwickelte Kontraktion. Die Präparate werden dem im Text beschriebenen Meßprotokoll unterzogen. Angegeben sind die Kräfte in % der ersten Stimulierung mit 100  $\mu\text{M}$  Phenylephrin.

Stimulus	Kraft (% von PE 100 $\mu\text{M}$ )	
Phenylephrin 100 $\mu\text{M}$	100 %	n=8
Phenylephrin 10 $\mu\text{M}$	91,0 $\pm$ 5,3 %	n=6
Histamin 100 $\mu\text{M}$	232,0 $\pm$ 17,0 %	n=2
$\text{K}^+$ 80 mM/Histamin 100 $\mu\text{M}$	258,3 $\pm$ 20,1 %	n=8
$\text{K}^+$ 80 mM (bei 37 °C)	53,5 $\pm$ 6,5 %	n=4
U-46619 10 $\mu\text{M}$	45,8 $\pm$ 11,5 %	n=4

## 2 Gewebekultur von intakten Muskelringen der *A. carotis communis* des Kaninchens

### 2.1 Bedeutung der Gewebekultur für die Kontraktilität

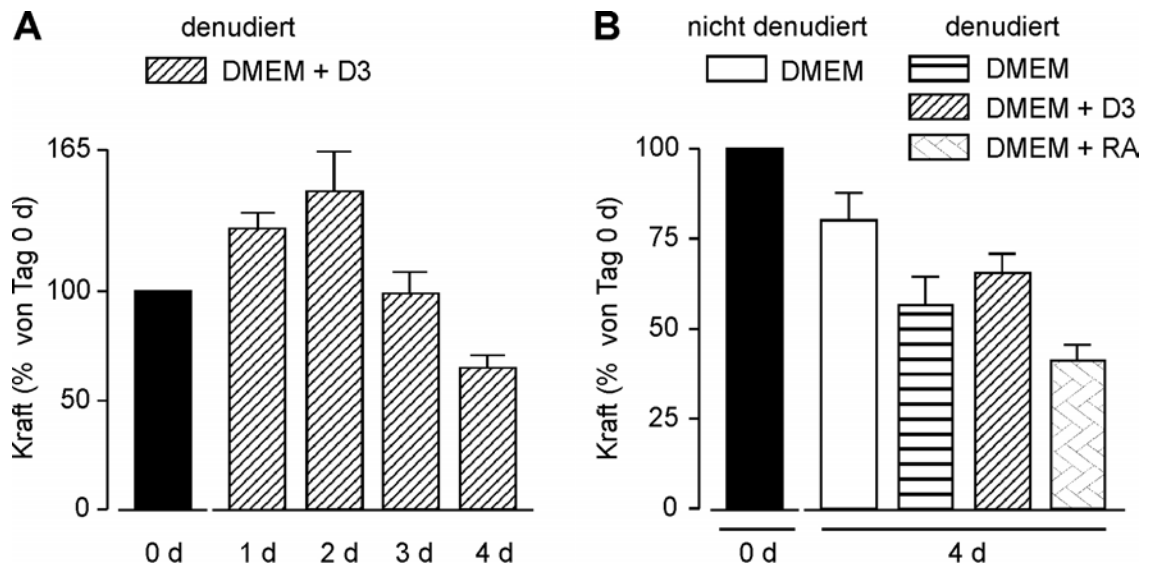
Die Kultur glattmuskulärer Gewebe stellt in der Regel einen Kompromiß von verschiedenen Interessen dar. Auf der einen Seite ist es meistens erwünscht, das Gewebe so lange wie möglich zu kultivieren, auf der anderen Seite führt die Gewebekultur zu Einbußen vor allem bei der Erhaltung der Kontraktilität der Gewebe. Da im Rahmen dieser Arbeit die Infektion von glattem Muskelgewebe durchgeführt wird und es dafür unumgänglich ist, die Präparate für einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten, wird zunächst der Einfluß der Gewebekultur auf die Kontraktilität untersucht.

Die *A. carotis communis* wird wie in Kapitel III 1.3.1 beschrieben präpariert, wobei die Entfernung des Endothels in einzelnen Teilabschnitten des Gefäßes unterlassen wird. So kann untersucht werden, ob die Denudierung des Gefäßes Effekte auf die Kontraktilität und die Verhaltensweise in Kultur hat. Für die Kultur der Gewebe wird mit 2 % Penicillin-Streptomycin (PS) versetztes Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium (DMEM) verwendet. Als Zusatz wird dem Medium in zwei Versuchreihen 300 pg/ml 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Vitamin D3, kurz D3) oder 1 µM *all-trans* Retinolsäure (RA) zugegeben.

Für die Kraftmessungen werden schmale Ringe geschnitten und beginnend mit dem Tag der Präparation für einen Zeitraum von fünf Tagen täglich in die Apparatur eingespannt und kontrahiert. Nach der Befestigung der Präparate in der Apparatur erfolgt dabei zunächst eine Äquilibrationsphase von ca. 30 Minuten in PSS, bevor die Muskelringe mit K+H 10 bzw. K+H 100 stimuliert werden. Anschließend wird das Gefäß relaxiert und bis zum nächsten Tag erneut in Kultur genommen. Die bei der ersten Stimulierung mit K+H 100 erreichte Kraft wird als 100 % gesetzt und alle weiteren Kontraktionen auf diesen Wert normiert.

Abbildung IV-1 A zeigt exemplarisch den Kontraktionsverlauf der mit D3 inkubierten Muskelringe über einen Zeitraum von fünf Tagen, wobei der Tag der Präparation mit 0 d, der Tag der letzten Messung dementsprechend mit 4 d bezeichnet ist. Gezeigt sind nur die maximalen Stimulierungen mit K+H 100. Die genauen Meßwerte aller vier Versuchreihen sind in Tabelle IV-2 zusammengefaßt.





**Abb. IV-1:** Das Verhalten der Kontraktilität der intakten Muskelringe der A. carotis communis des Kaninchens über einen Kulturzeitraum von 5 Tagen.

**A** Graphische Darstellung des Kontraktionsverlaufes der mit Vitamin D3 kultivierten Präparate über einen Zeitraum von 5 Tagen (n=6). Angegeben sind die ermittelten Kräfte als % der maximalen Stimulierung mit K+H 100 am Tag der Präparation (0 d).

**B** Gegenüberstellung der Kontraktionskräfte am Tag 4 d unter den vier gewählten Meßbedingungen. Die Werte sind jeweils auf die in der gleichen Meßreihe am Tag 0 d gemessenen Kräfte prozentual bezogen (n=5-8).

D3: Vitamin D3; DMEM: Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium; RA: *all-trans* Retinolsäure

Unter sämtlichen hier gewählten Bedingungen verhält sich das Gewebe hinsichtlich seiner Kontraktilität relativ ähnlich (Abb. IV-1; A). Es kommt am Tag 1 d immer zu einer temporären Kontraktilitätssteigerung, die bis auf die mit RA behandelten Fasern bis zum Tag 2 d anhält. Beginnend mit Tag 3 d treten Einbußen der Kraftentwicklung auf, die sich bis zum letzten Tag der Messungen fortsetzen. Das Ausmaß des Kraftverlustes ist allerdings je nach Versuchsbedingung unterschiedlich. In den nicht denudierten Präparaten (Abb. IV-1; B und Tab. IV-2) bleibt die Kontraktilität mit ca. 80 % der Ausgangskraft am besten erhalten; von den denudierten Geweben verhalten sich die in DMEM und die mit D3 kultivierten Muskelringe sehr ähnlich und entwickeln am Tag 4 d noch 60-66 % der Kraft vom Tag der Präparation. In den mit RA behandelten Ringen ist der Kraftverlust am stärksten ausgeprägt. Am Tag 4 d entwickeln diese Präparate nur noch etwa 40 % der Originalkraft.

**Tab. IV-2:** Zusammenstellung des Kontraktionsverhaltens in allen vier Meßreihen über einen Kulturzeitraum von 5 Tagen. Alle Werte sind angegeben als % der Maximalkraft am Tag 0 d (n=5-8).

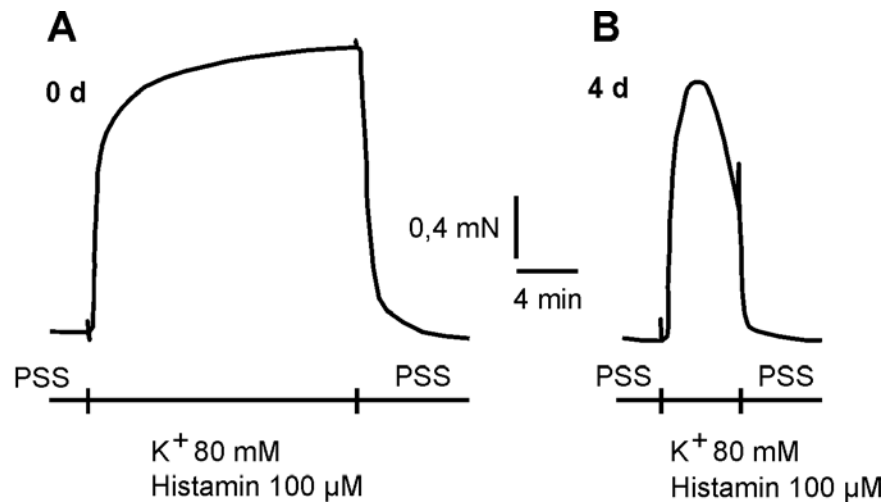
	<b>0 d</b>	<b>1 d</b>	<b>2 d</b>	<b>3 d</b>	<b>4 d</b>
<b>nicht denudiert</b>	100 %	100,2 ±9,2 %	160,3 ±12,5 %	93,3 ±8,0 %	80,5 ±7,6 %
<b>DMEM</b>	100 %	142,8 ±6,2 %	98,4 ±4,1 %	76,0 ±5,1 %	59,8 ±8,5 %
<b>D3</b>	100 %	128,5 ±7,9 %	146,5 ±18,2 %	98,2 ±10,3 %	66,2 ±5,2 %
<b>RA</b>	100 %	100,2 ±9,3 %	76,5 ±8,5 %	45,7 ±5,8 %	41,8 ±4,1 %

Das Verhältnis der submaximalen Stimulierung mit K+H 10 zur maximalen Stimulierung mit K+H 100 bleibt über den Zeitraum der Kultur konstant. Die mit K+H 10 entwickelte Kraft beträgt 63,2 ±6,5 % (Tag 0 d; n=9) bzw. 77,6 ±10,2 % (Tag 4 d; n=7).

Während der Kulturzeit ändert sich das Kontraktionsverhalten der Muskelpräparate nicht nur in Bezug auf die maximal entwickelten Kräfte, sondern auch hinsichtlich des Kontraktionsverlaufes. Zwei typische Originalregistrierungen nach Stimulierung des Gewebes mit K+H 100 an den Tagen 0 d und 4 d (Abb. IV-2) zeigen deutliche Unterschiede im Verlauf der Kontraktion. Das frisch präparierte Muskelgewebe reagiert auf den Stimulus mit einem schnellen Kraftanstieg und einer ausgedehnten Gleichgewichtsphase im Maximum der Kraft (Abb. IV-2; A). Am Tag 4 d erfolgt die Kontraktion immer noch sehr schnell und verläuft weiterhin steil, die Kraft wird an ihrem maximalen Punkt allerdings kaum mehr aufrecht erhalten. Es kommt zu einer vergleichsweise kurzen Kontraktion und einer zügig eingeleiteten Relaxation in Gegenwart des Agonisten (Abb. IV-2; B).

## 2.2 Einfluß von fötalem Kälberserum auf die Gewebekultur

Es ist allgemein bekannt, daß glatte Muskelzellen in Zellkultur ihren Phänotyp schnell vom kontraktilem zum synthetischen Zustand ändern und daß die Zugabe von fötalem Kälberserum (FCS) zum Kulturmedium diese Verschiebung beschleunigen kann [Chamley-Campbell und Campbell, 1981]. Es ist sehr plausibel, daß es über die im Serum



**Abb. IV-2:** Das Kontraktionsverhalten der intakten *A. carotis communis* des Kaninchens ändert sich im Lauf der Kultur.

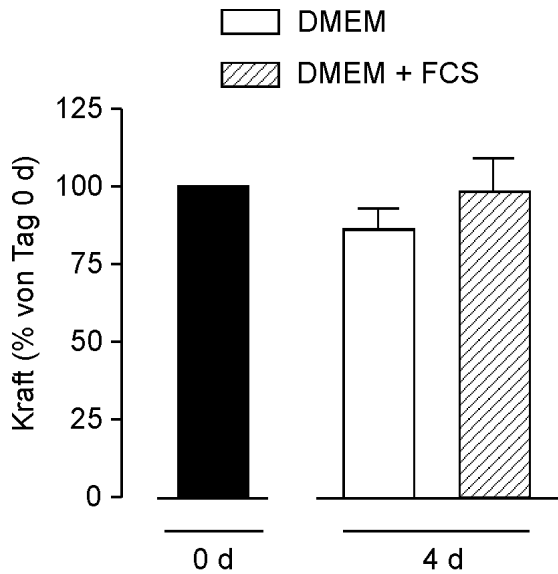
Originalregistrierungen der Kraft. Das Präparat wird in PSS in die Meßapparatur eingespannt und nach einer Äquilibrierungsphase von ca. 30 Minuten mit K+H 100 stimuliert.

**A** Typischer Kraftverlauf eines Muskelrings am Tag der Präparation (0 d).

**B** Kraftantwort auf K+H 100 nach fünftägiger Kultur (4 d).

enthaltenen Wachstumsfaktoren zur Stimulierung einzelner Signalkaskaden, welche die glatten Muskelzellen zur Proliferation anregen, kommt. Eine erhöhte proliferative Aktivität der glatten Muskelzellen ist in der Regel von einer verminderten Kontraktilität begleitet.

Da die Wachstumsfaktoren aber gleichzeitig regulierend auf die Expression der Vitronectinrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  einwirken können (s. I; 7.2.2) und diese Rezeptoren für eine erfolgreiche adenovirale Infektion von Zellen essentiell sind, muß in Hinblick auf die angestrebte Infektion der *A. carotis communis* des Kaninchens der Einfluß von FCS auf die Kultur dieses Gewebes untersucht werden. Zu diesem Zweck werden die Gefäße nach der in Kapitel III 1.3.1 beschriebenen Vorgehensweise präpariert, das Endothel entfernt und dünne Ringe geschnitten. Diese werden in DMEM mit 2 % Penicillin-Streptomycin in An- und Abwesenheit von 3 % FCS über einen Zeitraum von fünf Tagen kultiviert, wobei das Medium täglich gewechselt wird. Die Überprüfung der Kontraktilität erfolgt lediglich zu Beginn (0 d) und am Ende der Versuchsreihe (4 d), wobei die Kraft am Tag 0 d als Bezugswert dient. Als Stimulus wird auch hier K+H 100 verwendet.



**Abb. IV-3:** Der Zusatz von 3 % fötalem Kälberserum (FCS) zum Kulturmedium hat keinen Einfluß auf den Erhalt der Kontraktibilität. Ringe der *A. carotis communis* werden für einen Zeitraum von fünf Tagen in An- bzw. Abwesenheit von 3 % FCS kultiviert. Die am Tag 4 d gemessenen Kräfte sind angegeben als % der am Tag 0 d ermittelten Kontraktionswerte (n=6-7). DMEM: Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium

Die in Abbildung IV-3 dargestellten Daten zeigen, daß die ohne FCS kultivierten denudierten Ringe hier am Tag 4 d mit ca. 82 % eine deutlich höhere Maximalkraft entwickeln als die denudierten und in DMEM kultivierten Muskelpräparate aus der vorherigen Meßreihe (Abb. IV-1; B und Tab. IV-2). Der Vergleich der in An- und Abwesenheit von FCS kultivierten Gewebepreparate zeigt keinen Unterschied in dem entwickelten maximalen Kraftniveau. Die mit FCS behandelten Muskelringe kontrahieren am Tag 4 d auf ein Kraftniveau von gut 90 % und verhalten sich damit nicht signifikant verschieden von den Kontrollpräparaten.

### 3 Bedeutung potentiell infektionsverbessernder Methoden für die Kontraktibilität der *A. carotis communis* des Kaninchens

#### 3.1 Auswirkungen von Druckapplikation auf die Kontraktibilität

Viele Experimente zur adenoviralen Infektion von glatter Gefäßmuskulatur werden in der Literatur als Tierversuche durchgeführt, bei denen im lebenden Tier ein Gefäßabschnitt über eine Ligatur geschlossen wird und das Virus in dieses Gefäß injiziert wird. In der Regel erfolgt die Applikation des Virus dabei unter einem Druck, der dem natürlichen Blutdruck angepaßt wird. Die Druckanwendung soll den Experimentatoren zufolge die Effizienz der viralen Infektion verbessern, indem das Virus auf die Gefäßwand gedrückt

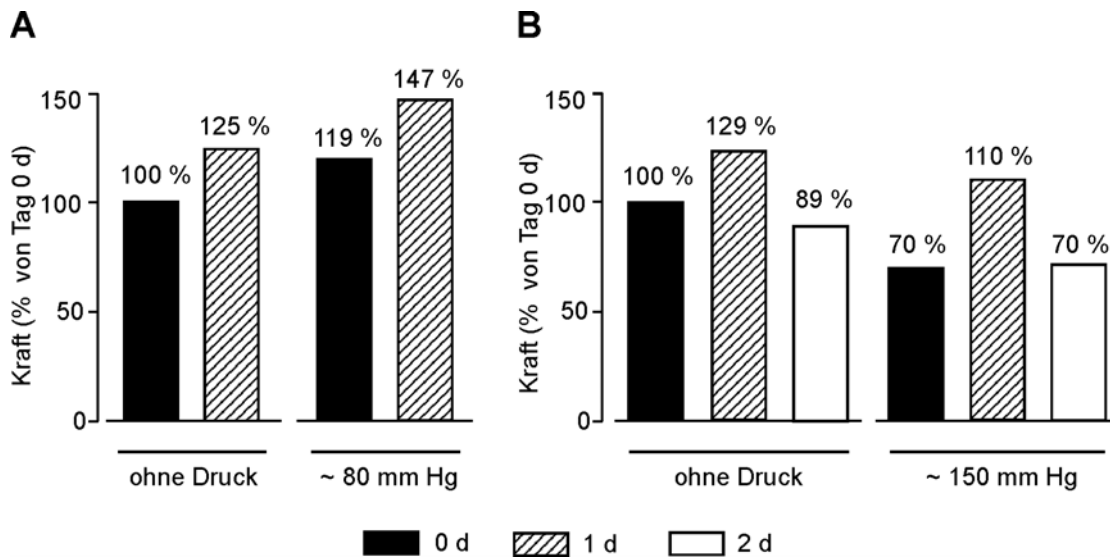
wird und so eventuell in tiefere Schichten des Gefäßes eindringen kann. Die meisten veröffentlichten Studien sind primär nicht am kontraktile Verhalten des Gewebes nach der Infektion interessiert, so daß wenige Daten über den Einfluß der Druckapplikation auf die Kontraktilität vorliegen. Aus eigener experimenteller Erfahrung ist allerdings gut bekannt, daß schon mäßige Überdehnung der Gefäßmuskulatur während der Präparation zu starken Einbußen der Kraftentwicklung führen kann. Es muß daher getestet werden, ob eine Druckapplikation auch *ex vivo* an isolierten Gefäßen prinzipiell möglich ist und ob der Erhalt der Kontraktilität für die Durchführung von aussagekräftigen und reproduzierbaren Kraftmessungen ausreichend ist.

Die Arterien werden zunächst wie in den Methoden unter III 1.3.2 beschrieben präpariert und anschließend an die Druckapplikation in schmale Ringe (~ 500 µm breit) geschnitten, mit denen die Kraftmessungen erfolgen. Da bei dieser Versuchreihe die erste Kraftmessung erst nach der Druckapplikation erfolgen kann, können die Kontraktionen der einzelnen Muskelringe nicht wie sonst üblich auf ihre erste Stimulierung vor der Behandlung bezogen werden. Dementsprechend werden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen mit den normal, also ohne Druck, präparierten Gefäßabschnitten verglichen.

Die A. carotis communis wird in zwei Versuchreihen unterschiedlich hohen Drücken von ca. 80 mm Hg und 150 mm Hg ausgesetzt. Der Druck wird durch Injektion von Kulturmedium (DMEM mit 2 % PS) aufgebaut und das Gefäß unter Druck für einen Zeitraum von ca. 2 Stunden ebenfalls in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit von 2 Stunden würde bei Infektionsversuchen der Kontaktzeit mit dem Virus entsprechen und ist für solche Experimente ein üblicher Zeitrahmen.

Die für die Druckapplikation *ex vivo* notwendige Präparation konnte reproduzierbar durchgeführt und auf ihre Auswirkungen auf die Kontraktilität der Muskelgewebe hin untersucht werden. Die Applikation von einem Druck von 80 mm Hg führt makroskopisch kaum zu einer Dehnung des Gefäßes, wogegen mit einem Druck von 150 mm Hg bereits makroskopisch eine Ausweitung des Präparates erreicht wird. Die entwickelten Kräfte in den mit einem Druck von 80 mm Hg behandelten Präparaten sind nicht signifikant verschieden von den Kontrollgeweben ohne Druck (Abb. IV-4; A) und zeigen auch die typische Kraftzunahme am Tag 1 d. Die Dehnung der Gefäße bei Applikation eines Drucks von 150 mm Hg dagegen führt vor allem am Tag der Druckbehandlung zu deutlichen Krafteinbußen (Abb. IV-4; B). Die Ringpräparate gewinnen nach einer Erholungsphase

von einem Tag ebenfalls einen Teil ihrer Kontraktilität zurück, erreichen allerdings nie das Kraftniveau der Kontrollpräparate.



**Abb. IV-4:** Die Applikation von hohem Druck mindert die Kontraktilität der intakten Gefäße.

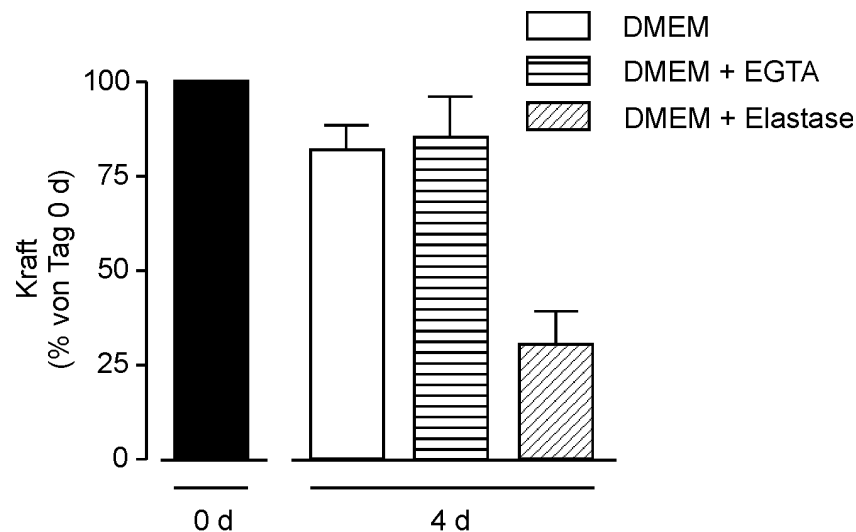
A. carotis communis des Kaninchens wird für einen Zeitraum von ca. 2 Stunden einem Druck von 80 (A) bzw. 150 mm Hg (B) ausgesetzt. Anschließend werden sowohl am Tag der Präparation als auch an darauffolgenden Tagen Kraftmessungen vorgenommen. Die Mittelwerte der Kräfte der beiden Versuchsreihen werden als % des Mittelwertes der ohne Druck präparierten Gefäße am Tag 0 d angegeben (n=4).

### 3.2 Behandlung mit dem Chelatbildner EGTA

Das Endothel des glatten Gefäßmuskels bildet zum Lumen hin die abschließende Zellschicht. Ebenso wie die Epithelien anderer Gewebe besteht das Endothel aus einer dichten Zellreihe, in der die einzelnen Zellen über *tight junctions* miteinander verbunden sind und den Transport durch diese Gewebeschicht streng kontrollieren. Die Präparation der A. carotis communis beinhaltet in dieser Arbeit zwar in den meisten Fällen die Entfernung des Endothels, doch kann nicht immer von einer vollständigen Denudierung der Gefäße ausgegangen werden. Die Behandlung mit EGTA, die zu einer reversiblen Erhöhung der epithelialen Permeabilität führen soll, könnte daher eine zusätzliche Methode zur Überwindung des Endothels bei der adenoviralen Infektion der A. carotis communis des Kaninchens darstellen. Zunächst muß jedoch im Sinne eines

reproduzierbaren Experiments das Kontraktionsverhalten des Muskelgewebes mit und ohne EGTA-Behandlung verglichen werden.

Die A. carotis communis wird zunächst präpariert (s. III; 1.3.1) und Kraftmessungen mit den Muskelringen durchgeführt. Diese Kontraktionen dienen als Vergleichswert der späteren Meßdaten. Die Präparate werden über Nacht in Kulturmedium (DMEM mit 2 % PS) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) aufbewahrt und am nächsten Tag (1 d) der Behandlung mit EGTA unterzogen. Die Ringe werden dafür 30 Minuten in Kulturmedium, das zusätzlich 8 mM EGTA enthält, im Brutschrank inkubiert; Kontrollpräparate werden ohne EGTA inkubiert. Die dem EGTA ausgesetzten Präparate können nach dieser Behandlung, die einen Entzug des extrazellulären Calciums darstellt, nicht direkt in normales Medium überführt werden, sondern müssen sukzessive zu normalen extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen gebracht werden. Daher werden diese Präparate zunächst für 15 Minuten in Ca<sup>2+</sup>-freier PSS inkubiert und anschließend die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in vier Schritten langsam auf 1 µM, 10 µM, 0,1 mM und 1,6 mM erhöht. Jeder Inkubationsschritt dauert dabei ca. 15 Minuten und erfolgt bei Raumtemperatur. Ist dieser Teil des Versuchs abgeschlossen, werden alle Muskelringe bis zum Tag 4 d in Kulturmedium (DMEM mit 2 % PS) im Brutschrank kultiviert und abschließend erneut auf ihre Kontraktilität hin untersucht.



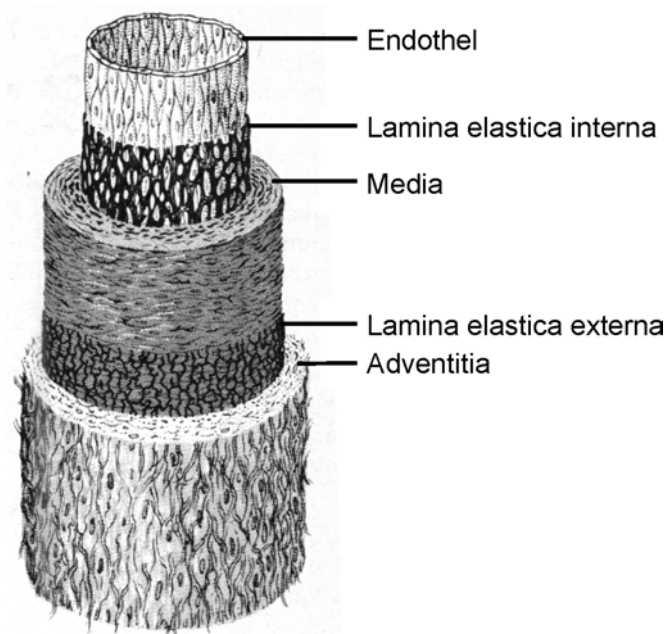
**Abb. IV-5:** Der Einfluß der Behandlung mit EGTA oder Elastase auf die Kontraktilität der intakten A. carotis communis des Kaninchens.

Die Präparate werden mit K+H 100 kontrahiert und anschließend wie in IV-A 3.2 bzw. IV-A 3.3 beschrieben mit EGTA bzw. Elastase behandelt. Die am Ende der Kultur am Tag 4 d erzielten Kräfte sind als % der ersten maximalen Stimulierung mit K+H 100 vor der Behandlung am Tag 0 d angegeben (n=4-8).

Wie in Abbildung IV-5 gezeigt, hat diese Behandlung mit EGTA in der oben geschilderten Weise keinen Einfluß auf die Kraftentwicklung der Muskelringe der A. carotis communis. In beiden Meßreihen werden mit relativen Kräften von ca. 82 % (Kontrolle) und 86 % (EGTA) vergleichbare Werte erzielt. Somit kann diese, hier für die glattmuskulären Gewebepreparate optimierte Methode für die im Weiteren durchgeführten Versuche auf ihre potentiell infektionsverbessernde Wirkung hin untersucht werden.

### 3.3 Behandlung mit Elastase

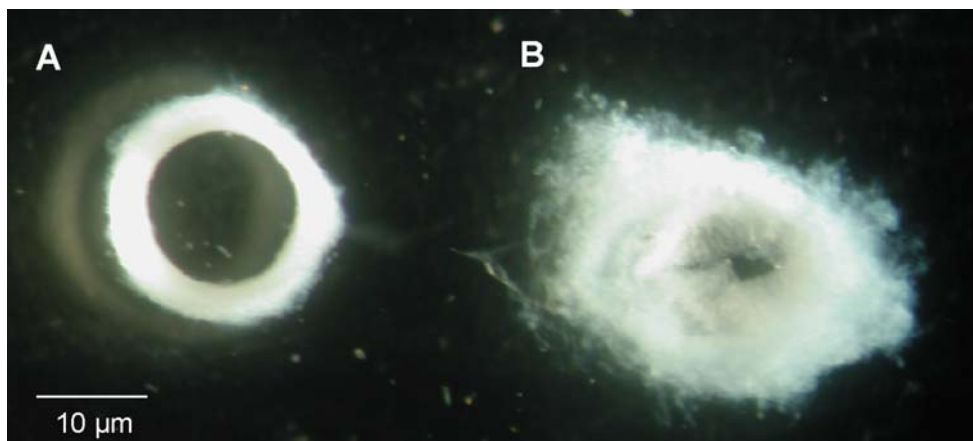
Anhand des in Abbildung IV-6 dargestellten Aufbaus der Gefäßwand wird offensichtlich, daß die innere Begrenzung des Gefäßes zum Lumen hin vom Endothel gebildet wird. Zwischen dem Endothel und der Media, der letztlich zu infizierenden glattmuskulären Zellschicht, liegt die sogenannte Lamina elastica interna. Der Hauptbestandteil dieser Gewebeschicht ist Elastin, das in Form von elastischen Lamellen vorliegt. Gaballa et al. [Gaballa et al., 1998] beschreiben, daß die Behandlung von A. carotis der Ratte mit geringen Konzentrationen an Elastase die Wasserpermeabilität der Gefäßwand erhöht. Parallel hierzu finden die Autoren eine verbesserte adenovirale Infektion der mit Elastase behandelten Präparate.



**Abb. IV-6:** Schematische Darstellung des Aufbaus der arteriellen Gefäßwand.  
Nach [Leonhardt, 1985].



Diese Methode soll auf ihre Anwendbarkeit für die in dieser Arbeit behandelte Fragestellung getestet werden. Der zeitliche Ablauf der Experimente folgt dem für die EGTA-Behandlung beschriebenen Muster. Die *A. carotis communis* des Kaninchens wird zunächst präpariert und einzelne Muskelringe einer Kontrollkontraktion mit K+H 100 unterzogen (0 d). Das Gewebe wird anschließend in Kultur genommen und am Tag 1 d mit Elastase behandelt. Dazu werden die einzelnen Ringe in Kulturmedium (DMEM mit 2 % PS) mit 34 U/ml Elastase für 30 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Präparate werden anschließend gründlich in Medium gewaschen und bis zur Charakterisierung der Kontraktilität am Tag 4 d in Medium im Brutschrank verwahrt. Die mit Elastase behandelten Muskelringe unterscheiden sich schon in ihrer äußeren Erscheinung drastisch von den Kontrollpräparaten (Abb. IV-7). Die gesamte Gefäßstruktur ist aufgelöst und das Bindegewebe umgibt das Gefäß in einer diffusen, unstrukturierten Form. Die Gefäßwand scheint keine Festigkeit mehr zu besitzen und das Lumen ist stark verkleinert.

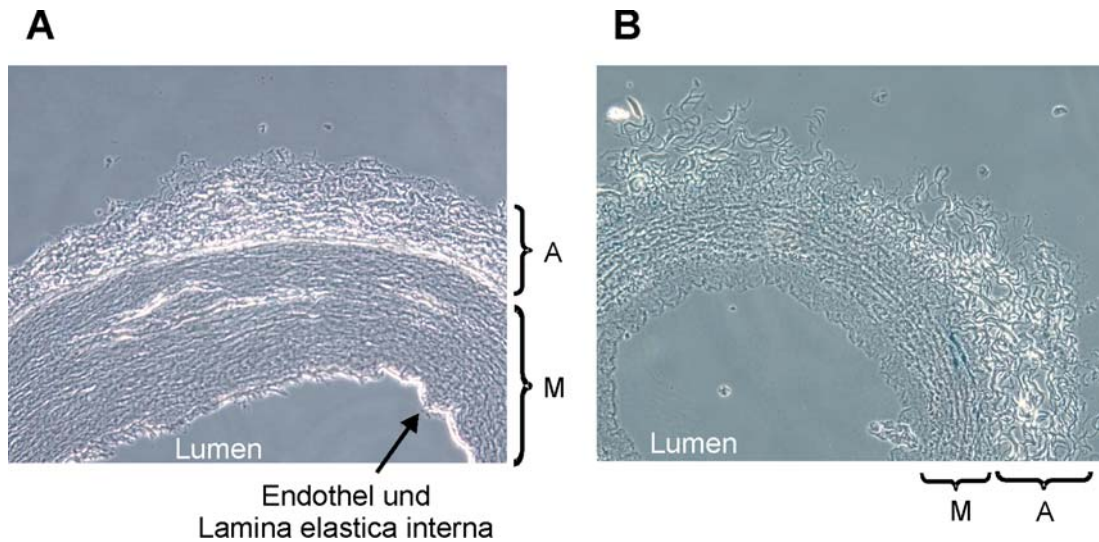


**Abb. IV-7:** Makroskopische Ansicht der *A. carotis communis* mit und ohne Behandlung mit Elastase.

**A** *A. carotis communis* der Ratte ohne Elastase-Behandlung am Tag 4 d der Kultur.

**B** Mit Elastase behandeltes Präparate am Tag 4 d.

Der Gewebeschnitt in Abbildung IV-8 zeigt noch einmal eindeutig die durch die Einwirkung der Elastase hervorgerufene veränderte Morphologie des Gefäßes, die auch makroskopisch schon beobachtet werden konnte. Sowohl das Endothel als auch die Lamina elastica interna fehlen komplett; die Media, die leicht aufgelockert erscheint, ist damit in diesen Gefäßen die innerste verbleibende Zellschicht.



**Abb. IV-8:** Ansicht eines Muskelrings mit und ohne Elastase-Behandlung.

**A** A. coronaris des Schweins ohne Elastase-Behandlung.

**B** A. carotis communis des Kaninchens nach der Behandlung mit Elastase.

Die Tatsache, daß die A. coronaris des Schweins deutlich größer ist als die A. carotis communis des Kaninchens spiegelt sich unter anderem direkt im Durchmesser der Media wider. A: Adventitia; M: Media

Phasenkontrast-Aufnahmen, 10fach vergrößert, Schnittdicke 25 µm

Diese phänotypischen Veränderungen spiegeln sich direkt im Kontraktionsverhalten der Präparate wider. Im Vergleich zur Ausgangskraft am Tag 0 d bleibt in den mit Elastase behandelten Ringen nur noch ca. 30 % der Kontraktilität erhalten (Abb. IV-5).

Da die Media in den mit Elastase behandelten Gefäßmuskelringen die innerste Zellschicht ist, und damit optimale Voraussetzungen für eine adenovirale Infektion der glatten Muskelzellen der Media gegeben sind, soll auch diese Methode trotz der geringen Kontraktilitätserhaltung in den im Weiteren durchgeführten Infektionsversuchen zum Einsatz kommen.

## **4 Infektion glatter Muskelgewebe mit rekombinanten Adenoviren, die das Gen der $\beta$ -Galactosidase tragen (LacZ-Kontrollviren)**

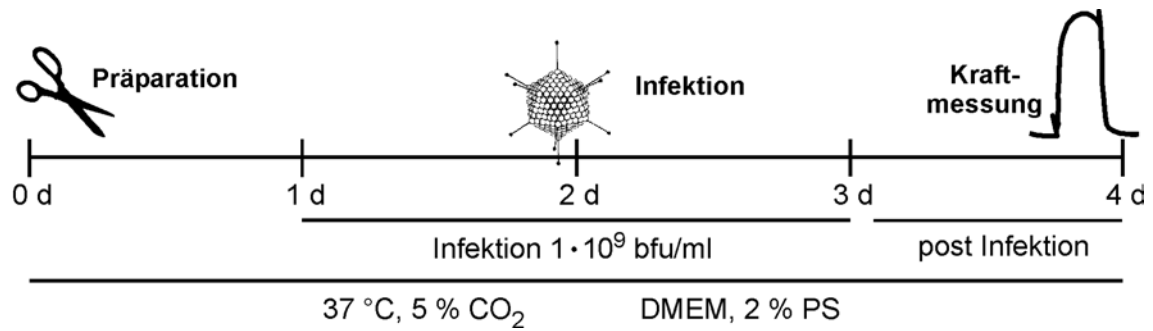
### **4.1 Ablauf der Infektion**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *A. carotis communis* unterschiedlicher Spezies (Kaninchen, Maus, Meerschwein, Ratte), die *A. coronaris* des Schweins und die Longitudinalmuskulatur vom Ileum des Meerschweinchens mit Adenoviren infiziert. Die Präparation der Gewebe erfolgte dabei wie in den Kapiteln III 1.2 und 1.3 erläutert. Das Gewebe wird am Tag der Präparation in Kultur genommen und einen Tag nach der Präparation zur Infektion mit virushaltigem Medium inkubiert. In allen Experimenten wird mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^9$  bfu/ml (bfu: *blue forming units*) gearbeitet, der Viruskontakt beträgt jeweils  $48 \pm 5$  h.

Für die Gefäßmuskelpräparate ist es in der Regel möglich, das Virusmedium über den Zeitraum der Infektion nicht zu wechseln. Längere Gefäßabschnitte werden in 500  $\mu$ l, einzelne Muskelringe in 300  $\mu$ l Lösung inkubiert. Lediglich die *A. coronaris* des Schweins bedarf aufgrund der größeren Gewebemenge eines Wechsels des Virusmediums nach ca. 24 Stunden.

Obwohl die Muskelpräparate des Ileums sehr dünn sind und eine geringe Gewebemenge darstellen, müssen diese Präparate in vergleichsweise großen Mengen Virusmedium kultiviert werden, da es ansonsten zu einer Azidierung des Mediums kommt. Dies ist wahrscheinlich auf anhaftende Bakterien zurückzuführen. Es wird daher für jedes Ileumpräparat 1 ml Virusmedium für eine jeweils ca. 24-stündige Inkubation verwendet. Außerdem wird das Medium durch Zugabe von 20 mM HEPES zusätzlich gepuffert.

In einigen Fällen wird parallel zur Infektion die Behandlung mit EGTA (s. IV-A; 3.2) bzw. Elastase (s. IV-A; 3.3) durchgeführt. In diesem Fall wird dem Virusmedium die entsprechende Konzentration an EGTA bzw. Elastase zugegeben und nach der 30-minütigen Inkubation in Zusatz-freies Virusmedium gewechselt. Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie sie bei der EGTA-Behandlung benötigt wird, erfolgt in Abwesenheit von Virus.



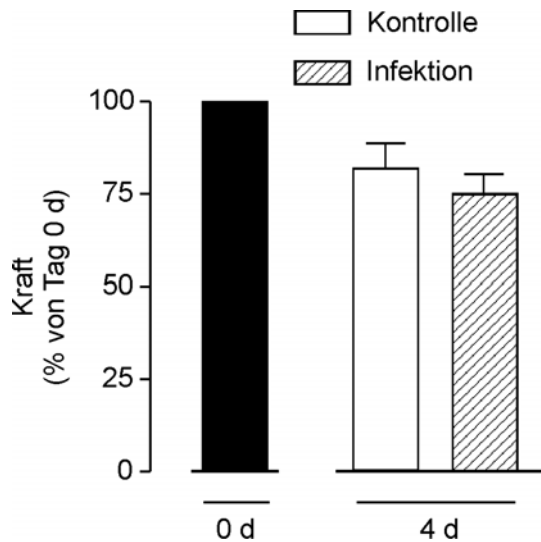
**Abb. IV-9:** Schematische Darstellung des Ablaufs eines typischen Infektionsexperimentes.  
 bfu: *blue forming units*; DMEM: Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium; PS: Penicillin-Streptomycin

Nach Abschluß der Infektion werden alle Gewebe in Virus-freies Kulturmedium überführt und weitere 16-24 h in Kultur gehalten.

Die Durchführung der adenoviralen Infektion hat keinen Einfluß auf das makroskopische Erscheinungsbild der Gewebe; es konnte auch unter dem Binokular keine Veränderung der äußeren Strukturen festgestellt werden.

#### 4.2 Bedeutung der Infektion mit LacZ-Kontrollviren für die Kontraktilität

Muskelringe der *A. carotis communis* des Kaninchens werden am Tag der Präparation einer Kontrollkontraktion unterzogen, am Tag 1 d wie unter IV-A 4.1 beschrieben mit LacZ-Viren infiziert und am Tag 4 d erneut auf ihre Kontraktilität hin untersucht. Wie in Abbildung IV-10 dargestellt, wird die Antwort des Gewebes auf den gewählten Stimulus (K+H 100) durch die adenovirale Infektion nicht beeinflusst. In den Kontrollpräparaten wird ca. 82 %, in den infizierten Muskelringen ca. 75 % der Ausgangskraft entwickelt.



**Abb. IV-10:** Die Infektion mit LacZ-Kontrollviren hat keinen Einfluß auf die Kontraktilität der *A. carotis communis* des Kaninchens.

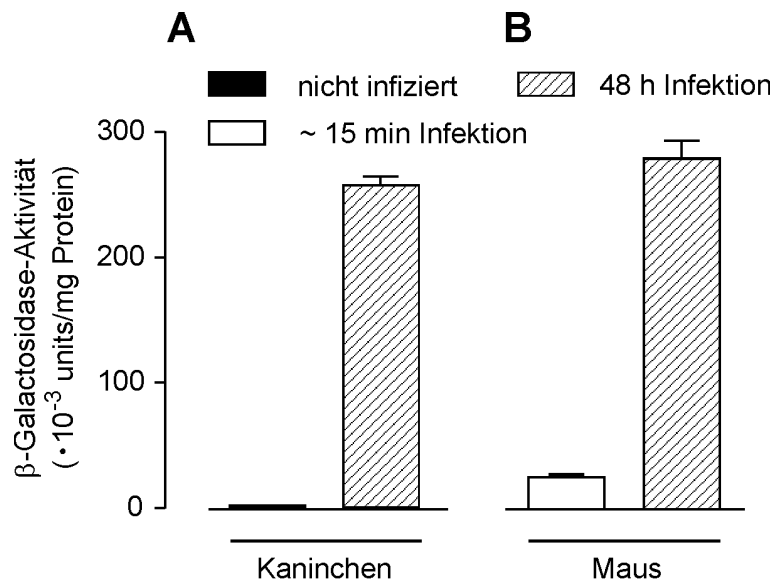
Zusammenfassung der Kraftmessungen mit infizierten und nicht infizierten Muskelringen (n=4). Alle Werte sind angegeben als % der am Tag 0 d induzierten Kontrollkontraktion mit K+H 100.

### 4.3 Nachweis der adenoviralen Infektion in Gewebehomogenaten

Die Aktivität des durch die Infektion überexprimierten Enzyms  $\beta$ -Galactosidase kann in Gewebehomogenaten mittels einer spezifischen Nachweisreaktion bestimmt und über photometrische Messung des Reaktionsprodukts quantifiziert werden (s. III; 2.2). Der Ausgleich der endogenen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität erfolgt über Kontrollmessungen mit nicht infizierten Geweben. Die Ergebnisse dieser Nachweismethode sollen hier exemplarisch für einige der im Rahmen dieser Arbeit infizierten Gewebe (*A. carotis communis* der Maus und des Kaninchens) dargestellt werden. Für das Kaninchen werden die Meßwerte eines infizierten und eines nicht infizierten Präparates gegenüber gestellt. Für die Maus werden zwei infizierte Gewebeabschnitte verglichen, von denen der eine den üblichen Viruskontakt von 48 h hatte, während das andere Präparate nur für einen Zeitraum von 10-15 min in der Viruslösung inkubiert wurde (Abb. IV-11).

Wie Abbildung IV-11 A zeigt, ist die Aktivität der endogenen  $\beta$ -Galactosidase in der *A. carotis communis* des Kaninchens verschwindend gering und photometrisch kaum zu detektieren. Im infizierten Gewebe dagegen ist eine hohe Aktivität des Enzyms meßbar. Der Quotient der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität im infizierten Gewebe und in dem Kontrollsystem beträgt ca. 150. Etwas anders ist das Bild bei den hier dargestellten Mauspräparaten (Abb. IV-11; B). Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in dem für 48 h infizierten Gefäßabschnitt ähnelt der im Kaninchen gemessenen Enzymaktivität. Offensichtlich ist jedoch auch nach einer Viruskontaktzeit von 10-15 min schon eine deutliche Infektion des

Gewebes vollzogen. Der Quotient aus 48 h- und 10-15 min-infiziertem Gewebe ist daher mit ca. 10 auch wesentlich geringer als der für das Kaninchen ermittelte Wert.



**Abb. IV-11:** Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in infizierter und nicht infizierter *A. carotis communis* von Kaninchen und Maus.

**A**  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in nicht infizierter und infizierter (48 h) *A. carotis communis* des Kaninchens (n=2).

**B**  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in infizierter *A. carotis communis* der Maus, die 10-15 min bzw. 48 h Viruskontakt hatte (n=2).

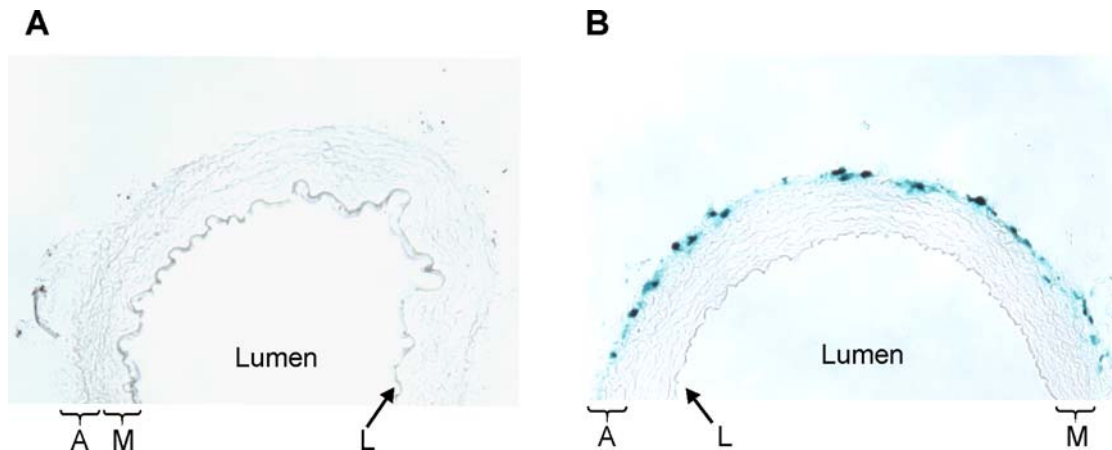
#### 4.4 Enzymhistochemischer Nachweis der adenoviralen Infektion

Im Gegensatz zu dem gerade angewendeten photometrischen Nachweisverfahren ist mit enzymhistochemischen Methoden die Identifizierung der infizierten Zelltypen möglich.

##### Gefäßmuskulatur

Die mit der X-gal-Färbelösung inkubierten (s. III; 2.1) infizierten Gefäßabschnitte lassen nach einer relativ kurzen Inkubationszeit von wenigen Stunden eine deutliche Blaufärbung erkennen. Das Gefäß wird dabei nicht einheitlich angefärbt, sondern es erscheinen distinkte, über die ganze Länge des Abschnitts verteilte blaue Färbungen. Werden die Muskelpräparate anschließend histologischen Methoden unterzogen (s. III; 2.1) und dünne

Schnitte der Gewebe unter dem Mikroskop betrachtet, so ist eine Zuordnung der Blaufärbung zu einzelnen Zellen möglich.



**Abb. IV-12:** Das verwendete LacZ-Virus infiziert die Gefäßwand spezifisch. Kontrollpräparate zeigen keinerlei Färbung.

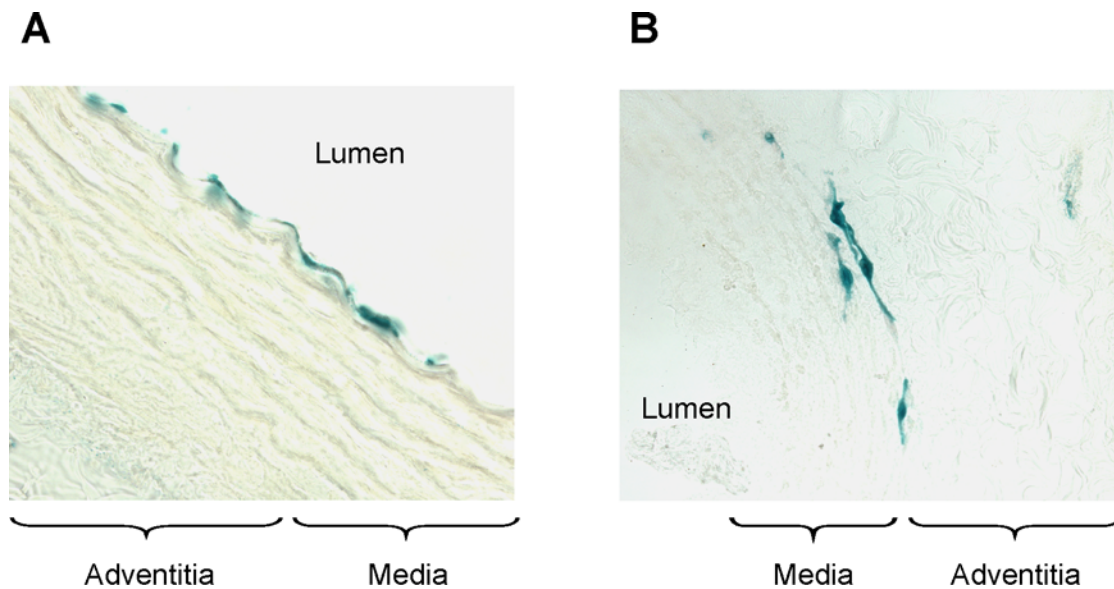
**A** A. carotis communis des Meerschweinchens, nicht infiziert, nach X-gal-Färbung und Histologie. 10fach vergrößert, Schnittdicke 25  $\mu\text{m}$

**B** A. carotis communis des Kaninchens nach Infektion mit LacZ-Viren ( $1 \cdot 10^9$  bfu/ml), X-gal-Färbung und Histologie. 10fach vergrößert, Schnittdicke 16  $\mu\text{m}$ .

A: Adventitia, M: Media, L: Lamina elastica interna

In allen untersuchten Gefäßen konnte nach der adenoviralen Infektion prinzipiell das gleiche Bild beobachtet werden. In den Fällen, in denen die Entfernung des Endothels nicht vollständig erfolgte, kann eine deutliche Färbung der endothelialen Zellen festgestellt werden (Abb. IV-13; A). In der Adventitia sind ebenfalls einzelne Zellen eindeutig infiziert (Abb. IV-12; B). Diese Zellen bestehen in der Regel aus einem Zellkörper, von dem zwei oder mehr schmale, zum Teil verzweigte, Fortsätze ausgehen (Abb. IV-13; B). Diese Zellen befinden sich in den meisten Fällen nahe der Grenzfläche zwischen der Adventitia und der Media und scheinen der Media von außen anzuliegen. Es gibt diese Strukturen jedoch auch weiter außen in der Adventitia in größerer Entfernung von der Media. Daneben gibt es noch Stellen sehr starker Anfärbung in der Adventitia, die keiner distinkten Zellstruktur zugeordnet werden können und bei denen es sich sehr

wahrscheinlich um Artefakte handelt. In der Media, der Zellschicht der glatten Muskelzellen selber, ist keinerlei Blaufärbung zu detektieren.



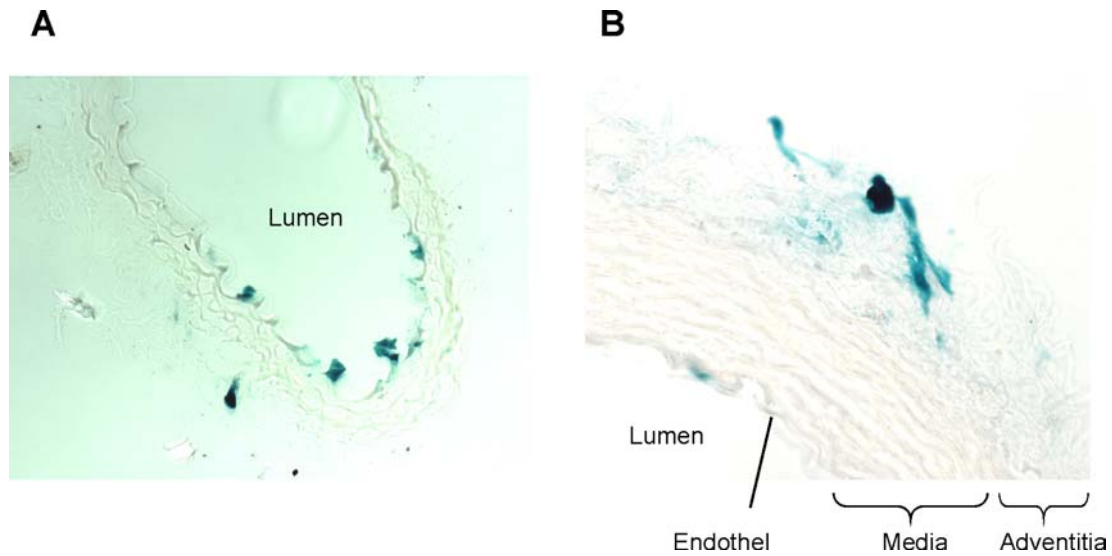
**Abb. IV-13:** Sowohl das Endothel als auch bestimmte Zelltypen in der Adventitia werden von dem Virus spezifisch infiziert.

**A** A. carotis communis des Kaninchens nach Infektion mit LacZ-Viren ( $1 \cdot 10^9$  bfu/ml, EGTA-behandelt), X-gal-Färbung und Histologie. Gezeigt sind infizierte Endothelzellen. 63fach vergrößert, Schnittdicke  $25 \mu\text{m}$

**B** A. carotis communis des Kaninchens nach Infektion mit LacZ-Viren ( $1 \cdot 10^9$  bfu/ml, Elastase-behandelt), X-gal-Färbung und Histologie. Gezeigt sind drei der bislang nicht identifizierten Zellen der Adventitia, die durch das Virus spezifisch infiziert werden. 25fach vergrößert, Schnittdicke  $25 \mu\text{m}$

Die Anwendung der EGTA- und der Elastase-Behandlung, die beide potentiell zu einer verbesserten Infektionseffizienz führen sollen, ändern an dem gerade beschriebenen Infektionsmuster der Gefäßwand nichts. Abbildung IV-14 B zeigt ein mit EGTA behandeltes Gefäß, das exakt das gerade beschriebene Bild wiedergibt. Auch die Elastase-Behandlung führt zu keiner verbesserten Infektion der glatten Muskelzellen. Obwohl die Media aufgrund der bereits erwähnten kompletten Entfernung von Endothel und Lamina elastica interna in diesen Gefäßen direkten Kontakt mit den Viren hat, ist keine Infektion von glatten Muskelzellen zu beobachten (Abb. IV-13; B).





**Abb. IV-14:** Weder eine lediglich 10-minütige Inkubationszeit mit dem Virus noch die EGTA-Behandlung ändern das Infektionsmuster des Virus.

**A** A. carotis communis der Maus nach 10 bis 15-minütiger Inkubation mit LacZ-Viren ( $1 \cdot 10^9$  bfu/ml), X-gal-Färbung und Histologie. 25fach vergrößert, Schnittdicke  $20 \mu\text{m}$

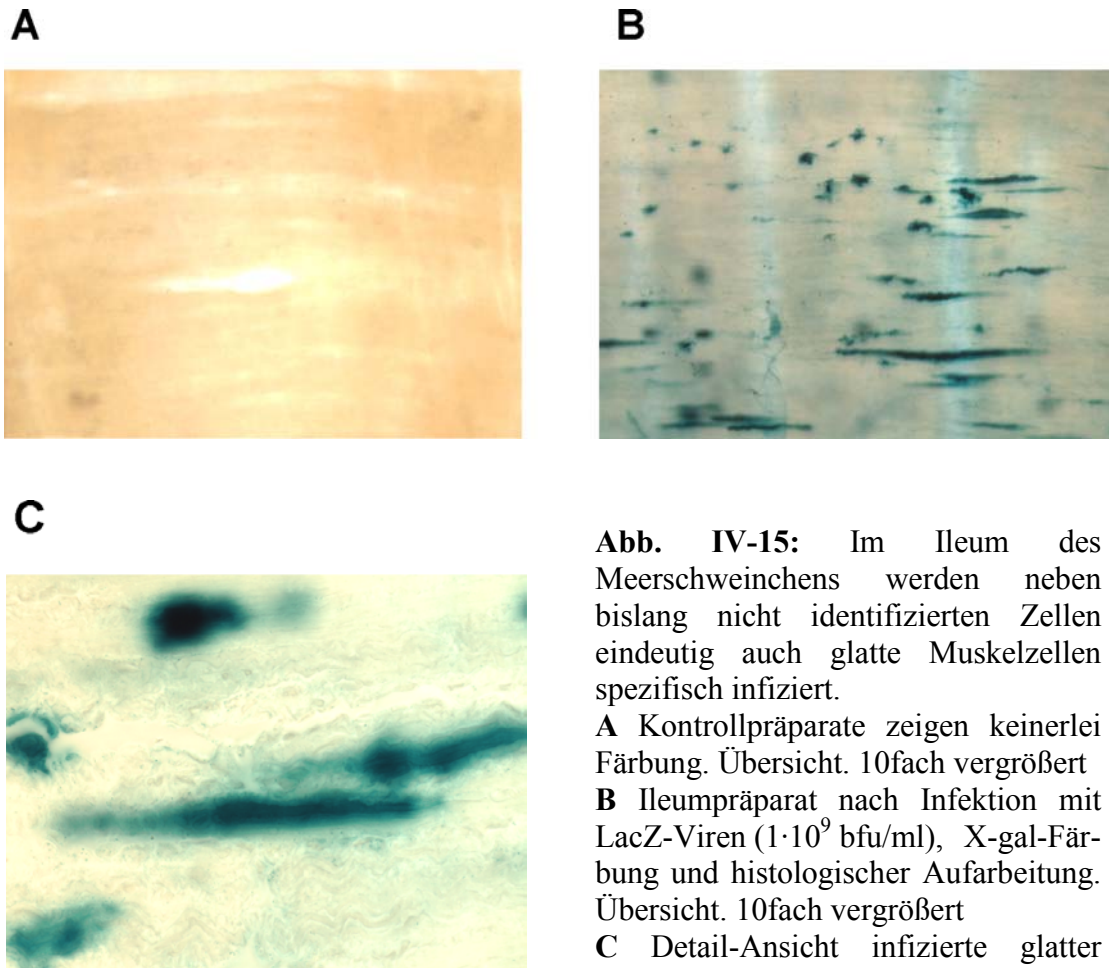
**B** A. carotis communis des Kaninchens nach Inkubation mit LacZ-Viren ( $1 \cdot 10^9$  bfu/ml) und paralleler EGTA-Behandlung. Anschließend wurde die X-gal-Färbung vorgenommen und das Präparat histologisch aufgearbeitet. 63fach vergrößert, Schnittdicke  $20 \mu\text{m}$

Ein Teil des Mausgewebes ist, wie in IV-A 4.3 erwähnt, für lediglich 10-15 min mit dem Virusmedium in Kontakt gewesen. Wie schon im photometrischen Nachweis kann auch mit den enzymhistochemischen Methoden eine Infektion des Gewebes nach dieser kurzen Infektionszeit beobachtet werden. Die Blaufärbung der Arterie fällt makroskopisch betrachtet deutlich geringer aus und ist im mikroskopischen Bild auf einige wenige Endothelzellen beschränkt (Abb. IV-14; A).

Alle Kontrollgefäße, die ohne vorangegangene Infektion dem enzymhistochemischen Nachweis unterzogen worden sind, zeigen keine Anzeichen von blau gefärbten Zellen (Abb. IV-12; A).

### Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchenileums

Auch die untersuchte Darmmuskulatur des Meerschweinchens zeigt nach der Infektion und der Inkubation mit X-gal-Färbelösung eine nicht einheitliche Blaufärbung, die auf wenige, vereinzelte Stellen begrenzt ist. Die Färbung erfolgt vor allem am Rand der Präparate und wird zur Mitte hin deutlich geringer. Mikroskopische Aufnahmen zeigen, daß in der Mitte der Gewebepräparate Zellen unterschiedlicher Form infiziert werden (Abb. IV-15; B).



**Abb. IV-15:** Im Ileum des Meerschweinchens werden neben bislang nicht identifizierten Zellen eindeutig auch glatte Muskelzellen spezifisch infiziert.

**A** Kontrollpräparate zeigen keinerlei Färbung. Übersicht. 10fach vergrößert  
**B** Ileumpräparat nach Infektion mit LacZ-Viren ( $1 \cdot 10^9$  bfu/ml), X-gal-Färbung und histologischer Aufarbeitung. Übersicht. 10fach vergrößert  
**C** Detail-Ansicht infizierte glatter Muskelzellen. 63fach vergrößert

Zum einen werden Strukturen erkennbar, die den für die Gefäßmuskulatur beschriebenen Zellen ähneln. Auch hier werden einzelne Zellkörper mit mehreren schmalen Fortsätzen angefärbt. Außerdem sind hier auch eindeutig glatte Muskelzellen infiziert, die anhand ihrer langen, spindelförmigen Erscheinung leicht und eindeutig zu identifizieren sind. Die Zellen scheinen leicht kontrahiert zu sein, da sie eine wellenförmige Silhouette aufweisen und korkenzieher-artig verzogen sind (Abb. IV-15; C). Die infizierten glatten Muskelzellen treten in der Regel nur vereinzelt auf und sind von nicht infizierten glatten Muskelzellen

umgeben. Insgesamt sind weniger als 1 % der glatten Muskelzellen von den Adenoviren infiziert worden.

Im nicht infizierten Kontrollgewebe unterbleibt eine Anfärbung der Zellen auch beim Ileum vollständig (Abb. IV-15; A).

## **B Untersuchungen an permeabilisierten glattmuskulären Geweben**

Der Effekt, den die p21-aktivierte Proteinkinase 1 (PAK1) auf die Regulation der Myosin II-Phosphorylierung und die Kontraktion der glatten Muskulatur hat, wird in den im Folgenden aufgeführten Experimenten an mit Triton X-100 permeabilisierten Muskelpräparaten (s. III; 1.4) untersucht. Dabei werden alle Untersuchungen in gepaarten Experimenten durchgeführt, so daß sowohl die Lösungsansätze und die Enzymaktivitäten (z.B. von Inhibitoren) als auch die Herkunft und Präparation der Gewebe in Kontroll- und PAK-Messungen identisch sind. Dies gilt sowohl für sämtliche Kraftmessungen als auch für die Analysen von r-MLC- und anderen Proteinphosphorylierungen. Alle Experimente werden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur (23 °C) durchgeführt.

### **1 Untersuchungen an permeabilisierter Taenia caeci des Meerschweinchens**

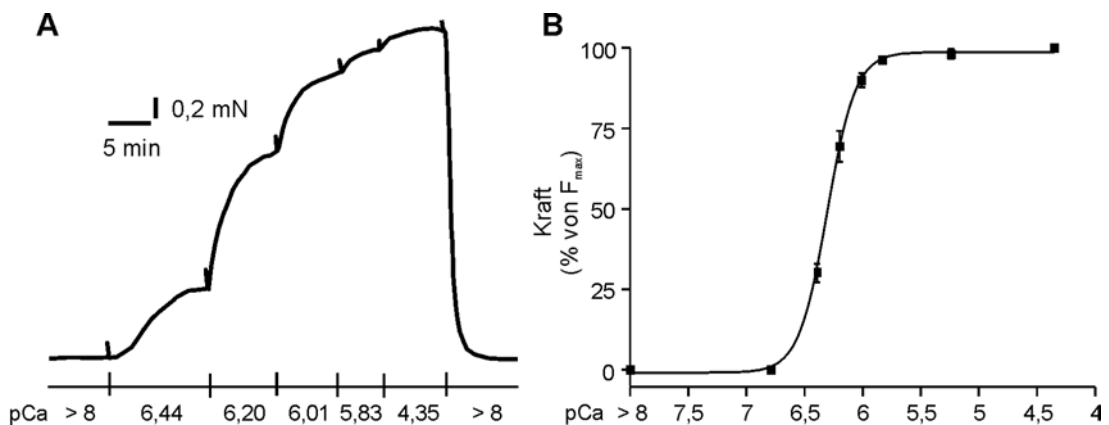
Die Triton-gehäuteten Muskelfasern der Taenia caeci des Meerschweinchens werden aus mehreren Gründen als experimentelles System für die Untersuchung der Effekte der p21-aktivierten Proteinkinase 1 auf die Kontraktion ausgewählt. Zum einen handelt es sich bei diesem Gewebe um ein gut charakterisiertes und etabliertes permeabilisiertes Muskelpräparat. Zum anderen sind die einzigen bisher veröffentlichten Daten, die eine Beteiligung der p21-aktivierten Proteinkinasen, nämlich speziell der Isoform PAK3, an glattmuskulärem Gewebe untersuchen, an eben diesem Präparat durchgeführt worden [Van Eyk et al., 1998], so daß eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit PAK3 [Van Eyk et al., 1998] und der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten mit PAK1 zu erwarten ist.

#### **1.1 Charakterisierung der mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate**

Nach der Permeabilisierung des Gewebes mit dem Detergenz Triton X-100 ist die Zellmembran entfernt und die Ionenzusammensetzung des Intrazellulärraumes durch die extrazellulär applizierte Reaktionslösung kontrollierbar. Durch steigende Konzentrationen an freien Calciumionen kann eine dosisabhängige Kraftentwicklung induziert werden. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Lösungen wird als negativer dekadischer Logarithmus, pCa,

angegeben. Bei einem pCa von  $>8$  sind die Muskelpräparate relaxiert, bei einem pCa von 4,35 ( $46,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) maximal kontrahiert.

Zur Untersuchung der Kraft- $[\text{Ca}^{2+}]$ -Beziehung werden die gehäuteten Taenia caeci-Fasern in die Meßapparatur eingespannt und für 20-30 Minuten in Relaxationslösung inkubiert. Anschließend wird das Gewebe mit kumulativ aufsteigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktiviert. Abbildung IV-16 zeigt die Abhängigkeit der Kraft vom jeweiligen pCa sowohl anhand einer Originalregistrierung der Kraft (Abb. IV-16; A) als auch als graphische Darstellung (Abb. IV-16; B). Aufgrund des sigmoidalen Verlaufs der Dosis-Wirkungskurve kommt es im Bereich von pCa 6,25 bei kleinen Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu großen Kraftanstiegen. Der pCa<sub>50</sub>-Wert ist definiert als der pCa-Wert, bei dem die entwickelte Kontraktionskraft halbmaximal ist, und ist ein Maß für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des Gewebes. Für die in dieser Arbeit verwendeten mit Triton X-100 permeabilisierten Taenia caeci-Fasern des Meerschweinchens wurde ein pCa<sub>50</sub>  $6,31 \pm 0,05$  ermittelt.



**Abb. IV-16:** Kraft- $[\text{Ca}^{2+}]$ -Beziehung der mit Triton X-100 permeabilisierten Taenia caeci des Meerschweinchens.

**A** Originalregistrierung der Kraft. **B** Graphische Darstellung als Konzentrations-Wirkungs-Kurve (n=7). Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

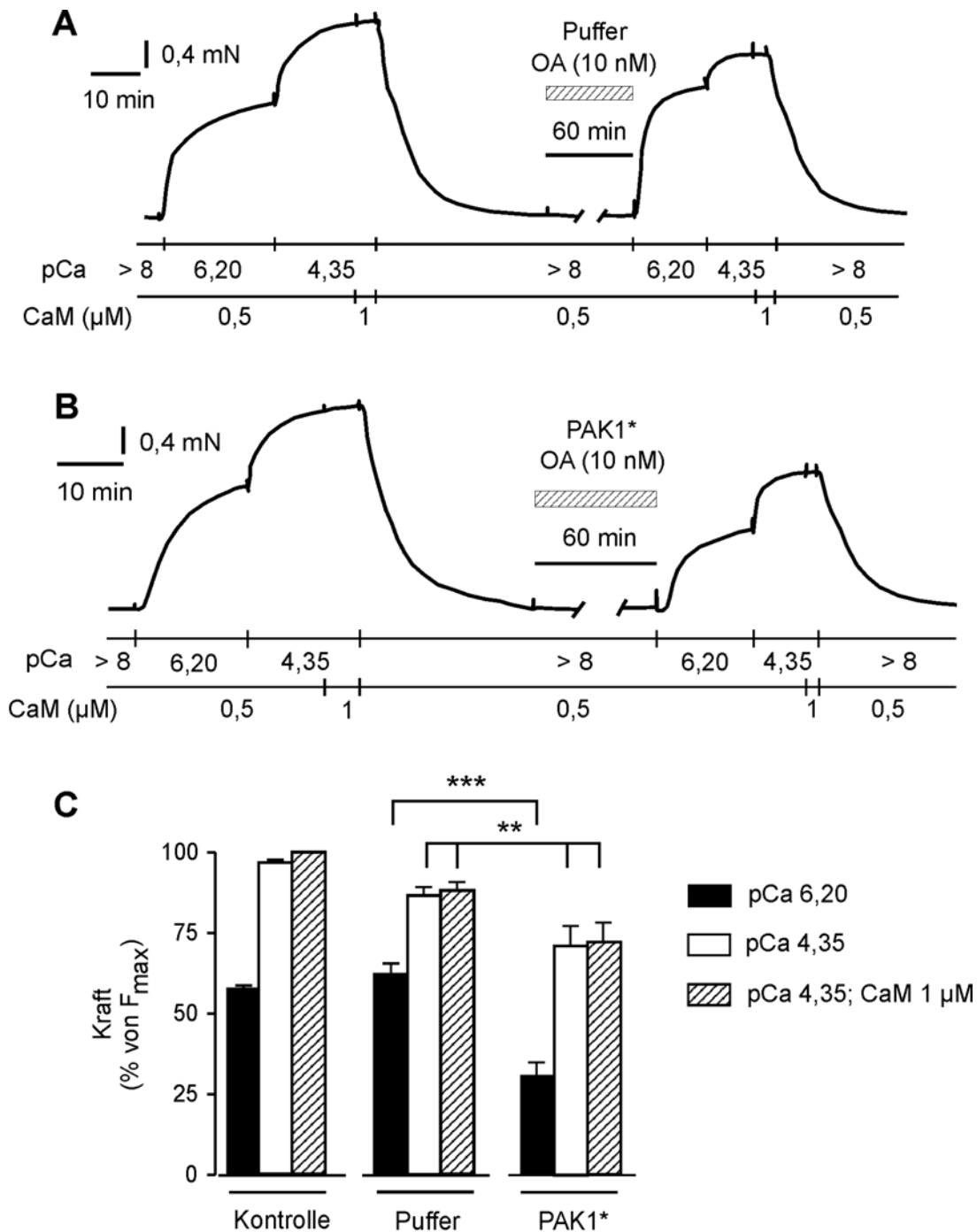
## 1.2 Einfluß von PAK1\* auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen

Die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen ist als das stabile Kontraktionsniveau definiert, das je nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von den Muskelpräparaten erreicht wird. In diesem Zustand ist die Phosphorylierung der r-MLC abgeschlossen, das Aktivitätsgleichgewicht zwischen MLCK und MLCP eingestellt und der Querbrückenzyklus läuft konstant ab, so daß die Kraft zumindest über einen gewissen Zeitraum stabil bleibt.

Um den Effekt der p21-aktivierten Proteinkinase 1 auf die Kontraktion der glatten Muskulatur zu untersuchen, werden mit Triton gehäutete Taenia caeci-Fasern in die Meßapparatur eingespannt und zuerst submaximal und anschließend maximal kontrahiert (Abb. IV-17). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für die submaximale Kontraktion wird mit einem pCa von 6,20 nahe dem  $\text{pCa}_{50}$ -Wert gewählt, um sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf die Kraftentwicklung auflösen zu können. Die maximale Kraft wird mit pCa 4,35 in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  Calmodulin (CaM) induziert. Diese Erhöhung der CaM-Konzentration hat, wie in Abbildung IV-17 erkennbar, keinen signifikanten Einfluß auf die Kraftentwicklung. Alle Kontraktionen werden auf die erste maximale Kraftentwicklung bei pCa 4,35, CaM 1  $\mu\text{M}$  normiert. Dementsprechend erreicht die erste submaximale Kontraktion einen Wert von  $57,7 \pm 1,1$  %. Anschließend erfolgt eine 60-minütige Inkubation der Präparate in Relaxationslösung, die neben dem rekombinanten, aktiven Fusionsprotein GST-PAK1<sup>T422E</sup> (72  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. der entsprechenden Menge Dialysat auch Okadainsäure in einer Konzentration von 10 nM enthält. Bei Okadainsäure handelt es sich um einen Phosphataseinhibitor, dessen Wirkspektrum sowohl Proteinphosphatasen vom Typ 1 (PP1, z.B. MLCP) als auch vom Typ 2A (PP2A) umfaßt, der jedoch eine deutlich höhere Affinität zu den PP2A besitzt. Die  $\text{IC}_{50}$  für PP2A liegt bei ca. 0,1 nM, während für die Inhibierung der PP1 deutlich höhere Konzentrationen benötigt werden ( $\text{IC}_{50}$  ca. 15 nM) [Takai et al., 1989].

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das aktive Fusionsprotein GST-PAK1<sup>T422E</sup> als „PAK1\*“ abgekürzt, die mit dem Dialysat inkubierten Präparate werden mit „Puffer“ bezeichnet.

Nach der Inkubationszeit werden erneut zwei Kontraktionen mit pCa 6,20 bzw. 4,35 ausgelöst. Der genaue Ablauf des Protokolls kann Abb. IV-17 (A und B) Originalregistrierungen der Kraft entnommen werden.



**Abb. IV-17:** PAK1\* wirkt inhibierend auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen.

**A** und **B** Originalregistrierung der Kraft. Taenia caeci-Fasern werden in Relaxationslösung eingespannt, submaximal und maximal kontrahiert und anschließend mit Puffer (**A**) bzw. dem konstitutiv aktiven Fusionsprotein PAK1\* (72  $\mu$ g/ml; **B**) für 60 min inkubiert. Die abschließenden Kontraktionen werden mit den gleichen Calciumstufen wie vorher induziert. OA: Okadainsäure

**C** Inhibierung der Kraftentwicklung durch PAK1\*. Ermittelte Kontraktionskräfte (n=6; in % der ersten maximalen Stimulierung bei pCa 4,35 und CaM 1  $\mu$ M) sowohl vor (Kontrolle) als auch nach der Inkubation mit Puffer bzw. PAK1\*.  
(\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

Die graphische Darstellung der Meßdaten ergibt folgendes Bild (Abb. IV-17; C): In der Pufferkontrolle ist die submaximale Kraft im Vergleich zur vorhergehenden submaximalen Kontraktion nicht verändert ( $62,3 \pm 3,3 \%$ ), während die maximale Stimulierung eine Abnahme um ca. 13 % zeigt, unabhängig von der gewählten Calmodulinkonzentration. Die mit PAK1\* inkubierten Präparate zeigen dagegen eine deutliche und signifikante Hemmung der submaximalen Kraft um ca. 50 % auf  $30,7 \pm 4,3 \%$ . Auch die maximale Kraftentwicklung ist mit Werten von  $72,1 \pm 6,3 \%$  signifikant um ca. 29 % inhibiert.

Außerdem wird in den Muskelfasern auch der Anstieg der submaximalen Kraft durch Inkubation mit PAK1\* verlangsamt. Dies ist bereits in der Originalregistrierung der Messung in Abb. IV-17 B an dem deutlich verzögerten Verlauf der submaximalen Kontraktion nach Inkubation mit PAK1\* im Vergleich zur Pufferkontrolle zu erkennen. Die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Kraft der Kontraktion, die sogenannte  $t_{1/2}$ -Zeit, wird durch PAK1\* bei submaximaler Stimulierung signifikant erhöht (Abb. IV-21; B).

Wird die Inkubationszeit in Gegenwart des aktiven Fusionsproteins PAK1\* auf 30 Minuten reduziert, kann ein vergleichbarer hemmender Effekt auf die Kraftentwicklung beobachtet werden (Tab. IV-3).

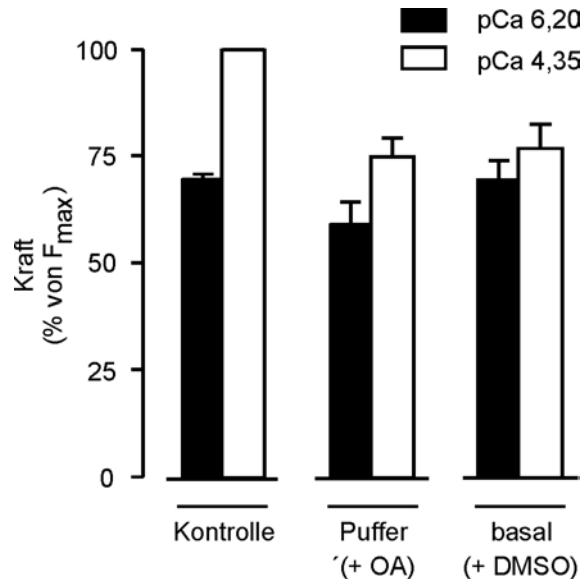
**Tab. IV-3:** Inhibierung der Kraftentwicklung durch PAK1\* nach 30-minütiger Inkubation. Das Meßprotokoll folgt bis auf die Verkürzung der Inkubationszeit in Gegenwart von PAK1\* bzw. Puffer auf 30 Minuten dem in Abb. IV-17 dargestellten Schema. Angegeben sind die Kräfte in % der ersten Maximalkraft bei pCa 4,35 und CaM 1  $\mu$ M (n=3).

	<b>pCa 6,20</b>	<b>pCa 4,35</b>	<b>pCa 4,35, CaM 1 <math>\mu</math>M</b>
Kontrolle	$47,5 \pm 4,0 \%$	$95,3 \pm 1,2 \%$	100 %
<b>Puffer</b>	$39,7 \pm 9,4 \%$	$80,3 \pm 3,9 \%$	$83,7 \pm 4,8 \%$
<b>PAK1*</b>	$12,7 \pm 4,3 \%$	$64,3 \pm 9,6 \%$	$66,7 \pm 9,3 \%$



### 1.3 Auswirkung des Phosphataseinhibitors Okadainsäure auf die Kraftentwicklung

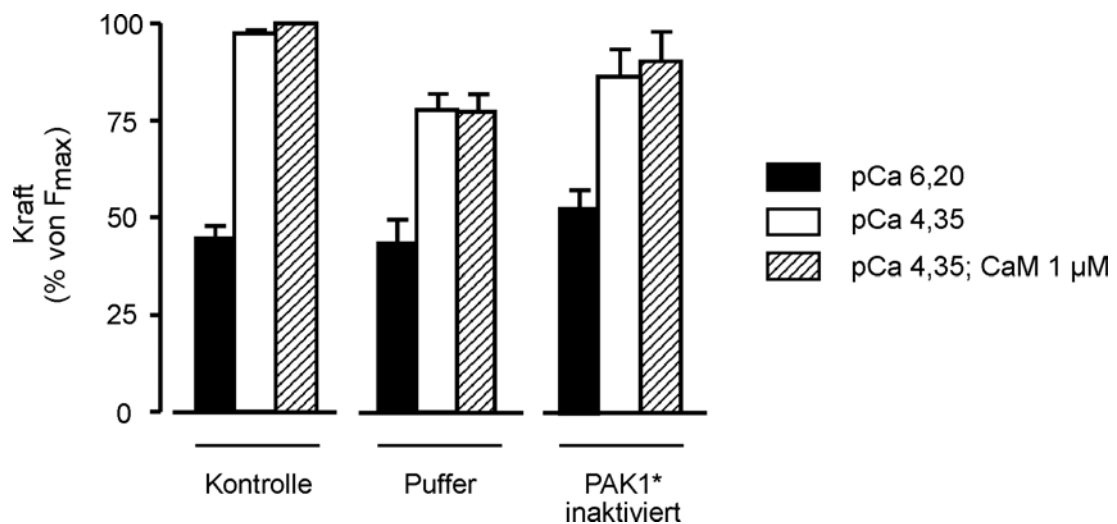
Um abzuschließen, daß Okadainsäure in der eingesetzten Konzentration von 10 nM die Kontraktion der Triton-gehäuteten *Taenia caeci* nicht beeinflußt, wird das unter IV-B 1.2 beschriebene Meßprotokoll mit leichten Modifizierungen durchgeführt: Die Inkubation wird mit Dialysat in An- und Abwesenheit des Phosphataseinhibitors durchgeführt. Die zweite maximale Kontraktion in Gegenwart von 1  $\mu$ M Calmodulin wird ausgelassen. Die Kontrolle wird in diesem Experiment durch Zugabe der entsprechenden Menge an Lösungsmittel (DMSO) zur Inkubationslösung durchgeführt und soll im Folgenden als „basal“ bezeichnet werden. Wie die Zusammenstellung der Daten in Abbildung IV-18 zeigt, ist weder bei submaximaler noch bei maximaler Stimulierung ein signifikanter Effekt der Okadainsäure auf die Kraftentwicklung zu beobachten. Die submaximalen Kräfte liegen mit bzw. ohne Okadainsäure bei  $59,0 \pm 5,3$  % bzw.  $69,3 \pm 4,7$  % der maximalen Vergleichskraft. Auch die Maximalkraft wird durch Okadainsäure nicht beeinflußt.



**Abb. IV-18:** 10 nM Okadainsäure hat keinen Einfluß auf die Kraftentwicklung. Dargestellt sind die Kontraktionskräfte in % der ersten maximalen Stimulierung bei pCa 4,35 und CaM 0,5  $\mu$ M (n=3). Das Meßprotokoll kann Abb. IV-17 entnommen werden; die 60-minütige Inkubation in Relaxationslösung wurde in An- bzw. Abwesenheit von Okadainsäure (OA) durchgeführt (Puffer bzw. basal).

#### 1.4 Nachweis der Spezifität der Effekte von PAK1\* auf die Kraftentwicklung

Um die Spezifität des durch PAK1\* ausgeübten Effekts auf die Kontraktilität der permeabilisierten Muskulatur der *Taenia caeci* zu überprüfen, werden Kontrollexperimente mit Hitze-inaktiviertem Enzym durchgeführt. Dabei werden sowohl PAK1\* als auch das Dialysat vor ihrem Einsatz in den Messungen für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Es wird davon ausgegangen, daß diese Behandlung zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms führt. Das Meßprotokoll folgt erneut dem schon beschriebenen Schema: Zunächst werden Vergleichskontraktionen induziert (pCa 6,20; pCa 4,35, CaM 0,5 µM und pCa 4,35, CaM 1 µM), dann folgt die 60-minütige Inkubation in Anwesenheit von 10 nM Okadainsäure, die hier allerdings mit der inaktivierten PAK1\* bzw. Dialysat erfolgt. Anschließend werden erneute Kontraktionen mit den gleichen pCa-Werten ausgelöst. Wie aus dem Balkendiagramm (Abb. IV-19) hervorgeht, ist durch Hitze inaktivierte PAK1\* nicht in der Lage, einen Einfluß auf die Kontraktion auszuüben. Sowohl in Gegenwart von inaktivierter PAK1\* als auch von Dialysat liegt die submaximale Kraft nach der Inkubationsperiode bei ca. 53 %, die maximale Kraft ist mit  $92,6 \pm 5,0$  % sogar leicht, aber nicht signifikant höher als in der Pufferkontrolle ( $84,0 \pm 4,0$  %).

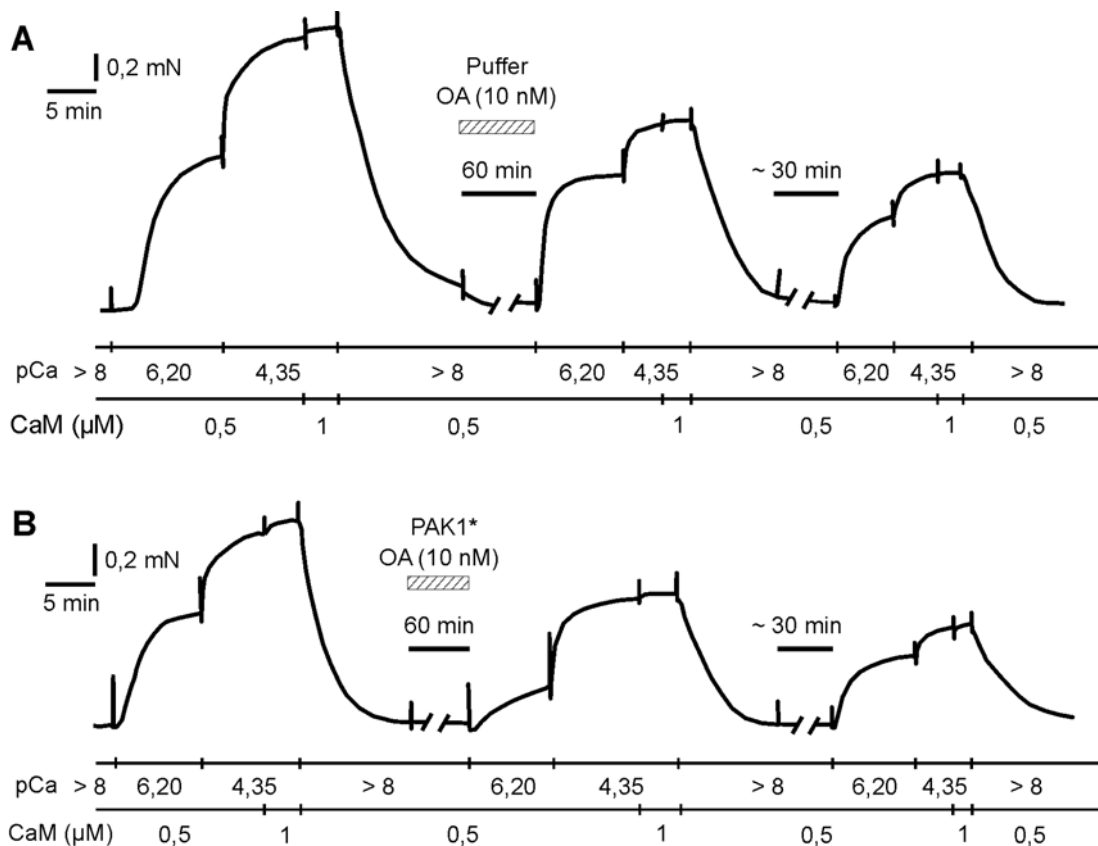


**Abb. IV-19:** Durch Hitze inaktivierte PAK1\* hat keinen Einfluß auf die Kraftentwicklung.

Vor Durchführung des in Abb. IV-17 dargestellten Meßprotokolls werden sowohl das Fusionsprotein als auch das Dialysat 5 min bei 95 °C inaktiviert. Dargestellt sind die gemessenen Kräfte (in % der ersten Maximalkraft bei pCa 4,35; CaM 1 µM, n=4-7).

### 1.5 Untersuchung der Reversibilität der Effekte von PAK1\* auf die Kontraktilität

Die Auswirkungen, die PAK1\* auf die Kontraktion der mit Triton X-100 gehäuteten *Taenia caeci* des Meerschweinchens hat, sind zumindest zum Teil reversibel. Dies kann durch spezielle Messungen gezeigt werden. Zunächst erfolgt die Messung exakt wie im Protokoll unter IV-B 1.2 ausführlich beschrieben. Anschließend an den zweiten Kontraktions-Relaxations-Zyklus wird dann jedoch noch eine zweite Inkubationszeit von ca. 30 Minuten ohne Zugabe von PAK1\*, Dialysat oder Okadainsäure durchgeführt, gefolgt von einer weiteren submaximalen und maximalen Stimulierung der Präparate. Die gewählten  $\text{Ca}^{2+}$ -Stufen und CaM-Konzentrationen sind dabei für alle drei Kontraktionsreihen identisch. Abbildung IV-20 zeigt exemplarisch Originaldaten, die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung IV-21 graphisch dargestellt.

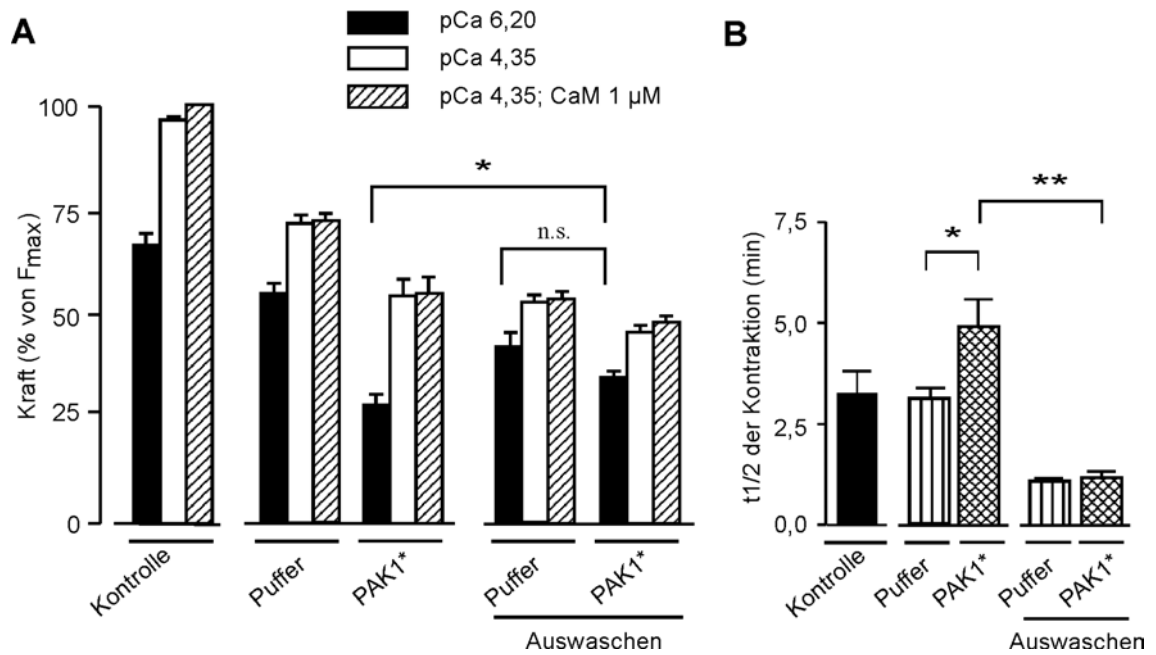


**Abb. IV-20:** Die Effekte von PAK1\* auf die Kraftentwicklung sind partiell reversibel. **A** und **B** Originalregistrierungen der Kraft. Der Anfang des Meßprotokolls mit zwei Kontraktions-Relaxationszyklen und einer 60-minütigen Inkubation mit Puffer (A) bzw. PAK1\* (B) in Gegenwart von Okadainsäure (OA) folgt dem aus Abb. IV-17 bekannten Schema. Anschließend folgt eine zweite, Zusatz-freie Inkubation in Relaxationslösung (~30 min) und ein dritter Kontraktionszyklus mit den gleichen Calciumstufen.

Die Präparate der Pufferkontrolle zeigen eine graduelle Abnahme sowohl der submaximalen als auch der maximalen Kontraktionskraft von der ersten bis zur dritten Stimulierungsreihe. Die Submaximalkraft fällt dabei von  $66,4 \pm 3,0$  % über  $55,0 \pm 2,4$  % auf  $42,5 \pm 3,3$  % von  $F_{\max}$  ab. Der Kraftverlust bei maximaler Stimulierung ist noch deutlicher; die Maximalkraft sinkt insgesamt um knapp 50 %.

Nach Inkubation der Fasern mit PAK1\* kommt es wie erwartet zu einer Inhibierung von submaximaler und maximaler Kraftentwicklung. Die prozentualen Werte entsprechen dabei in etwa den Ergebnissen der vorherigen Messungen: Die submaximale Hemmung beträgt ca. 60 %, die maximale Kraft wird um ca. 45 % inhibiert. Durch Entfernen des rekombinanten Proteins in der zweiten, PAK1\*-freien Inkubationslösung steigt die submaximale Kraft in den PAK1\*-Fasern im dritten Kontraktionszyklus wieder an und ist im Vergleich zur Pufferkontrolle nicht mehr inhibiert. Die Maximalkraft dagegen erholt sich durch die PAK1\*-freie Inkubationsphase nicht, ist aber aufgrund des oben geschilderten Kraftverlustes in den Pufferkontrollen von diesen nicht signifikant verschieden. Die dritte maximale Stimulierung mit pCa 4,35, CaM 1  $\mu$ M ergibt in der Pufferkontrolle Werte von  $53,8 \pm 1,9$  %, in den PAK1\*-Fasern  $48,5 \pm 1,2$  %.

Auffälliger als die Kontraktionskraft verhält sich in diesem Experiment allerdings die Anstiegsgeschwindigkeit der submaximalen Kontraktion (Abb. IV-21; B). Anhand der Originalregistrierungen in Abbildung IV-17 und IV-20 wird ersichtlich, daß, wie bereits erwähnt (s. IV-B; 1.2), durch die Inkubation mit PAK1\* die Zeit bis zur halbmaximalen Kraft ( $t_{1/2}$ ) unter submaximaler Stimulierung deutlich verlangsamt wird. Sie erreicht einen Wert von  $4,9 \pm 0,7$  min. In den Pufferkontrollen ist eher der gegenläufige Effekt einer marginal akkzelerierten Kontraktion zu beobachten. Die  $t_{1/2}$ -Zeit ist hier mit  $3,1 \pm 0,3$  min jedoch nicht unterschiedlich von der  $t_{1/2}$ -Zeit der submaximalen Referenzkontraktion von  $3,3 \pm 0,6$  min. Der PAK1\*-induzierte Effekt auf den zeitlichen Verlauf der submaximalen Kontraktion kann durch Entzug des Fusionsproteins durch die halbstündige PAK1\*-freie Inkubationszeit vollständig aufgehoben werden. Im dritten Kontraktionszyklus sind die  $t_{1/2}$ -Zeiten von PAK1\*-Fasern und Pufferkontrollen mit  $1,1 \pm 0,1$  min und  $1,2 \pm 0,1$  min nicht mehr unterschiedlich voneinander. Sie divergieren jedoch deutlich von dem für die zweite submaximale Kontraktion der Pufferkontrolle ermittelten Wert.



**Abb. IV-21:** Die Effekte von PAK1\* auf die Kraftentwicklung sind partiell reversibel. **A** Graphische Zusammenfassung der mit dem in Abb. IV-20 dargestellten Meßprotokoll ermittelten Kraftdaten. Angabe in % der ersten maximalen Kontraktion bei pCa 4,35; CaM 1  $\mu$ M (n=4; \* P<0,05; n.s. nicht signifikant). **B** Balkendiagramm zur t<sub>1/2</sub>-Zeit vor und nach Inkubation mit Puffer bzw. PAK1\*. Angegeben ist die Zeit in min bis zum Erreichen der halben submaximalen Kraft (n=4-11; \* P<0,05; \*\* P<0,01).

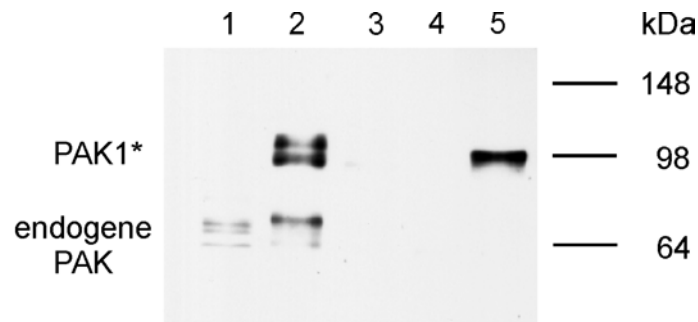
### 1.6 Analyse des Gehalts der endogenen und rekombinanten p21-aktivierten Proteinkinasen im Gewebe der *Taenia caeci* im Verlauf der Kraftmessungen

Um den Gehalt und den eventuellen Verbleib sowohl der endogenen p21-aktivierten Proteinkinasen als auch der PAK1\* zu untersuchen, wird ein immunologischer Nachweis mittels Western Blot-Verfahren (s. III; 6.1) durchgeführt. Zu diesem Zweck werden unterschiedliche Gewebepreparate aufgearbeitet, über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. III; 3.1) und die PAK-Proteine auf der Blotmembran mit Antikörpern nachgewiesen (s. III; 6.1.3).

Folgende Faserpräparate werden analysiert:

- a) mit Triton X-100 permeabilisierte *Taenia caeci* direkt nach Abschluß des Häutungsvorganges (Abb. IV-22; Spur 1),
- b) gehäutete *Taenia caeci*-Fasern, die für ca. 30 Minuten in PAK1\*-haltiger Relaxationslösung inkubiert und nach kurzem Waschen in Imidazol (20 mM, pH 6,7) für die Gelelektrophorese aufgearbeitet wurden (Abb. IV-22; Spur 2),
- c) permeabilisierte *Taenia caeci*-Fasern am Ende eines typischen, in Abbildung IV-20 dargestellten Meßprotokolls, die entweder mit PAK1\* (Abb. IV-22; Spur 3) oder Dialysat (Abb. IV-22; Spur 4) inkubiert worden waren.

Außerdem wurde das gereinigte Fusionsprotein PAK1\* in einer Spur als Referenz aufgetragen (Abb. IV-22; Spur 5).



**Abb. IV-22:** Die Reversibilität der PAK1\*-Effekte geht mit dem Verlust der PAK-Proteine aus dem Gewebe einher.

Röntgenfilm der ECL-Entwicklung eines Western Blots. In den Spuren 1-4 sind je 15 µg des Gesamthomogenats von (1) frischem, mit Triton X-100 permeabilisiertem *Taenia caeci* Gewebe, (2) in PAK1\*-haltiger Relaxationslösung inkubierte Muskel-fasern (genaue Angaben s. Text), sowie (3 und 4) Fasern nach Abschluß eines typischen, in Abb. IV-20 dargestellten Meßprotokolls aufgetragen. Das Gewebe in Spur 3 war dabei mit PAK1\*, das in Spur 4 mit Puffer inkubiert. In Spur 5 wurden 100 ng des gereinigten Fusionsproteins als Referenz aufgetragen.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker der Firma Novex verwendet.

Auf dem Röntgenfilm der ECL-Entwicklung (Abb. IV-22) ist deutlich zu sehen, daß p21-aktivierte Proteinkinasen in der *Taenia caeci* des Meerschweinchens exprimiert werden und unmittelbar nach der Permeabilisierung auch im Gewebe verbleiben (Spur 1). Der anti-PAK1-Antikörper erkennt dabei nicht eine einzelne, sondern drei dicht

beieinander laufende Proteinbanden im Bereich von 60-68 kDa. Nach der Inkubation der Fasern in PAK1\*-haltiger Relaxationslösung erscheint auf dem Film ein zweites Signal bei ca. 98 kDa (Spur 2). Dabei handelt es sich um das Fusionsprotein GST-PAK1<sup>T422E</sup>, dessen apparentes Molekulargewicht ungefähr in dieser Größenordnung liegt. Verifiziert wird diese Annahme durch das in Spur 5 aufgetragene gereinigte PAK1\*, das auf dem Röntgenfilm eine Bande in derselben Höhe ergibt. Die erfolgreiche Beladung des permeabilisierten Gewebes mit dem rekombinanten Protein ist somit belegt.

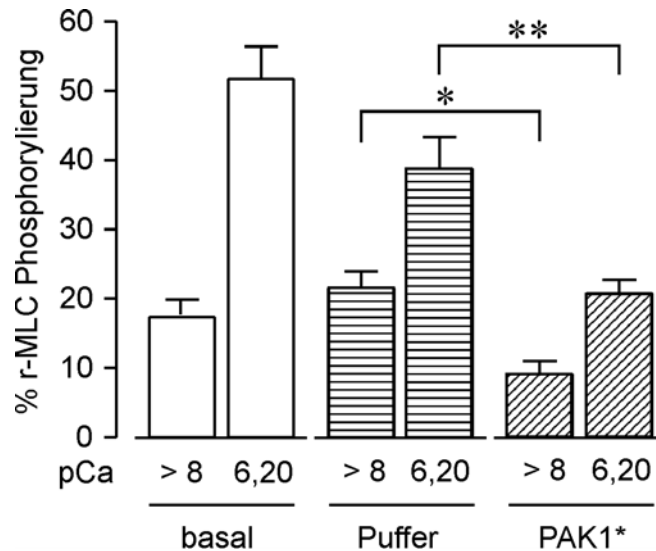
In den Spuren 3 und 4 dagegen sind keine Signale im Molekulargewichtsbereich zwischen 60 und 68 kDa erkennbar. Die endogenen p21-aktivierten Proteinkinasen werden offensichtlich durch die diversen Lösungsmittelwechsel des Meßprotokolls komplett ausgewaschen. Auch das rekombinante Fusionsprotein GST-PAK1<sup>T422E</sup> geht im Laufe der Messungen wieder aus dem Gewebe verloren. In Spur 3 sind mit PAK1\* inkubierte Fasern der *Taenia caeci* aufgetragen, die am Ende eines unter IV-B 1.5 beschriebenen Meßprotokolls aufgearbeitet und immunologisch analysiert worden sind. Durch die Lösungswechsel und vor allem den letzten PAK1\*-freien Kontraktions-Relaxations-Zyklus ist das Fusionsprotein nahezu vollständig aus dem Gewebe heraus gewaschen worden. Der Röntgenfilm zeigt bei 98 kDa lediglich ein kaum detektierbares Signal der verbleibenden PAK1\*.

### **1.7 Einfluß von PAK1\* auf die r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen**

Zur Klärung der Frage, ob die Inhibierung der submaximalen Kraft durch PAK1\* mit einer veränderten Phosphorylierung der r-MLC zusammenhängt, wird diese zu zwei Zeitpunkten des unter IV-B 1.2 beschriebenen Protokolls untersucht: in Relaxationslösung nach der Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von PAK1\* und im Plateau der zweiten submaximalen Kontraktion. In einem zusätzlichen experimentellen Ansatz wird auch hier untersucht, ob Okadainsäure in der gewählten Konzentration von 10 nM einen Einfluß auf die r-MLC-Phosphorylierung hat und daher die „basale“ Phosphorylierung in Abwesenheit von Okadainsäure analysiert.

Wie aus Abbildung IV-23 hervorgeht, beeinflusst die Okadainsäure die r-MLC-Phosphorylierung nicht, da kein signifikanter Unterschied zwischen den Basalwerten und der Pufferkontrolle beobachtet werden kann. Die r-MLC-Phosphorylierung unter

relaxierten Bedingungen liegt bei  $17,4 \pm 2,5$  % bzw.  $21,0 \pm 2,2$  %, unter submaximaler Stimulierung steigen die Werte auf  $51,7 \pm 4,7$  % bzw.  $41,2 \pm 4,3$  % an. In Anwesenheit von PAK1\* kommt es unter beiden Bedingungen zu einer Abnahme der r-MLC-Phosphorylierung. In Relaxationslösung liegt der Phosphorylierungsgrad der r-MLC bei  $9,1 \pm 1,9$  %, unter submaximal stimulierten Bedingungen bei  $20,8 \pm 1,9$  % und ist damit um ca. 50 % bzw. 55 % deutlich reduziert.



**Abb. IV-23:** Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen durch PAK1\*.

Phosphorylierung der r-MLC in Abwesenheit von Okadainsäure (basal; n=11) oder nach Inkubation mit Puffer (n=9) oder PAK1\* (n=8-9) unter Einwirkung von Okadainsäure unter relaxierten (pCa>8) und submaximal stimulierten (pCa 6,20) Bedingungen.

Angegeben ist der Anteil an phosphorylierter r-MLC in % des Gesamtgehaltes an r-MLC (\* P<0,05; \*\* P<0,01).

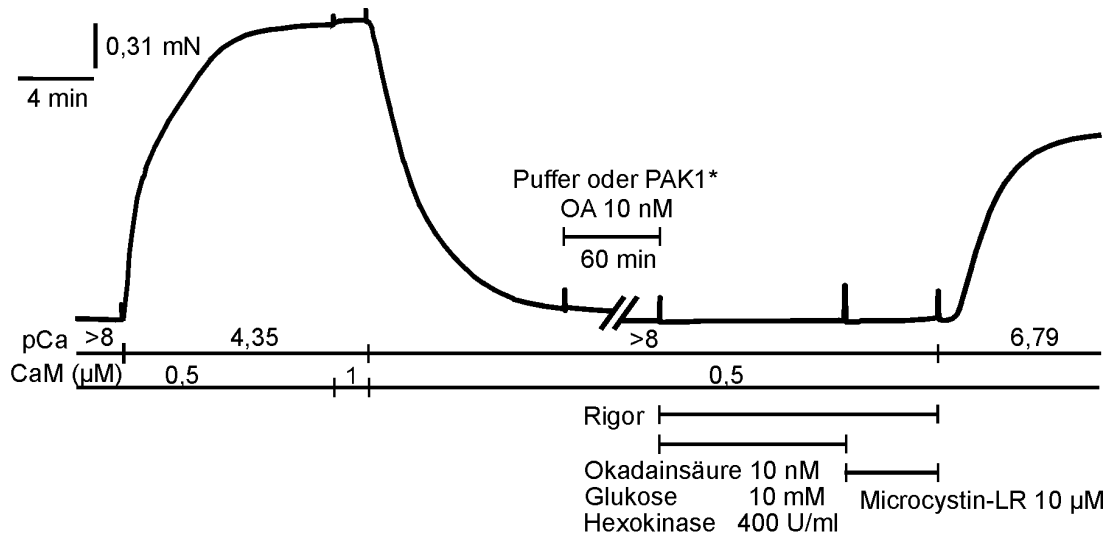
### 1.8 Effekt von PAK1\* auf die Aktivität der Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK)

Die Inhibierung der submaximalen Kraftentwicklung und der r-MLC-Phosphorylierung durch PAK1\* legt die Vermutung nahe, daß PAK1\* einen hemmenden Effekt auf die Myosin leichte Ketten Kinase (MLCK) hat. Diese Theorie kann mit Hilfe eines speziellen Meßprotokolls, das für diese Fragestellung nach einer Vorschrift von Lee [Lee et al., 1997a] modifiziert wurde, untersucht werden. Das Prinzip dieses Experiments beruht darauf, daß der Gegenspieler der MLCK, die Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP),



durch Inhibitoren gezielt ausgeschaltet wird. Wird unter diesen Bedingungen eine Kontraktion der Muskulatur ausgelöst, ist deren Verlauf ganz allein von der Aktivität der MLCK bestimmt, so daß eine vorherige Manipulation der MLCK-Aktivität direkt ersichtlich wird.

Abbildung IV-24 zeigt den Ablauf des Meßprotokolls anhand einer Originalregistrierung der Kraft.



**Abb. IV-24:** Meßprotokoll zur Ermittlung der MLCK-Aktivität.

Originalregistrierung der Kraft. Nach Induktion einer maximalen Referenzkontraktion (pCa 4,35, CaM 1 μM) werden die Fasern für 60 min in Relaxationslösung in Gegenwart von Puffer oder PAK1\* und Okadainsäure (OA) inkubiert. Anschließend erfolgt die Entfernung des ATP und die komplette Hemmung der MLCP mit Microcystin-LR, bevor eine abschließende Kontraktion bei niedriger Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (pCa 6,79) induziert wird.

Nach dem Einspannen der Fasern werden diese zunächst maximal mit pCa 4,35 und CaM 0,5 μM bzw. 1 μM stimuliert. Auf diese Maximalkraft werden alle anderen Kontraktionen normiert. Anschließend erfolgt wie in den bisher beschriebenen Experimenten eine einstündige Inkubation in Relaxationslösung in Gegenwart von PAK1\* bzw. Dialysat und Okadainsäure. Das Gewebe muß nun zunächst von ATP weitestgehend befreit werden. Dazu wird Ca<sup>2+</sup>- und ATP-freie Rigorlösung verwendet. Auch beim Entfernen des ATP aus der Reaktionslösung bleiben mikromolare Konzentrationen ATP im Gewebe zurück, die durchaus im Bereich der K<sub>M</sub>-Werte von Proteinkinasen liegen. Bei ersten Vorversuchen, in denen mit zusatzfreier Rigorlösung gearbeitet wurde, konnte daher

nach Inhibierung der MLCP schon nach 1-2 Minuten die Induktion einer zügig ansteigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion beobachtet werden. Erst die Zugabe von 10 mM Glukose und Hexokinase in einer Endkonzentration von 400 U/ml führt zur weitgehenden Unterbindung dieser Kontraktion. Glukose und Hexokinase bilden zusammen ein ATP-verbrauchendes System, da die Hexokinase unter Verwendung von ATP die Umwandlung der Glukose in Glukose-6-Phosphat und ADP katalysiert. Diese Reaktionslösung, in der die Muskelpräparate für 10 Minuten inkubiert werden, enthält außerdem auch den Phosphataseinhibitor Okadainsäure in einer Konzentration von 10 nM. Im nächsten Reaktionsschritt erfolgt die komplette Inhibierung der MLCP durch 5-minütige Inkubation in Rigorlösung mit 10  $\mu\text{M}$  Microcystin-LR (MC-LR). Im Vergleich zu Okadainsäure handelt es sich bei MC-LR um einen ausgesprochen potenten Phosphataseinhibitor, der sowohl Typ 2A als auch Typ 1 Proteinphosphatasen bei niedrigen Konzentrationen hemmt. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für PP2A liegt bei etwa 40 pM, der für PP1 bei ca. 1,7 nM, so daß bei einer gewählten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  von einer kompletten Inhibierung sowohl der MLCP als auch anderer Phosphatasen ausgegangen werden kann. MC-LR bindet an die Phosphatasen und führt durch kovalente Interaktionen zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms [MacKintosh et al., 1995]. Im Anschluß an die Hemmung der MLCP wird eine Kontraktion bei pCa 6,79, also bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, induziert. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist unter normalen Bedingungen, bei denen die Aktivitäten von MLCK und MLCP nicht beeinflußt wurden, nicht ausreichend, um eine Kontraktion der Triton-gehäuteten Muskelfasern der *Taenia caeci* auszulösen, wie auch aus der unter Abbildung IV-16 dargestellten Kraft- $[\text{Ca}^{2+}]$ -Beziehung klar hervorgeht.

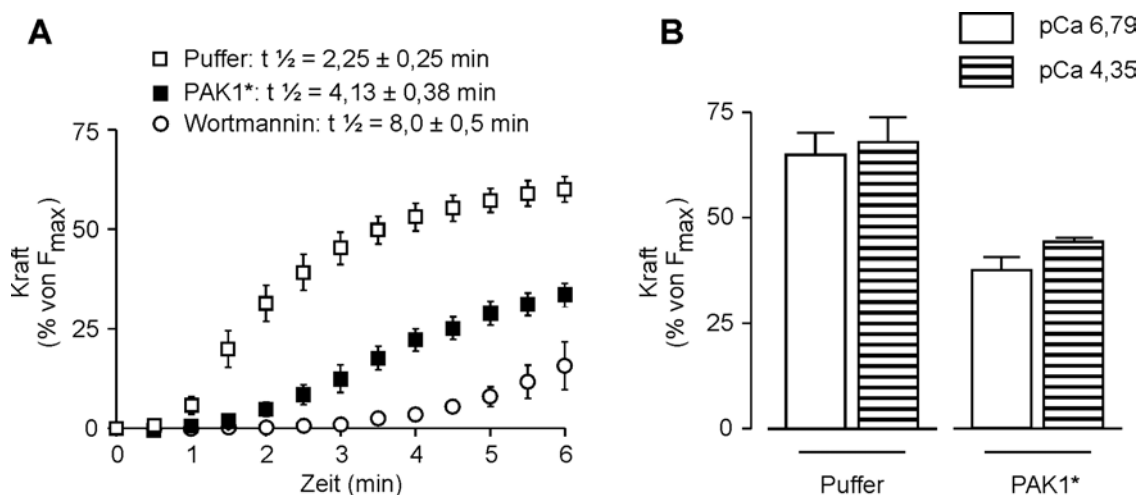
Um zu zeigen, daß es mit dem für diese spezielle Fragestellung optimierten Meßprotokoll in der Tat möglich ist, Effekte auf die MLCK-Aktivität reproduzierbar aufzulösen, wird in einem Kontrollansatz der MLCK-Inhibitor Wortmannin verwendet. Die 60-minütige Inkubation findet hier ohne PAK1\* bzw. Dialysat, jedoch weiterhin in Anwesenheit von 10 nM Okadainsäure statt. Im letzten Inkubationsschritt vor Induktion der Kontraktion wird dann allerdings nicht nur die MLCP mit MC-LR, sondern zusätzlich die MLCK mit Wortmannin (10  $\mu\text{M}$ ) gehemmt.

Der Kurvenverlauf der Kontraktion bei pCa 6,79 unter allen drei Versuchsbedingungen ist in Abbildung IV-25 A dargestellt. Wie deutlich ersichtlich ist, entwickelt die Pufferkontrolle unmittelbar eine schnell ansteigende Kontraktion, die bereits nach

ca. 2,3 min halbmaximal ist. Die Fasern erreichen eine maximale Kraft von ca. 63 % der Referenzkontraktion (Abb. IV-25; A) und eine nachträgliche maximale Stimulierung mit pCa 4,35 induziert kaum weitere Kraftentwicklung (Abb. IV-25; B).

Im Vergleich hierzu beginnt die Kraftentwicklung in den mit PAK1\* behandelten Fasern zeitlich eindeutig verzögert und ist auch in ihrem Anstieg signifikant inhibiert ( $t_{1/2} \sim 4,1$  min). Auch das maximale Kraftniveau, das die Fasern erreichen, bleibt mit ca. 43 % deutlich hinter dem der Pufferkontrolle zurück. Auch hier kann mit pCa 4,35 kaum eine zusätzliche Kontraktion induziert werden (Abb. IV-25; B).

Durch den MLCK-Inhibitor Wortmannin wird ein ähnlicher Kontraktionsverlauf induziert. Die Hemmung ist allerdings deutlich ausgeprägter als mit PAK1\*. Vor allem die  $t_{1/2}$ -Zeit ist mit einem Wert von ca. 8 min extrem verlangsamt, das maximale Kraftniveau dagegen steigt auch hier nach einer entsprechend langen Kontraktionszeit von ca. 15 Minuten auf 30-40 % an.



**Abb. IV-25:** PAK1\* hemmt die Aktivität der MLCK.

**A** Kurvenverlauf der abschließenden Kontraktion bei pCa 6,79 zur Ermittlung der MLCK-Aktivität nach dem in Abb. IV-24 beschriebenen Meßprotokoll. Dargestellt sind alle drei Meßbedingungen: nach Inkubation mit Puffer (n=4) bzw. PAK1\* (n=4) und nach Inhibierung der MLCK mit Wortmannin (n=4). Angegeben ist außerdem die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Kraft ( $t_{1/2}$ ). Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

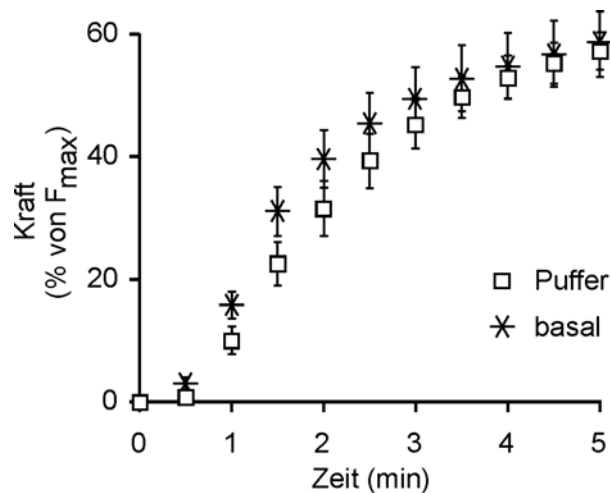
**B** Sowohl in der Pufferkontrolle als auch in den mit PAK1\*-behandelten Fasern kann mit maximaler Calciumstimulierung (pCa 4,35) kaum zusätzliche Kraft auf das Gleichgewicht der abschließenden Kontraktion bei pCa 6,79 induziert werden (n=3). Die Fasern wurden dem in Abb. IV-24 beschriebenen Meßprotokoll unterzogen und im Plateau der bei pCa 6,79 entwickelten Kraft abschließend maximal mit pCa 4,35 stimuliert.

Auch bei diesem experimentellen Ansatz kann die Inkubationszeit in Anwesenheit von PAK1\* auf 30 Minuten reduziert werden, ohne daß der inhibierende Effekt des rekombinanten Enzyms auf die Kraftentwicklung gemindert wird.

Es soll noch erwähnt werden, daß trotz der Verwendung von Hexokinase und Glukose als ATP-verbrauchendem System unter Einwirkung von Microcystin-LR in einigen Fällen die Induktion einer sehr langsamen Kontraktion in Rigorlösung beobachtet werden kann.

### 1.9 Auswirkung des Phosphataseinhibitors Okadainsäure auf die Bestimmung der MLCK-Aktivität

Ebenso wie für die Kraftmessungen unter Gleichgewichtsbedingungen beschrieben (s. IV-B; 1.3), werden auch für das in Kapitel IV-B 1.8 beschriebene Experiment die basalen Kontrollmessungen in Abwesenheit von Okadainsäure durchgeführt. Wie in Abbildung IV-26 dargestellt, scheint die initiale Phase in Abwesenheit von Okadainsäure leicht beschleunigt zu sein. Zu späteren Zeitpunkten gleichen sich die Kurven der Pufferkontrolle und der basalen Messungen allerdings wieder an und enden auf einem ähnlichen Kraftniveau von knapp 60 %.



**Abb. IV-26:** Der Phosphataseinhibitor Okadainsäure beeinflusst die Messungen zur Bestimmung der MLCK-Aktivität kaum.

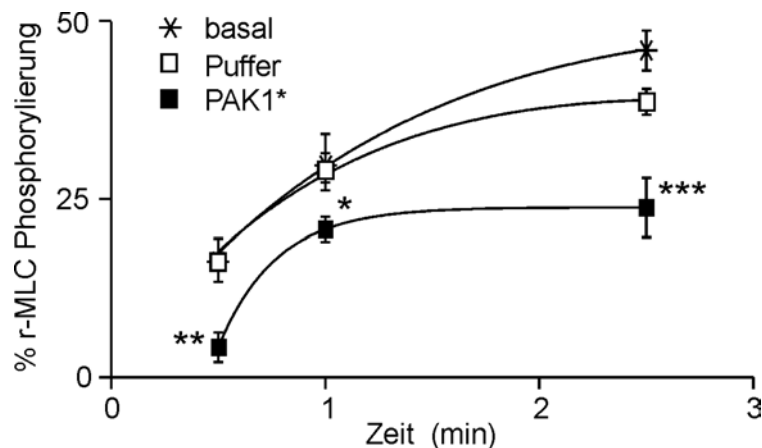
Dargestellt ist der Kurvenverlauf der abschließenden Kontraktion bei pCa 6,79 des in Abb. IV-24 beschriebenen Meßprotokolls.

Die 60-minütige Inkubation erfolgt hier in Anwesenheit von Okadainsäure (Puffer; n=4) oder ohne Zugabe des Phosphataseinhibitors (basal; n=5).

Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

### 1.10 Bedeutung von PAK1\* für die Rate der r-MLC-Phosphorylierung

Unter kompletter Inhibierung der MLCP kann die Rate der r-MLC-Phosphorylierung als eindeutiges und direktes Maß für die MLCK-Aktivität angesehen werden. Zur Analyse der r-MLC-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen werden die Fasern dem unter IV-B 1.8 ausführlich beschriebenen Protokoll unterzogen, zu drei Zeitpunkten nach Induktion der Kontraktion mit pCa 6,79 gestoppt und ausgewertet (s. III; 8). Da bekanntermaßen der Anstieg der r-MLC-Phosphorylierung bei der Kontraktion schneller erfolgt als der Anstieg der Kraft, werden zwei frühe (0,5 und 1 Minute) und ein mittlerer (2,5 Minuten) Zeitpunkt gewählt, um die Rate der r-MLC-Phosphorylierung auflösen zu können. Neben den Meßreihen mit PAK1\* und dem Dialysat wird auch wieder die „basale“ Versuchsserie ohne Okadainsäure durchgeführt (Abb. IV-27).



**Abb. IV-27:** PAK1\* hemmt die Rate der r-MLC-Phosphorylierung.

Darstellung der r-MLC-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Zeit bei Aktivierung mit pCa 6,79 unter vollständiger Inhibierung der MLCP (Meßprotokoll s. Abb. IV-24). Aufgetragen sind die Anteile an phosphorylierter r-MLC in % für alle drei Meßbedingungen (basal, Puffer, PAK1\*) und Zeitpunkte (0,5 min, 1 min, 2,5 min). Die genauen Werte können Tab. IV-4 entnommen werden. (\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

Die r-MLC-Phosphorylierung der Pufferkontrolle und der basalen Messungen verläuft im Anfangsbereich nahezu deckungsgleich; die nach 0,5 und 1 Minute ermittelten Phosphorylierungsgrade weichen nur marginal voneinander ab. Der späte Zeitwert dagegen

zeigt eine Diskrepanz, wobei die Pufferkontrolle mit einem Anteil an phosphorylierter r-MLC von ca. 38 % unter dem basalen Wert bleibt ( $45,9 \pm 2,8$  %). Unter Einwirkung von PAK1\* bleibt die r-MLC-Phosphorylierung zu allen drei Zeitpunkten signifikant unter den Werten der Pufferkontrolle. Hier werden Phosphorylierungsgrade von ca. 4 %, 21 % und 27 % gefunden.

Alle Daten zur Analyse der Rate der r-MLC-Phosphorylierung sind in Tabelle IV-4 detailliert aufgeführt.

**Tab. IV-4:** Daten zur Analyse der Rate der r-MLC-Phosphorylierung unter vollständiger Hemmung der MLCP bei Aktivierung mit pCa 6,79. Die vorangegangene Inkubation (Meßprotokoll s. Abb. IV-24) wurde in Abwesenheit von Okadainsäure (basal) bzw. in Anwesenheit des Phosphataseinhibitors in Gegenwart von Puffer oder PAK1\* durchgeführt. Angabe der Anteile phosphorylierter r-MLC in % der Gesamtmenge an r-MLC.

	<b>0,5 min</b>		<b>1 min</b>		<b>2,5 min</b>	
<b>basal</b>	16,4 $\pm$ 3,0 %	n=9	30,2 $\pm$ 3,9 %	n=11	45,9 $\pm$ 2,8 %	n=9
<b>Puffer</b>	16,4 $\pm$ 3,0 %	n=7	31,7 $\pm$ 1,9 %	n=6	38,7 $\pm$ 1,8 %	n=6
<b>PAK1*</b>	4,3 $\pm$ 2,0 %	n=8	20,8 $\pm$ 1,8 %	n=4	26,8 $\pm$ 3,6 %	n=5

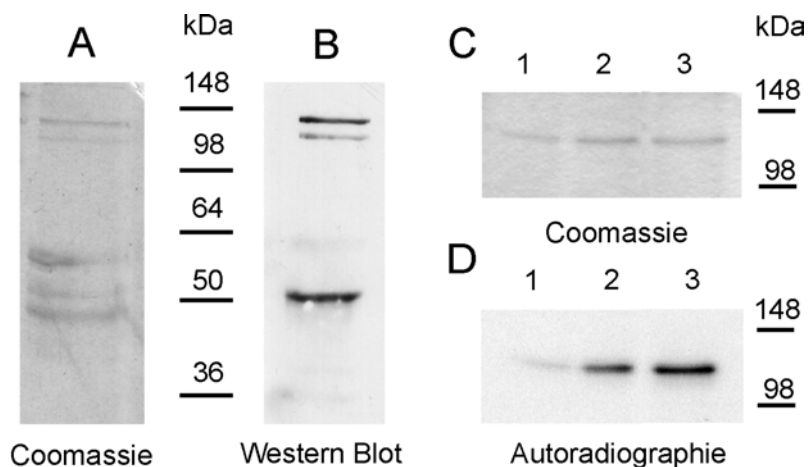
### 1.11 Untersuchung der Phosphorylierung der MLCK durch PAK1\*

Die beobachtete Hemmung der MLCK-Aktivität könnte durch eine von PAK1\* katalysierte Phosphorylierung der MLCK hervorgerufen werden. Um diese Hypothese zu verfolgen, werden Triton-gehäutete Taenia caeci-Fasern in Relaxationslösung, die PAK1\* (72  $\mu$ g/ml) bzw. Dialysat, Okadainsäure (10 nM) und radioaktiv markiertes [ $\gamma^{32}$ P]ATP enthält, für 60 Minuten inkubiert (s. III; 9). Anschließend werden die Fasern aufgearbeitet, die MLCK mittels Immunpräzipitation aus dem Homogenat isoliert (s. III; 6.2) und der Phosphorylierungszustand der MLCK in An- und Abwesenheit von PAK1\* analysiert. Der aufwendige Weg über die Immunpräzipitation ist in diesem Fall unumgänglich, da im glatten Muskel mehrere an der Regulation der Kontraktion direkt beteiligte Proteine im SDS-Gel das gleiche Laufverhalten aufweisen. Sowohl die MLCK als auch die regulatorische Untereinheit der Myosin leichte Ketten Phosphatase MYPT1 und

Caldesmon haben ein apparentes Molekulargewicht von 130 kDa und sind über eindimensionale Gelelektrophorese nicht voneinander zu trennen.

In nicht radioaktiven Vorversuchen ohne PAK1\* wird zunächst sichergestellt, daß die MLCK sauber aus den Muskelfasern isoliert werden kann.

Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel (Abb. IV-28; A) zeigt eine schwache, aber deutliche Doppelbande im Bereich von ca. 130 kDa, bei der es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die MLCK handelt. Bei ca. 50 kDa sind weitere Proteinbande zu erkennen, die naheliegender Weise auf die F<sub>c</sub>-Fragmente des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers zurückzuführen sind. Mit Hilfe eines zweiten, von dem in der Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper verschiedenen, anti-MLCK-Antikörpers, kann die Doppelbande bei 130 kDa eindeutig der MLCK zugeordnet werden (Abb. IV-28; B). Da beide verwendeten Erstantikörper dem gleichen Tier entstammen, wird natürlich der zur Immunpräzipitation verwendete anti-MLCK-Antikörper auf dem SDS-Gel vom Zweitantikörper ebenfalls erkannt. Dies erklärt das starke, bei einem Molekulargewicht von 50 kDa lokalisierte Signal auf dem Röntgenfilm.



**Abb. IV-28:** PAK1\* phosphoryliert die MLCK.

**A** Coomassie gefärbtes Gel und **B** korrespondierender anti-MLCK Western Blot einer MLCK-Immunpräzipitation. Gezeigt sind jeweils die Immunpräzipitate.

**C** Coomassie gefärbter Gelausschnitt der radioaktiv markierten MLCK-Immunpräzipitate und **D** korrespondierende Autoradiographie. Aufgetragen sind das Immunpräzipitat nach basaler Phosphorylierung in Abwesenheit von Okadainsäure (1) sowie die aus mit Puffer (2) bzw. PAK1\* (3) in Anwesenheit von Okadainsäure inkubierten Fasern präzipitierte MLCK.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker der Firma Novex verwendet.

Wird die Immunpräzipitation wie oben geschildert in An- bzw. Abwesenheit von PAK1\* und in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt, kann die Inkorporation von radioaktiv markiertem Phosphat in die MLCK mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Abbildung IV-28 zeigt einen Ausschnitt des gefärbten SDS-Gels mit den Immunpräzipitaten (C) und die dazu gehörende Autoradiographie (D). Spur 1 zeigt die basale Phosphorylierung der MLCK in Abwesenheit von Okadainsäure, Spur 2 die Pufferkontrolle und Spur 3 die aus PAK1\* behandelten Fasern immunpräzipitierte MLCK. Der Grad der MLCK-Phosphorylierung nimmt in den Versuchsansätzen in der Reihe basal < Pufferkontrolle < PAK1\* deutlich zu. Offensichtlich wirkt sich der Einsatz der Okadainsäure in diesem Experiment nachhaltig auf die Phosphorylierung der MLCK aus. Dennoch kann ein zusätzlicher Effekt von PAK1\* auf die MLCK-Phosphorylierung eindeutig gezeigt werden. Zur quantitativen Auswertung werden die Signale der Autoradiographie mit der Intensität der Proteinbanden im gefärbten SDS-Gel abgeglichen. Im Vergleich zur Pufferkontrolle, die als Referenz auf 100 % gesetzt wird, beträgt die Inkorporation von radioaktiv markiertem Phosphat in die MLCK der basalen Kontrolle nur 64 %, während in den mit PAK1\* inkubierten Fasern ein gesteigerter Phosphateinbau von ca. 140 % erreicht wird.

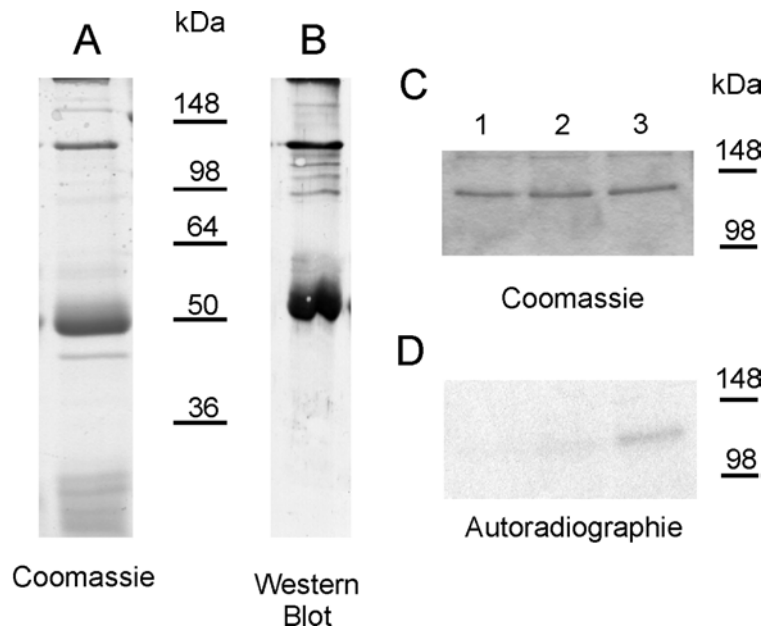
### **1.12 Analyse der Phosphorylierung des Caldesmons durch PAK1\***

Caldesmon scheint, wie in der Einleitung dargestellt, an der Modulation der glattmuskulären Kontraktion und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente beteiligt zu sein, wobei der Phosphorylierung des Caldesmons eine wichtige regulatorische Rolle zukommt (s. I; 4.2.2). Da Caldesmon außerdem bereits als ein Substrat für die p21-aktivierten Proteinkinasen, nämlich speziell für PAK3 [Van Eyk et al., 1998], identifiziert worden ist, soll im Rahmen dieser Arbeit auch die mögliche Phosphorylierung des Caldesmons durch PAK1\* untersucht werden. Caldesmon wird dafür ebenso wie die MLCK nach Inkubation von gehäuteten *Taenia caeci*-Fasern mit PAK1\* und in Gegenwart von radioaktiv markiertem [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP mittels Immunpräzipitation aus dem Gewebe isoliert.

Wie Vorversuche zeigen (Abb. IV-29; A und B), enthält das Caldesmon-Immunpräzipitat neben einer Bande von ca. 130 kDa, die wahrscheinlich das Caldesmon selbst darstellt, und dem Antikörpersignal bei ca. 50 kDa noch weitere Proteinbanden. Auch hier kann jedoch das bei ca. 130 kDa lokalisierte Protein mit Hilfe eines zweiten anti-Caldesmon



Antikörpers eindeutig als Caldesmon identifiziert werden. Außerdem werden im Western Blot auch einige Degradationsprodukten des Caldesmons vom Antikörper erkannt. Bei diesen Experimenten stammen wiederum beide verwendeten Erstantikörper aus der gleichen Spezies, so daß auf dem Röntgenfilm auch hier ein zusätzliches Signal bei ca. 50 kDa beobachtet werden kann (Abb. IV-29; B).



**Abb. IV-29:** PAK1\* phosphoryliert Caldesmon kaum.

**A** Coomassie gefärbtes Gel und **B** korrespondierender anti-Caldesmon Western Blot einer Caldesmon-Immunpräzipitation. Gezeigt sind jeweils die Immunpräzipitate.

**C** Coomassie gefärbter Gelausschnitt der radioaktiv markierten Caldesmon-Immunpräzipitate und **D** korrespondierende Autoradiographie. Aufgetragen sind das Immunpräzipitat nach basaler Phosphorylierung in Abwesenheit von Okadainsäure (1) sowie das aus mit Puffer (2) bzw. PAK1\* (3) in Anwesenheit von Okadainsäure inkubierten Fasern präzipitierte Caldesmon.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker der Firma Novex verwendet.

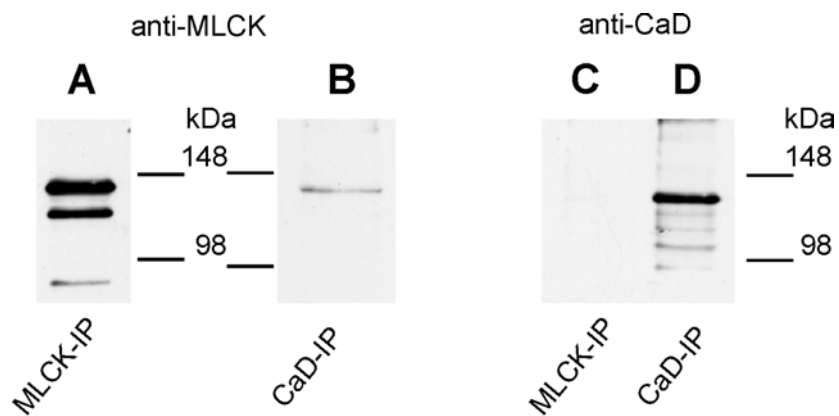
Abbildung IV-29 zeigt den Ausschnitt eines Coomassie-gefärbten Gels (C) und die dazu gehörenden Autoradiographie (D) einer Caldesmon-Immunpräzipitation nach Inkubation von Triton-gehäuteten *Taenia caeci*-Fasern in Ab- und Anwesenheit von PAK1\* (Spur 2 und 3) und in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP. Auch hier wird ein Experiment zur Untersuchung der basalen Phosphorylierung in Abwesenheit von Okadainsäure (Spur 1) durchgeführt. Anhand des gefärbten Gels wird ersichtlich, daß im Vergleich zur

MLCK-Präzipitation (Abb. IV-28; C) deutlich mehr Protein in den einzelnen Gelspuren detektiert wird. Da beide Proteine beim gleichen apparenten Molekulargewicht laufen, kann diese unterschiedliche Färbung direkt als ein Maß für die relativen Proteinkonzentrationen angesehen werden. Es wird also eindeutig mehr Caldesmon aus den Fasern isoliert als MLCK. Die Autoradiographie dagegen zeigt, daß unter allen drei gewählten Bedingungen die Phosphorylierung des Caldesmons kaum detektierbar ist. Die Bandenintensität ist im Vergleich zur MLCK-Autoradiographie (Abb. IV-28; D) verschwindend gering. Da beide Filme nach der gleichen Expositionszeit entwickelt wurden, ist also der Einbau an radioaktiv markiertem Phosphat in Caldesmon wesentlich geringer als in die MLCK unter gleichen Versuchsbedingungen. Wird auch hier jeweils das Signal der Autoradiographie mit dem der korrespondierenden Coomassie-Färbung abgeglichen, ergibt sich in den Caldesmon-Immunpräzipitaten eine um den Faktor 30 geringere Phosphatinkorporation als in den MLCK-Banden. Auch hier zeigt sich allerdings, daß der Phosphorylierungsgrad des Caldesmons je nach der gewählten Versuchsbedingung unterschiedlich ausfällt. Die Abstufung ist ähnlich wie bei der MLCK-Immunpräzipitation: Setzt man die Pufferkontrolle als Referenz auf 100 %, wird unter basalen Bedingungen die niedrigste (53 %), nach Inkubation mit PAK1\* die stärkste Phosphatinkorporation erreicht. Der Unterschied des Phosphorylierungsgrades zwischen dem aus PAK1\* behandelten Fasern präzipitierten Caldesmon und dem Caldesmon der Pufferkontrolle beträgt ähnlich wie bei der MLCK etwa 140 %.

### **1.13 Test auf Kreuzreaktion der MLCK- und Caldesmon-Immunpräzipitate**

Da es sich in mehreren Vorversuchen als schwierig heraus gestellt hat, das Caldesmon ohne Verunreinigung mit MLCK zu präzipitieren, geht der Caldesmonpräzipitation immer, wie in den Methoden beschrieben (s. III; 6.2), die Fällung der MLCK voraus. Dennoch ist es auch in dem in IV-B 1.12 beschriebenen radioaktiven Experiment nicht möglich gewesen, diese Verunreinigung komplett zu unterbinden. Ein Teil der MLCK- und der Caldesmon-Immunpräzipitate wurde nach der Gelelektrophorese mittels Western Blot Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und jeweils eine Immunreaktion mit Antikörpern gegen MLCK bzw. Caldesmon durchgeführt. Die Inkubation der MLCK-Präzipitate mit einem anti-MLCK-Antikörper und der Caldesmon-Präzipitate mit einem Antikörper gegen Caldesmon, führt auf dem Röntgenfilm nach der ECL-Entwicklung des

Blots zu sehr starken und deutlichen Signalen (Abb. IV-30; A und D). Wird für die Immunreaktion jeweils der gegen das andere Protein gerichtete Antikörper verwendet, also z.B. der anti-MLCK-Antikörper für die Caldesmon-Spuren, wird deutlich, daß es in den Caldesmon-Präzipitaten eine schwache, aber eindeutig erkennbare Kontamination mit MLCK gibt (Abb. IV-30; B). Die MLCK-Präzipitate dagegen zeigen keine Kreuzreaktion mit dem Caldesmon-Antikörper (Abb. IV-30; C).



**Abb. IV-30:** Das Caldesmon-Immunpräzipitat zeigt eine Kreuzreaktion mit einem anti-MLCK-Antikörper, während das MLCK-Immunpräzipitat nicht mit Caldesmon verunreinigt ist.

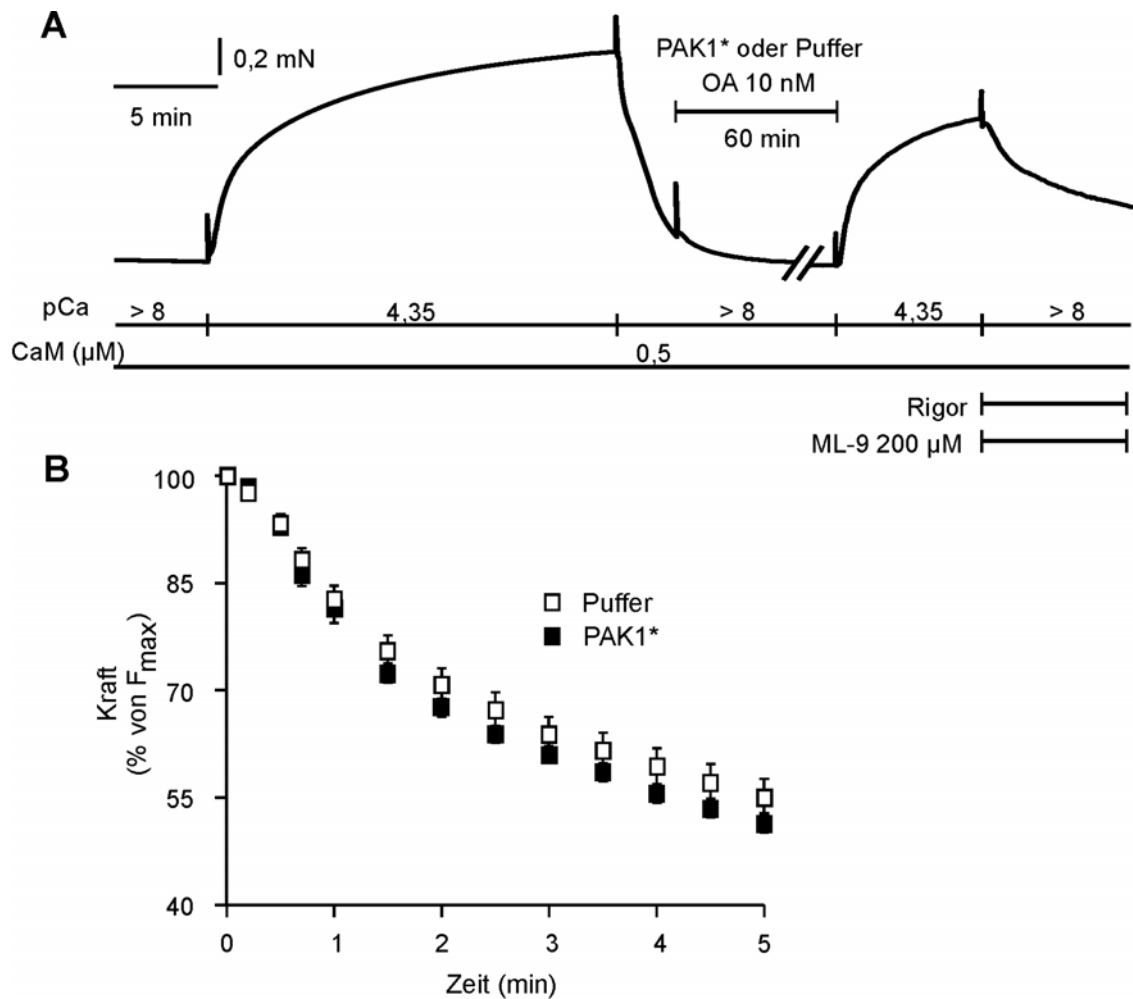
**A-D** Western Blots von MLCK- und Caldesmon-Immunpräzipitaten entwickelt mit einem anti-MLCK (A und B) bzw. einem anti-Caldesmon-Antikörper (C und D). Als Molekulargewichtsstandard wurde der SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker der Firma Novex verwendet.

#### 1.14 Einfluß von PAK1\* auf die Aktivität der Myosin leichte Ketten Phosphatase (MLCP)

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die bei einer bestimmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration entwickelte Kraft stark von dem Aktivitätsgleichgewicht zwischen den Gegenspielern MLCK und MLCP abhängig. Eine gehemmte Kraftentwicklung, wie sie unter dem Einfluß von PAK1\* beobachtet werden kann, ist demnach nicht nur über eine Inhibierung der MLCK, sondern ebenso über eine Aktivierung der MLCP zu erklären. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob PAK1\* die Aktivität der MLCP beeinflussen kann.

Analog zu den unter Punkt IV-B 1.8 beschriebenen Experimenten zur Analyse der MLCK-Aktivität kann der Verlauf der Relaxation unter kompletter Inhibierung der MLCK als ein erstes Maß für die MLCP-Aktivität angenommen werden.

Zur Durchführung dieser Experimente kommt erneut ein Meßprotokoll nach Lee [Lee et al., 1997a], das für die aktuelle Problemstellung optimiert wurde, zur Verwendung (Abb. IV-31).



**Abb. IV-31:** PAK1\* hat keinen Einfluß auf die Aktivität der MLCP.

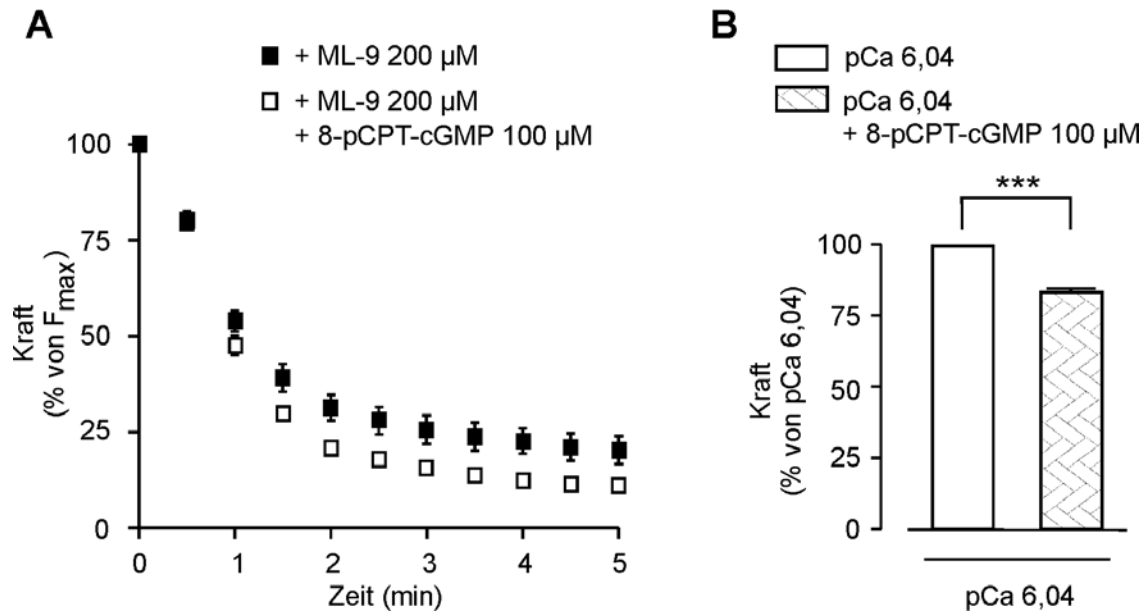
**A** Darstellung des Meßprotokolls anhand einer Originalregistrierung der Kraft. Nach dem Einspannen in die Apparatur werden die *Taenia caeci*-Fasern maximal stimuliert (pCa 4,35, CaM 0,5 µM) und anschließend für 60 Minuten in Gegenwart von Puffer bzw. PAK1\* und Okadainsäure (OA) inkubiert. Die schnelle Relaxation in Rigorlösung in Gegenwart des MLCK-Inhibitors ML-9 wird im Plateau der zweiten maximalen Kontraktion induziert.

**B** Kurvenverlauf der Rigor-Relaxation der *Taenia caeci*-Fasern nach Inkubation mit Puffer (n=7) bzw. PAK1\* (n=7). Angegeben ist die Kraft in % der zweiten maximalen Stimulierung bei pCa 4,35 und CaM 0,5 µM. Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

Nachdem die Triton-gehäuteten Taenia caeci-Fasern in Relaxationslösung in der Apparatur eingespannt wurden, wird eine maximale Kontraktion mit pCa 4,35, CaM 0,5  $\mu\text{M}$  ausgelöst. Anschließend erfolgt die typische 60-minütige Inkubation in Relaxationslösung mit PAK1\* bzw. Dialysat und Okadainsäure. Es wird dann erneut maximal stimuliert und im Plateau dieser Kraft eine schnelle Relaxation unter  $\text{Ca}^{2+}$ - und ATP-freien Bedingungen in Rigorlösung ausgelöst. Diese Rigorlösung enthält zusätzlich den MLCK-Inhibitor ML-9 in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ , so daß eine vollständige Hemmung der MLCK erreicht sein sollte. Der Verlauf der Relaxation ist demnach nur noch von der Aktivität der MLCP bestimmt. Als Bezugskontraktion wird in diesen Experimenten die zweite maximale Stimulierung bei pCa 4,35 und CaM 0,5  $\mu\text{M}$  verwendet.

Die Gegenüberstellung der Relaxation in An- und Abwesenheit von PAK1\* zeigt, daß es im Kurvenverlauf keinen signifikanten Unterschied gibt. Beide Kurven zeigen einen biphasischen Verlauf, mit einer schnellen linearen Phase am Anfang, gefolgt von einem langsameren exponentiellen Abfall (Abb. IV-31; B).

Auch hier wird mit Hilfe einer Positivkontrolle überprüft, ob das für die gegebene Fragestellung optimierte Meßprotokoll für die reproduzierbare Auflösung des zu untersuchenden Effekts geeignet ist. Das zyklische Nukleotid cGMP ist als Aktivator der MLCP bekannt [Lee et al., 1997a]. In Anwesenheit von cGMP sollte daher der Verlauf der Relaxation im Vergleich zu Kontrollmessungen beschleunigt sein. Diese Experimente werden in mit  $\beta$ -Escin permeabilisierten Ileumfasern des Meerschweinchens durchgeführt, da die für die Wirkung des cGMP benötigte PKG beim Häuten mit Triton X-100 aus dem Gewebe verloren geht. Das Meßprotokoll folgt bis auf einige kleine Änderungen dem oben beschriebenen Verlauf. Die Ileumfasern werden in intaktem Zustand in die Apparatur eingespannt und der Permeabilisierung mit  $\beta$ -Escin (s. III; 1.4.1) unterzogen. Anschließend wird eine maximale Kontraktion mit pCa 4,35 und CaM 0,5  $\mu\text{M}$  induziert und im Gleichgewicht dieser Kraft direkt die schnelle Relaxation in Rigorlösung mit 200  $\mu\text{M}$  ML-9 in An- und Abwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  8-pCPT-cGMP eingeleitet (Abb. IV-32). Da der Verlauf der Relaxation in den  $\beta$ -Escin-Fasern insbesondere initial sehr schnell verläuft und eine optimale Auflösung der Relaxation unter Standardbedingungen nicht möglich ist, wird die Temperatur bei diesem Experiment auf 16 °C gesenkt. Dadurch kommt es zu einer generellen Verlangsamung der Relaxation, so daß eine bessere Auflösung erreicht werden kann.



**Abb. IV-32:** cGMP beschleunigt die Rate der Relaxation und inhibiert die submaximale Kraftentwicklung unter Gleichgewichtsbedingungen in mit  $\beta$ -Escin permeabilisierten Ileumfasern.

**A** Kurvenverlauf der Relaxation von  $\beta$ -Escin permeabilisierten Ileumfasern in An- und Abwesenheit von 100  $\mu$ M 8-pCPT-cGMP (n=6-8). Das Meßprotokoll folgt bis auf im Text erwähnte Änderungen dem in Abb. IV-31 A dargestellten Verlauf. Die Kräfte sind dargestellt als % der Maximalkraft bei pCa 4,35 und CaM 0,5  $\mu$ M. Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

**B** Effekt von 8-pCPT-cGMP auf die isometrische Kraft von  $\beta$ -Escin permeabilisierten Ileumfasern unter Gleichgewichtsbedingungen. Die Fasern werden submaximal mit pCa 6,04 stimuliert und im Gleichgewicht der Kraft mit 8-pCPT-cGMP in einer Endkonzentration von 30  $\mu$ M inkubiert bis sich erneut ein Gleichgewicht eingestellt hat (n=3). Die gemessenen Kräfte sind angegeben als % der submaximalen Stimulierung (pCa 6,04) vor Inkubation mit 8-cCPT-cGMP (\*\*\*) P<0,001).

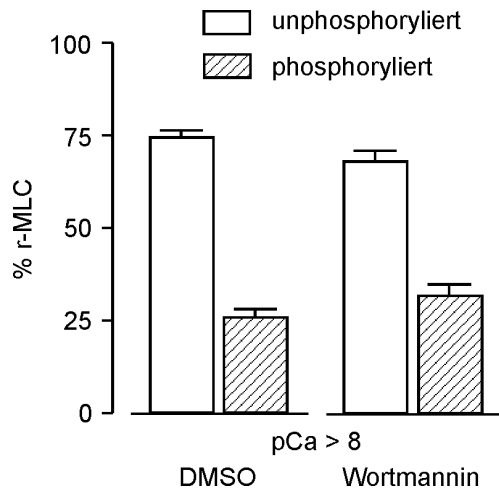
Aus Abbildung IV-32 A geht hervor, daß es in Anwesenheit von cGMP zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung der Rate der Relaxation kommt. Daß dieser Effekt in der Tat auf eine Wirkung des cGMP zurückgeführt werden kann, ist in Abbildung IV-32 B gezeigt. Werden  $\beta$ -Escin-Fasern submaximal stimuliert (hier: pCa 6,04) und im Gleichgewicht der Kraft mit cGMP behandelt, kann schon mit Konzentrationen von 30  $\mu$ M eine Relaxation der Muskelfasern ausgelöst werden. Dieser Effekt ist, ebenso wie bei der Rate der Relaxation, gering. Selbst nach Erhöhung der cGMP-Konzentration auf 100  $\mu$ M kommt es lediglich zu einer ca. 17 %igen Hemmung der Kraft.

## **1.15 Bedeutung von PAK1\* für die Aktivität Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Proteinkinasen**

### **1.15.1 Abhängigkeit der r-MLC-Phosphorylierung unter relaxierten Gleichgewichtsbedingungen vom MLCK-Inhibitor Wortmannin**

Bei den Untersuchungen zur Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II unter Gleichgewichtsbedingungen (s. IV-B; 1.7) konnte gezeigt werden, daß es in Gegenwart von PAK1\* zu einer Reduktion der Phosphorylierung kommt. Interessanterweise ist dieser Effekt nicht auf die r-MLC-Phosphorylierung unter submaximaler Aktivierung begrenzt, sondern auch im relaxierten Muskel zu beobachten. Unter Relaxationsbedingungen ist der Beitrag der MLCK zur r-MLC-Phosphorylierung noch nicht zweifelsfrei geklärt [Weber et al., 1999 und 2000]. Um zu untersuchen, ob die beobachtete Hemmung der r-MLC-Phosphorylierung unter relaxierten Bedingungen durch eine Inhibierung der MLCK durch PAK1\* zustande kommen kann, wird ein analoges Experiment mit dem MLCK-Inhibitor Wortmannin durchgeführt. Die Taenia caeci-Fasern werden dafür zunächst submaximal und maximal kontrahiert und dann in Relaxationslösung in Gegenwart von Okadainsäure (10 nM) und mit bzw. ohne 10 µM Wortmannin für ca. 20 min inkubiert. Die Phosphorylierungslevel der gestoppten Fasern werden mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Wie in Vorversuchen festgestellt wurde, hat die Reduktion der Inkubationszeit in Relaxationslösung mit Okadainsäure von 60 auf 20 min keinen Einfluß auf das Maß der r-MLC-Phosphorylierung.

Die graphische Darstellung der Meßdaten (Abb. IV-33) zeigt, daß Wortmannin unter relaxierten Bedingungen nicht zu einer Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung führt. Die Anteile an phosphorylierter r-MLC betragen  $26,0 \pm 1,9\%$  in Abwesenheit bzw.  $31,9 \pm 2,8\%$  in Anwesenheit von Wortmannin.



**Abb. IV-33:** Der MLCK-Inhibitor Wortmannin hat keinen Einfluß auf die r-MLC-Phosphorylierung unter relaxierten Gleichgewichtsbedingungen. Anteil an unphosphorylierter und phosphorylierter r-MLC nach Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von Wortmannin angegeben in % des Gesamtgehaltes an r-MLC (n=7-9).

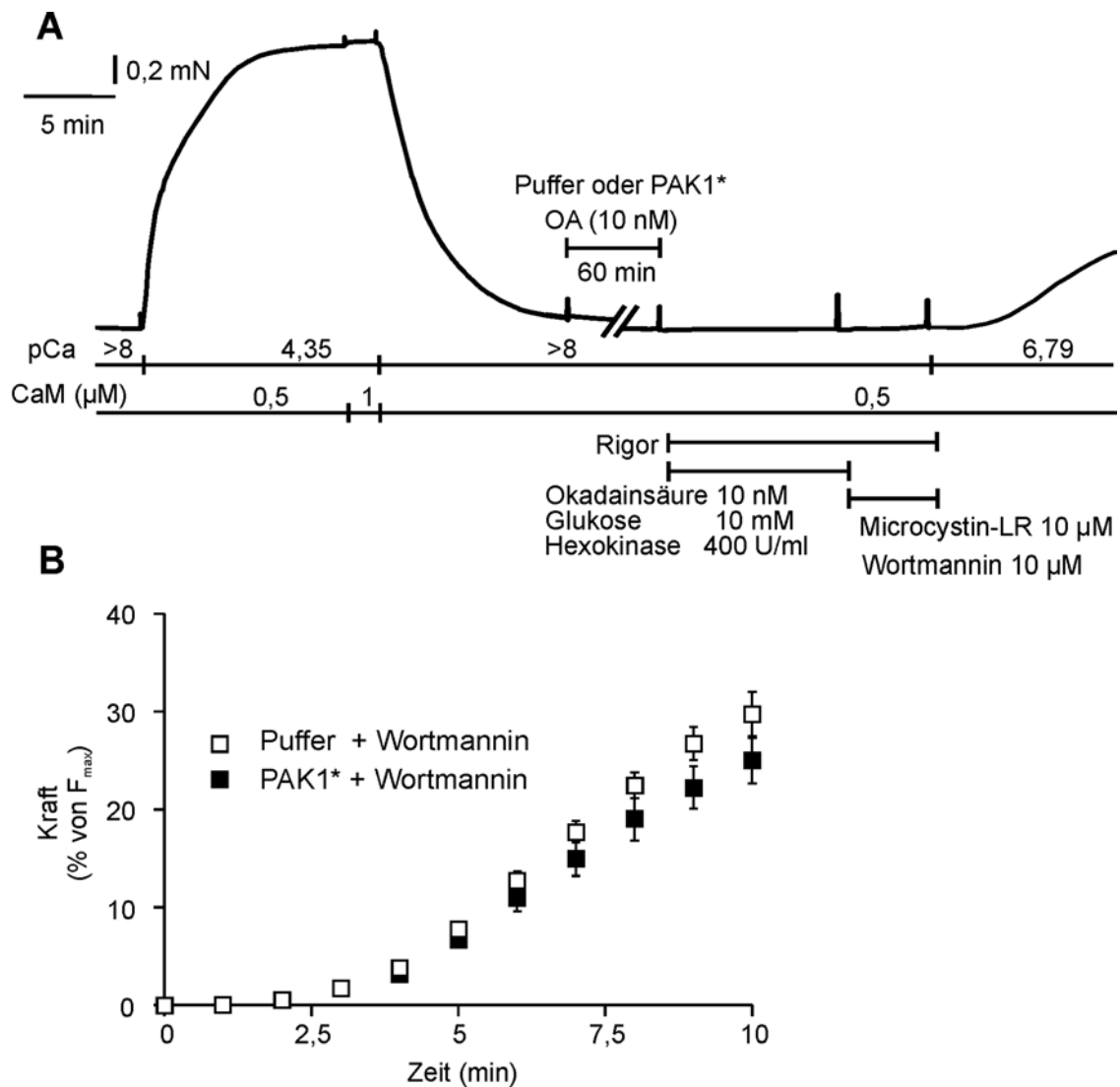
### 1.15.2 Effekt von PAK1\* auf $\text{Ca}^{2+}$ - und MLCK-unabhängige Kontraktionen

Die gerade geschilderten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die Hemmung der MLCK durch PAK1\* nicht für die beobachtete Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung verantwortlich ist.  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Proteinkinasen wie die Rho-Kinase (ROK) und die Integrin-gekoppelte Kinase (ILK) könnten an der basalen r-MLC-Phosphorylierung zumindest zum Teil beteiligt sein. Die beobachtete Hemmung der r-MLC-Phosphorylierung unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen könnte dann über eine Modulation der Aktivität dieser Kinasen durch PAK1\* erklärt werden. Um den Einfluß von PAK1\* auf die wahrscheinlich durch diese Kinasen vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ - und MLCK-unabhängigen Kontraktionen zu untersuchen, werden zwei verschiedene Reaktionsansätze verwendet.

Bei der Analyse der Rate der Kontraktion (s. IV-B; 1.8) wurden als Positivkontrolle des Meßprotokolls Experimente mit dem MLCK-Inhibitor Wortmannin durchgeführt. In Anwesenheit von Wortmannin konnte eine starke Hemmung der Kontraktilität beobachtet werden, die allerdings nicht komplett war. Dies könnte unter anderem daran liegen, daß die gerade erwähnten  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kinasen eine Phosphorylierung der r-MLC katalysieren und damit die beobachtete Kontraktion auslösen. Um zu testen, ob PAK1\* diese Kinasen in ihrer Aktivität beeinflussen kann, wird dieses Experiment in An- und Abwesenheit von PAK1\* erneut durchgeführt. In diesem Fall ist eine vollständige Hemmung der MLCK durch Wortmannin und PAK1\* erreicht, so daß ein zusätzlicher Effekt von PAK1\* auf andere Kinasen direkt am Kontraktionsverlauf zu erkennen wäre. Der Meßverlauf folgt dem unter IV-B 1.8 beschriebenen Protokoll und ist in



Abbildung IV-34 A noch einmal kurz graphisch dargestellt. Alle Meßwerte werden auf die erste maximale Kraftentwicklung bei pCa 4,35 und CaM 1  $\mu\text{M}$  bezogen.



**Abb. IV-34:** PAK1\* scheint außer der MLCK keine weiteren an der r-MLC-Phosphorylierung beteiligten Kinasen zu beeinflussen.

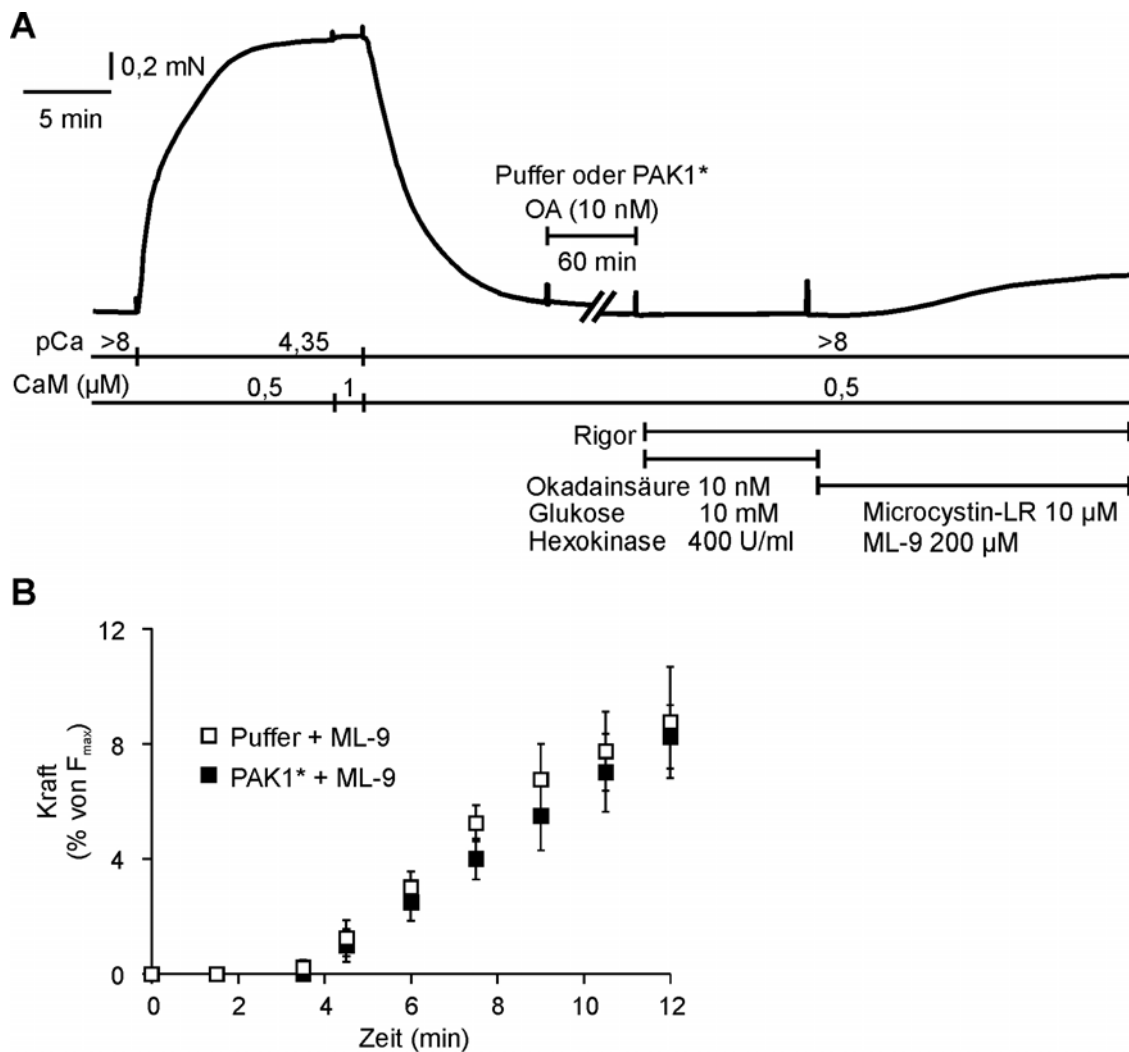
**A** Darstellung des Meßprotokolls anhand einer Originalregistrierung der Kraft. Nach Induktion einer maximalen Referenzkontraktion, Inkubation mit Puffer bzw. PAK1\* in Gegenwart von Okadainsäure (OA) und Reduktion des ATP erfolgt die komplette Inhibierung von MLCP und MLCK mit Microcystin-LR bzw. Wortmannin. Abschließend wird eine Kontraktion bei niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (pCa 6,79) induziert.

**B** Kurvenverlauf der abschließenden Kontraktion (pCa 6,79) im obigen Meßprotokoll nach Inkubation mit Puffer (n=4) bzw. PAK1\* (n=4). Die Kräfte sind angegeben als % der ersten Maximalkraft bei pCa 4,35 und CaM 1  $\mu\text{M}$ . Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

Die Zusammenstellung der Meßergebnisse (Abb. IV-34; B) zeigt, daß der Kurvenverlauf in An- und Abwesenheit von PAK1\* nicht sehr unterschiedlich ist. Die Anfangsphase der Kontraktion verläuft deckungsgleich, zu späteren Zeitpunkten kommt es zu einer leichten Abweichung der PAK1\*-Fasern hin zu niedrigeren Kraftwerten.

In einem zweiten Ansatz zur Klärung der Fragestellung wird ein anderer MLCK-Inhibitor verwendet und die Kontraktion unter Rigorbedingungen betrachtet. Wie bereits erwähnt (s. IV-B; 1.8), kann im Verlauf des MLCK-Raten-Meßprotokolls (Abb. IV-24) in vielen Fällen nach vollständiger Inhibierung der MLCP eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion in Rigorlösung beobachtet werden. Auch hier kann eine Beteiligung der MLCK nicht ganz ausgeschlossen werden, ist zumindest aber sehr unwahrscheinlich. Für die Induktion dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion sind mit höherer Wahrscheinlichkeit die bereits erwähnten  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kinasen verantwortlich. Es ist demnach möglich, den potentiellen Einfluß von PAK1\* auf die Aktivität dieser Kinasen am Verlauf dieser Kontraktion zu untersuchen. Dazu wird erneut zusätzlich zur Hemmung der MLCP die MLCK vollständig inhibiert, wobei diesmal ML-9 in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  als MLCK-Inhibitor verwendet wird. Werden die Präparate außerdem in An- und Abwesenheit von PAK1\* inkubiert, sollte ein eventuell vorhandener Effekt von PAK1\* auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion detektierbar sein. Der genaue Ablauf des Meßprotokolls ist in Abbildung IV-35 A kurz wiedergegeben, als Bezugswert wird die erste maximale Stimulierung (pCa 4,35 und CaM 1  $\mu\text{M}$ ) herangezogen.

Ein Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion der mit PAK1\* inkubierten Fasern mit der Pufferkontrolle läßt keinen Unterschied im Kontraktionsverlauf erkennen (Abb. IV-35; B). Beide Präparate starten nach ca. 3 bis 4 Minuten mit einer sehr langsam ansteigenden Kraftentwicklung, die nach ca. 15 Minuten einen Wert von etwa 8,5 % der Referenzkontraktion erreicht. Beide Meßreihen weisen hier recht hohe Fehlerbalken auf.



**Abb. IV-35:** PAK1\* scheint keinen Einfluß auf die  $Ca^{2+}$ - und MLCK-unabhängige Kontraktion in Rigorlösung zu haben.

**A** Darstellung des Meßprotokolls anhand einer Originalregistrierung der Kraft. Erneut wird zunächst eine maximale Referenzkontraktion induziert, die Präparate dann mit Puffer bzw. PAK1\* in Gegenwart von Okadainsäure (OA) inkubiert und das ATP weitestgehend entfernt. Anschließend werden MLCP und MLCK mit Microcystin-LR bzw. ML-9 komplett inhibiert und die Kontraktion in Rigorlösung bei  $pCa > 8$  aufgezeichnet.

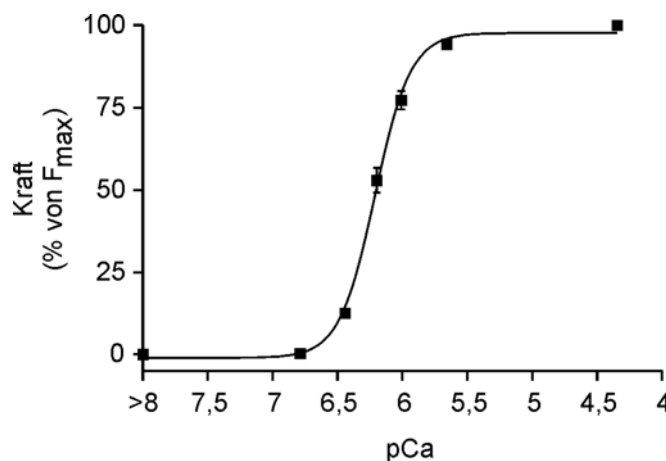
**B** Kurvenverlauf der  $Ca^{2+}$ - und MLCK-unabhängigen Kontraktion in Rigorlösung ( $pCa > 8$ ) im obigen Meßprotokoll nach Inkubation mit Puffer ( $n=5$ ) bzw. PAK1\* ( $n=4$ ). Die Kräfte sind angegeben als % der ersten Maximalkraft bei  $pCa$  4,35 und CaM 1  $\mu M$ . Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

## 2 Untersuchungen an permeabilisierter *A. carotis communis* des Kaninchens

Analog zu den Untersuchungen mit den permeabilisierten Fasern der *Taenia caeci*, die zur glatten Darmmuskulatur gehören, sollen Messungen an permeabilisierten Gefäßmuskeln vorgenommen werden. In diesen Versuchsreihen soll ermittelt werden, ob die p21-aktivierte Proteinkinase 1 in den einzelnen glattmuskulären Geweben eventuell unterschiedliche Effekte hervorruft oder ob die PAK1-Signalkaskade vielleicht einen anderen Stellenwert bei der Regulation der Kontraktion einnimmt.

### 2.1 Charakterisierung der mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate

Analog zu der oben beschriebenen Charakterisierung der *Taenia caeci*-Fasern (IV-B; 1.1) werden Daten für die *A. carotis communis* des Kaninchens ermittelt. Die Kraft- $[Ca^{2+}]$ -Beziehung verläuft hier ähnlich wie bei den Fasern der *Taenia caeci* und hat einen  $pCa_{50}$  von  $6,21 \pm 0,02$  (Abb. IV-36).



**Abb. IV-36:** Kraft- $[Ca^{2+}]$ -Beziehung der mit Triton X-100 permeabilisierten *A. carotis communis* des Kaninchens. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von kumulativ aufsteigenden  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen ( $n=4$ ). Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

## **2.2 Einfluß von PAK1\* auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen**

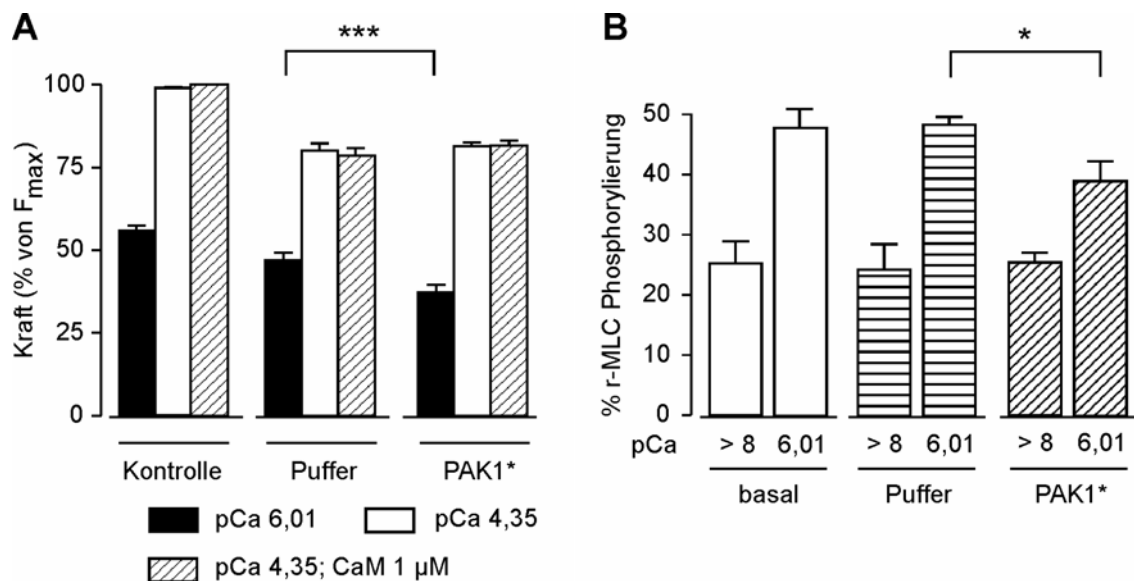
Um den Effekt von PAK1\* auf die Kontraktion der *A. carotis communis* des Kaninchens zu untersuchen, wird prinzipiell das gleiche Protokoll wie für die *Taenia caeci*-Messungen verwendet (s. IV-B; 1.2; Abb. IV-17; A). Die Ringe werden submaximal und maximal stimuliert, wobei aufgrund der leicht unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität als submaximale Aktivierungsstufe ein pCa von 6,01 verwendet wird. Anschließend erfolgt auch hier die Inkubation der Präparate in Anwesenheit von PAK1\* bzw. Dialysat und 10 nM Okadainsäure. Die beiden anschließenden Kontraktionen werden erneut bei pCa 6,01 und pCa 4,35, CaM 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. CaM 1  $\mu\text{M}$  ausgelöst. Die Normierung aller Kräfte erfolgt auf die erste maximale Stimulierung in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Calmodulin (Abb. IV-37; A).

Die Pufferkontrolle verhält sich in diesem Experiment ähnlich wie die der *Taenia caeci*-Fasern. Die submaximale Kraftentwicklung vor und nach der Inkubation ist nicht verändert ( $55,8 \pm 1,8 \%$  bzw.  $47,1 \pm 2,2 \%$ ), während die maximale Kontraktionskraft unabhängig von der gewählten Calmodulinkonzentration um ca. 20 % abnimmt. Der Effekt von PAK1\* auf die Kontraktion der Triton-gehäuteten *A. carotis communis* des Kaninchens ist allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als in der *Taenia caeci*. Die mit PAK1\* inkubierten Präparate zeigen lediglich eine leichte aber dennoch signifikante Hemmung der submaximalen Kraft auf ca. 38 %. Die Maximalkraft ist zwar ebenfalls geringer als vor der Inkubation, unterscheidet sich aber nicht von der in den Kontrollpräparaten entwickelten Kraft.

## **2.3 Wirkung von PAK1\* auf die r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen**

Die Inhibierung der Kraftentwicklung durch PAK1\* wird auch in der permeabilisierten *A. carotis communis* des Kaninchens von einer Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung begleitet. Der Phosphorylierungsgrad der r-MLC wird erneut unter relaxierten Bedingungen nach Inkubation mit PAK1\* oder Dialysat und im Plateau der zweiten submaximalen Kontraktion untersucht (Abb. IV-37; B). Der Phosphataseinhibitor

Okadainsäure hat, wie schon für die *Taenia caeci*-Fasern gezeigt werden konnte (s. IV-B; 1.7), auch in der Carotis des Kaninchens keinen Einfluß auf die r-MLC-Phosphorylierung. Die basale Phosphorylierung, also nach Inkubation ohne Okadainsäure, liegt bei  $25,3 \pm 3,6\%$  in Relaxationslösung bzw.  $48,0 \pm 3,0\%$  unter submaximaler Stimulierung. Die Pufferkontrolle in Anwesenheit von Okadainsäure weicht mit Werten von  $21,0 \pm 2,2\%$  und  $48,3 \pm 1,3\%$  nicht signifikant davon ab. Auch die mit PAK1\* behandelten Präparate weisen hier unter relaxierten Bedingungen den gleichen Phosphorylierungsgrad auf ( $25,6 \pm 1,6\%$ ). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der *Taenia caeci*-Fasern, wo auch bei  $pCa > 8$  eine Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung durch PAK1\* beobachtet werden konnte (s. Abb. IV-23). Die Hemmung der Submaximalkraft nach Inkubation mit PAK1\* spiegelt sich jedoch auch in diesen Präparaten in einer reduzierten Phosphorylierung der r-MLC wider. Der Phosphorylierungslevel beträgt nur noch  $39,0 \pm 3,2\%$ , nimmt hier also um etwa 20 % ab.



**Abb. IV-37:** PAK1\* hemmt auch in Triton-gehäuteter *A. carotis communis* des Kaninchens die Kraftentwicklung und die r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen.

**A** Inhibierung der Kraftentwicklung durch PAK1\*. Mittels eines Abb. IV-17 verwandten Meßprotokolls ermittelte Kontraktionskräfte ( $n=9-10$ ; in % der ersten maximalen Stimulierung bei  $pCa$  4,35 und  $CaM$  1  $\mu$ M) sowohl vor als auch nach der Inkubation mit Puffer bzw. PAK1\* (\*\*\*)  $P < 0,001$ ).

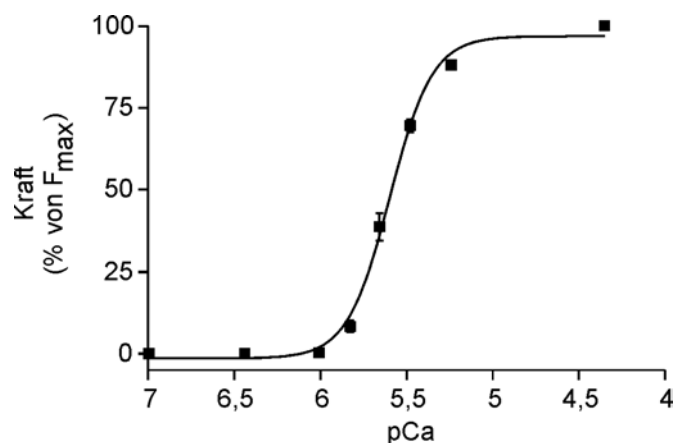
**B** Phosphorylierung der r-MLC in Abwesenheit von Okadainsäure (basal;  $n=7$ ) oder nach Inkubation mit Puffer ( $n=7-13$ ) oder PAK1\* ( $n=8-9$ ) unter Einwirkung von Okadainsäure unter relaxierten ( $pCa > 8$ ) und submaximal stimulierten ( $pCa$  6,01) Bedingungen. Angegeben ist der Anteil an phosphorylierter r-MLC in % des Gesamtgehaltes an r-MLC (\*  $P < 0,05$ ).

### 3 Untersuchungen an permeabilisierter *A. carotis communis* des Meerschweinchens

Das Ausmaß des inhibierenden Effekts von PAK1\* auf die Kraftentwicklung und r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen variiert deutlich zwischen Triton-gehäuteter *A. carotis communis* des Kaninchens und der *Taenia caeci* des Meerschweinchens. Dieser Unterschied kann auf Ebene der verwendeten Spezies bzw. des untersuchten Gewebes liegen. Um diesen Punkt zu untersuchen, werden Experimente an Triton-permeabilisierter *A. carotis communis* des Meerschweinchens durchgeführt.

#### 3.1 Charakterisierung der mit Triton X-100 permeabilisierten Präparate

Zunächst muß auch für dieses experimentelle System eine Analyse der Grundparameter erfolgen, zu denen vor allem der Verlauf der Kraft- $[Ca^{2+}]$ -Beziehung gehört. Die  $Ca^{2+}$ -Sensitivität der mit Triton X-100 permeabilisierten *A. carotis communis* des Meerschweinchens (Abb. IV-38) ist geringer als die der anderen beiden Geweben. Erst bei einem pCa von 6,2, der bei den anderen untersuchten Präparaten schon eine mehr als halbmaximale Kontraktion induziert, kommt es zu einer nennenswerten Kraftentwicklung. Der pCa<sub>50</sub>-Wert liegt dementsprechend mit  $5,6 \pm 0,02$  recht niedrig.



**Abb. IV-38:** Kraft- $[Ca^{2+}]$ -Beziehung der mit Triton X-100 permeabilisierten *A. carotis communis* des Meerschweinchens. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von kumulativ aufsteigenden  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (n=8). Die Fehlerbalken sind teilweise in den Symbolen enthalten.

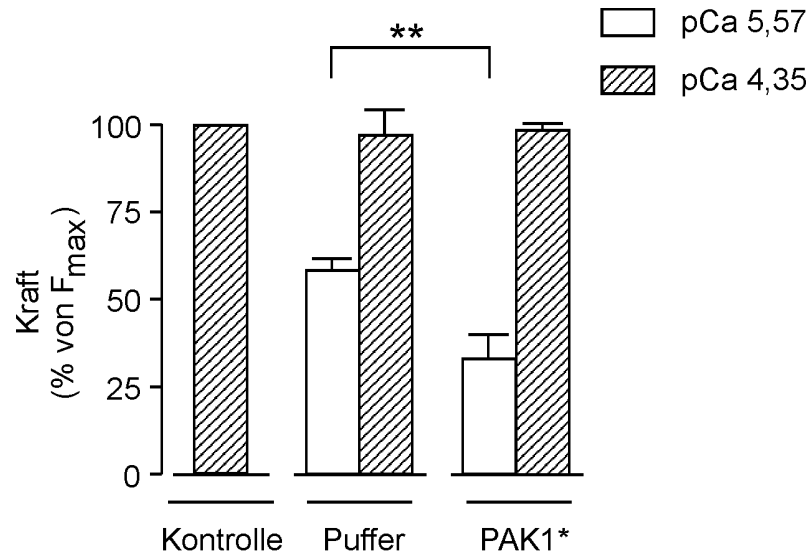
### 3.2 Einfluß von PAK1\* auf die isometrische Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen

Der Effekt, den PAK1\* auf die Kontraktilität der A. carotis communis des Meerschweinchens unter Gleichgewichtsbedingungen hat, wird abgesehen von leichten Änderungen entsprechend dem in Kapitel IV-B 1.2 beschriebenen Protokoll, das bereits für die beiden anderen Gewebe verwendet wurde, analysiert. Die A. carotis communis des Meerschweinchens ist im Vergleich zu der Carotis des Kaninchens ein sehr dünnes Gefäß und die Ringpräparate der Triton-gehäuteten A. carotis communis des Meerschweinchens sind nicht für die Durchführung langer Meßprotokolle geeignet. Das bisherige Protokoll umfaßt neben zwei submaximalen und zwei maximalen Stimulierungen außerdem eine Inkubationszeit von einer Stunde. Wird exakt dieses Protokoll für die Meerschweinchencarotiden verwendet, ist offensichtlich, daß bereits in den Pufferkontrollen ein ganz erheblicher Kraftverlust bei der zweiten submaximalen Kontraktion in Kauf genommen werden muß. Aus diesem Grund wird die Messung verkürzt. Die erste submaximale Stimulierung wird ausgelassen und direkt eine maximale Kontrollkontraktion (pCa 4,35 und CaM 0,5  $\mu$ M) induziert. Außerdem wird die Inkubationszeit in An- und Abwesenheit von PAK1\* generell auf ca. 30 Minuten verringert. Wie bereits bei Messungen mit den Muskelfasern der Taenia caeci gezeigt werden konnte (s. IV-B; 1.2 und 1.8), mindert diese Verkürzung der Inkubationszeit die inhibitorische Wirkung von PAK1\* nicht. Auch bei der permeabilisierten A. carotis communis des Meerschweinchens wird die Inkubation in Relaxationslösung in Gegenwart von 10 nM Okadainsäure durchgeführt. Die submaximale Aktivierungsstufe wird bei pCa 5,57 gewählt.

Die graphische Darstellung der Meßergebnisse (Abb. IV-39) zeigt, daß die Fasern der Pufferkontrolle mit der gewählten submaximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stufe ca. 60 % der Maximalkraft entwickeln. Wird das Meßprotokoll in dieser verkürzten Form angewendet, bleibt bei der zweiten maximalen Stimulierung das Kraftniveau mit ca. 97 % sehr gut erhalten. Die mit PAK1\* inkubierten Muskelpräparate entwickeln unter submaximaler Aktivierung ca. 30 % der Referenzkraft und sind damit im Vergleich zur Pufferkontrolle um ca. 50 % gehemmt. Diese Inhibierung entspricht im wesentlichen der bei den Triton-gehäuteten Taenia caeci des Meerschweinchens beobachteten Hemmung. Das maximale Kraftniveau allerdings ist



nach Inkubation mit PAK1\* im Rahmen der Fehler nicht verschieden von dem der Pufferkontrolle.



**Abb. IV-39:** PAK1\* hemmt auch in Triton-gehäuteter *A. carotis communis* des Meerschweinchens die Kraftentwicklung unter Gleichgewichtsbedingungen. Inhibierung der Kraftentwicklung durch PAK1\*. Mittels eines Abb. IV-17 verwandten Meßprotokolls ermittelte Kontraktionskräfte (n=5; in % der ersten maximalen Stimulierung bei pCa 4,35 und CaM 0,5  $\mu$ M) sowohl vor als auch nach der Inkubation mit Puffer bzw. PAK1\* (\*\* P<0,01).

## **V Diskussion**

### **A Kultur und adenovirale Infektion intakter glattmuskulärer Gewebe**

Soll die adenoviral vermittelte Überexpression von Signalproteinen in glattmuskulären Geweben der anschließenden Charakterisierung der kontraktiven Parameter in der durch die Überexpression veränderten glatten Muskulatur dienen, müssen verschiedene Anforderungen an das experimentelle System gestellt werden: Die adenovirale Infektion der glatten Muskelzellen im Gewebe soll mit hoher Effizienz erfolgen und gleichzeitig soll die Kontraktilität der glatten Muskulatur für den Zeitraum des Experiments möglichst unverändert aufrecht erhalten werden. Da die Literatur bezüglich dieser konkreten Fragestellung bislang keine umfassenden und zufriedenstellenden Daten liefert, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit ein experimenteller Ansatz etabliert und optimiert werden kann, der den gestellten Anforderungen gerecht wird. Zu diesem Zweck wurden, von Grundbedingungen ausgehend, sowohl experimentelle Methoden untersucht, die den Kontraktilitätserhalt während der Gewebekultur verbessern sollen (s. IV-A; 2) als auch potentiell infektionsverbessernde (s. IV-A; 3) Maßnahmen auf der Grundlage der gestellten Ansprüche analysiert. Dabei muß vor allem bei den infektionsverbessernden Methoden eine kritische Abschätzung der Vorteile der jeweiligen Maßnahme für die Infektion und der eventuellen Nachteile für die Kontraktilität erfolgen, um eine optimale Experimentkonzeption zu ermöglichen.

#### **1 Allgemeine Betrachtungen zu den Meßdaten**

Das Arbeiten mit intakten Muskelpräparaten, besonders mit intakter glatter Gefäßmuskulatur, ist mit diversen Schwierigkeiten behaftet. Sind die Reaktionslösungen in ihrer Zusammensetzung im Vergleich zu den für die permeabilisierten Präparate verwendeten Lösungen auch recht einfach, stellt die Präparation ungleich höhere Ansprüche. Beim intakten Muskelpräparat bleibt das komplette intrazelluläre Signalnetzwerk in seiner physiologischen, sehr komplexen Form erhalten. Um eine erfolgreiche, und vor allem aussagekräftige und reproduzierbare Stimulierung dieser Gewebe mit Agonisten zu ermöglichen, müssen sämtliche intrazellulär ablaufenden Regulationsmechanismen in unveränderter Form erhalten bleiben. Die Präparation der

Gewebe ist in diesem Zusammenhang ein äußerst kritischer Punkt, da Dehnung, Verletzung und andere mechanische Manipulationen direkt zur Stimulierung von Reperaturmechanismen, und damit zu einer leicht pathologischen intrazellulären Signalweiterleitung führen [z.B. Zeidan et al., 2000]. Selbstverständlich sind präparationsbedingte Veränderungen im Stoffwechsel der Gewebe nie vollständig zu unterbinden, können jedoch durch Optimierung der experimentellen Bedingungen weitgehend reduziert werden.

Die Präparation der intakten glatten Muskelgewebe konnte in dieser Arbeit unter Bedingungen durchgeführt werden, die eine hohe Kontraktilität und, soweit erkennbar, eine natürliche Reaktion auf die verwendeten Agonisten gewährleisten. Sowohl die Präparate eines einzelnen Tieres als auch die Messungen zwischen den Tieren sind von sehr guter Reproduzierbarkeit geprägt, was auch an den für intakte Gewebepräparate kleinen Standardabweichungen zu erkennen ist. Ein weitgehender Erhalt der physiologischen Regulation der glattemuskulären Kontraktion ist somit sehr wahrscheinlich, und ermöglicht verlässliche Aussagen bezüglich der einzelnen Problemstellungen.

Die Nachweisverfahren zur adenoviralen Infektion liefern ebenfalls sehr belastbare Ergebnisse. In allen Messungen zur  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Gewebehomogenaten konnten reproduzierbare Daten gewonnen werden. Die Färbung der Gewebe mit der X-gal-Methode und die anschließende Histologie zeigt ebenfalls in allen Präparaten nahezu identische Bilder. Durch Optimierung der Fixierung und der Färbung der Gewebe konnte eine sehr gute histologische Aufarbeitung der Muskelpräparate erreicht werden, die aufgrund fehlender Artefakte, durch z.B. Überfärbung der Präparate, eindeutige Aussagen ermöglicht.

## **2 Ein guter Kontraktilitätserhalt intakter Muskelringe der *A. carotis communis* des Kaninchens während fünftägiger Kultur ist schon bei experimentellen Grundbedingungen gewährleistet**

Der erste kritische Punkt bei der adenoviralen Infektion glattmuskulärer Gewebe und ihrer anschließenden Charakterisierung bezüglich der kontraktilen Parameter ist die im experimentellen Ablauf unerlässliche mehrtägige Gewebekultur. Nach Beginn der adenoviralen Infektion sollte das Gewebe vor der abschließenden Charakterisierung für einen Zeitraum von mindestens 48-72 h kultiviert werden, um eine ausreichende Expression des gewünschten Genproduktes zu ermöglichen.

Die Datenlage in Bezug auf die Aufrechterhaltung der Kontraktilität in glattmuskulären Geweben über einen variablen Kulturzeitraum liefert sehr widersprüchliche Aussagen. Sehr frühe Daten [Fingerle und Kraft, 1987] zeigen einen vollständigen Erhalt der kontraktilen Eigenschaften von kultivierten Kaninchenarterien über einen Zeitraum von zwei Wochen. In den meisten anderen Studien wird dagegen fast immer ein mehr oder weniger starker Kraftverlust beschrieben, der meistens schon einen Tag nach der Präparation einsetzt [z.B. Wright et al., 1996]. Da auf der Grundlage dieser kontroversen Datenlage keine aussagekräftigen Experimente aufgebaut werden können, wurde zur Schaffung einer eigenen, reproduzierbaren Datenbasis das kontraktile Verhalten der intakten Muskelringe der *A. carotis communis* des Kaninchens zunächst unter einfachen Grundbedingungen über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht (s. IV-A; 2.1). Da lediglich die Kontraktilität am Ende des Kulturzeitraums von unmittelbarer Relevanz ist, soll auf das Verhalten der Kraftentwicklung in Kultur nicht näher eingegangen und sowohl in diesem als auch in den folgenden Kapiteln nur die Ergebnisse am Tag 4 d diskutiert werden.

Schon in der ersten Versuchsreihe zur Untersuchung des kontraktilen Verhaltens der intakten Gefäßmuskulatur der *A. carotis communis* des Kaninchens konnte gezeigt werden, daß nach fünftägiger Gewebekultur noch ca. 60 % der Kontraktilität erhalten werden kann (s. Abb. IV-1; B, S. 96). Damit sind sehr gute Ausgangsbedingungen für eine Charakterisierung der Kraftentwicklung der Muskelpräparate am Ende der Kulturdauer gegeben. Im Folgenden konnte dieses Ergebnis ohne Änderung der experimentellen Kulturbedingungen entscheidend optimiert werden: Die Kontraktilität des Gewebes bleibt deutlich besser erhalten, wenn das Gewebe über den Zeitraum der Kultur keinen Kraftmessungen unterzogen wird, sondern lediglich zu Beginn und zum Abschluß des

Experiments für Kontraktionsstudien herangezogen wird. Im Vergleich zu den 60 % Krafterhalt der denudierten, in DMEM kultivierten Präparate der ersten Meßreihe, die einer täglichen Kraftmessung unterzogen wurden (s. Abb. IV-1; B, S. 96), entwickeln die Muskelringe aus späteren Versuchsreihen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert, aber nur am Anfang und am Ende des Experiments auf ihre kontraktile Eigenschaften hin untersucht wurden, am Tag 4 d mit über 80 % signifikant mehr Kraft (Abb. IV-3, S. 99). Die Erklärung dafür ist naheliegend und kann auf die täglich, zum Einspannen in die Meßapparatur nötige Manipulation der Präparate reduziert werden. Sehr wahrscheinlich kommt es durch die häufige Verwendung von Pinzetten immer wieder zu leichten Verletzungen der Muskelschicht der Gefäßwand, die im Laufe der Kultur akkumulieren. Es ist allgemein bekannt, daß Verletzungen der Gefäßwand einen Phänotypwechsel der glatten Muskelzellen vom kontraktile zum synthetischen Typ induzieren und daß die Stimulierung von spezifischen Signalkaskaden durch Wachstumsfaktoren dabei eine wichtige Rolle spielt. So liegen z.B. Daten vor, die die Induktion einer ERK1/2-vermittelten Hypertrophie und Remodelling der Gefäßwand nach Dehnung von intakter Gefäßmuskulatur belegen [Zeidan et al., 2000]. Von Calara et al. [Calara et al., 1996] konnte ein Zellkulturmodell zur mechanischen Verletzung von vaskulären glatten Muskelzellen etabliert werden, in dem die Schädigung der Zellen nicht nur Proliferation und Migration [Calara et al., 1996], sondern auch die verstärkte Phosphorylierung der ERKs [Lövdahl et al., 2000] induziert. Neben der Aktivierung der ERKs kommt es nach der Verletzung der Zellen außerdem auch zur transienten Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern [Moses et al., 2001]. Die Unterbindung dieser beiden Ereignisse durch spezifische Inhibitoren kann die verletzungsbedingte Stimulierung von Proliferation und Migration aufheben [Moses et al., 2001], kann also dem Übergang der Zellen in den synthetischen Phänotyp entgegenwirken. Somit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der mechanischen Schädigung von Gefäßmuskelzellen und dem Phänotypwechsel hin zum synthetischen Typ gezeigt werden. Auch die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Veränderungen im kontraktile Verhalten der Muskelringe der *A. carotis communis* des Kaninchens, die durch die häufige Durchführung von Kraftmessungen hervorgerufen werden, können somit sehr wahrscheinlich auf die verletzungsbedingte Stimulierung intrazellulärer Signalkaskaden, die ihrerseits die Kontraktilität der glatten Muskelzellen beeinträchtigen, zurückgeführt werden.

### **3 Untersuchung potentiell kontraktilitätserhaltender Maßnahmen**

Auf der Grundlage der gerade diskutierten Ergebnisse wurden zur weiteren Optimierung der Kulturbedingungen verschiedene, potentiell kontraktilitätserhaltende Maßnahmen kritisch analysiert.

#### **3.1 Vitamin D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) wirkt sich leicht positiv auf die Kontraktilität aus**

Für die Substanz 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol, kurz Vitamin D3 (D3), konnte bereits in früheren Untersuchungen ein kontraktilitätserhaltender Effekt auf glattmuskuläre Gewebe in Kultur gezeigt werden [Xue et al., 1991; Ishibashi et al., 1995]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Wirkung von D3 bestätigt und somit eine weitere Optimierung der Kulturbedingungen der intakten glatten Muskelringe der A. carotis communis des Kaninchens erzielt werden. Die Zugabe von 300 pg/ml D3 zum Kulturmedium führt zu einer leicht verbesserten Kontraktilität der Muskelringe (s. Abb. IV-1, S. 96; Tab. IV-2, S. 97), die verglichen mit den denudierten Kontrollpräparaten am Tag 4 d um ca. 10 % höher liegt.

Die Wirkung von D3 wird zum einen auf dessen Einfluß auf die Calciumhomöostase des Gewebes zurückgeführt [Xue et al., 1991]. D3 wirkt, wahrscheinlich durch Verbesserung der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, einer Verarmung der intrazellulären Calciumspeicher entgegen [Xue et al., 1991], so daß ein für die Aktivierung der MLCK ausreichender Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei Stimulierung des Gewebes gewährleistet bleibt. Zum anderen konnte von Ishibashi et al. gezeigt werden [Ishibashi et al., 1995], daß D3 in die Regulation der Myosinexpression der glatten Muskelzellen eingreift. Während der Organkultur von Mesenterialarterien der Ratte wurden von dieser Arbeitsgruppe Veränderungen in der Zusammensetzung der Myosin-Isoformen der glatten Muskelzellen beobachtet. Der Anteil der glattmuskulären schweren Ketten des Myosins vom Typ 2 (SM2; s. I; 1.2) nahm ab, während der SM1-Gehalt und der Anteil der leichten Ketten unverändert erhalten blieb. Die Abnahme der SM2 korrelierte dabei mit einem Verlust an Kontraktilität. Die Zugabe von D3 zum Kulturmedium konnte die Reduktion der SM2 verhindern und somit dem Kontraktilitätsverlust entgegenwirken [Ishibashi und Bukoski, 1997].

Für zukünftige Versuchsreihen, in denen die Kultivierung glattmuskulärer Gewebe in Zusammenhang mit Kontraktilitätsstudien durchgeführt wird, sollte daher aufgrund der existierenden und im Rahmen dieser Arbeit bestätigten Datenlage dem Kulturmedium D3 zugesetzt werden, um einen optimalen Kontraktilitätserhalt der Gewebe zu gewährleisten.

### 3.2 *all-trans* Retinolsäure hat keinen Effekt auf die Kontraktilität

Die Retinolkonzentration des Blutes liegt mit einem nahezu unveränderten Wert von ca. 1  $\mu\text{M}$  relativ hoch, so daß auch die Retinolsäure, ein physiologischer Metabolit des Vitamin A-Stoffwechsels, in relativ hohen Konzentrationen im Blut zu erwarten ist. Wright et al. [Wright et al., 1996] konnten zeigen, daß die Zugabe von *all-trans* Retinolsäure zum Kulturmedium dem kulturbedingten Kontraktionsverlust von Rattenaortenpräparaten entgegenwirken kann. Ebenso wie für D3 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Effekt von *all-trans* Retinolsäure (RA) untersucht, um so eventuell eine verbesserte Kontraktilität der glattmuskulären Präparate für die Zeitdauer der Gewebekultur zu erzielen.

Die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  RA hatte allerdings keinen positiven Einfluß auf die Kraftentwicklung der untersuchten Gewebe (s. Abb. IV-1; B, S. 96; Tab. V-2, S. 97). Der Grund dafür scheint im Zustand des Endothels zu liegen. Für die Optimierung der anschließend erfolgenden viralen Infektion wurden die Gefäße in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten routinemäßig denudiert. Der Effekt von RA scheint jedoch primär über die Endothelzellen ausgeübt zu werden [Wang et al., 1997], wobei gezeigt werden konnte, daß RA regulierend auf das Proliferationsverhalten und die Morphologie der Endothelzellen wirkt [Wang et al., 1997]. In denudierten Gefäßen konnten demnach für die Retinolsäure bisher auch keine kontraktionserhaltenden Effekte nachgewiesen werden [Wang et al., 1997], was durch die Ergebnisse dieser Arbeit erneut bestätigt wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Kontraktilität intakter Muskelringe der *A. carotis communis* des Kaninchens über einen fünftägigen Kulturzeitraum unter Grundbedingungen bereits zu ca. 80 % erhalten werden kann, wenn auf das Gewebe ausgeübte Manipulationen weitgehend reduziert werden. Die Verwendung von Vitamin D3

als Zusatz im Kulturmedium kann den Erhalt der Kontraktilität weiter verbessern, während Retinolsäure aufgrund des fehlenden Gefäßendothels keinen positiven Einfluß auf das Kontraktionsverhalten der Gewebepräparate hat. Es konnten somit Kulturbedingungen etabliert und optimiert werden, die einen sehr guten Krafterhalt über den Zeitraum einer fünftägigen Gewebekultur gewährleisten und sehr gute Voraussetzungen für die zu bearbeitenden Fragestellungen schaffen.

#### **4      Auswirkung potentiell infektionsverbessernder Methoden auf den Erhalt der Kontraktilität**

##### **4.1     Der Verlust des Endothels hat keinen starken Einfluß auf die Kontraktilität**

Dem Gefäßendothel wird eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität zugesprochen. Das intakte Endothel verhindert die Aggregation von Blutplättchen und kann durch die Synthese von dilatierenden Substanzen regulierend auf den Gefäßtonus einwirken. Außerdem stellt das Gefäßendothel aufgrund seiner sehr engen Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) eine Barriere dar, die den Durchtritt von z.B. Stoffwechselprodukten vom Blut in die Gefäßwand kontrolliert. Diese Schrankenfunktion des Endothels scheint auch mit ein Grund zu sein, warum die adenovirale Infektion glatter Muskelzellen in der Gefäßwand mit erheblichen Schwierigkeiten behaftet ist: Die endotheliale Zellschicht erschwert den Zugang der Viren zur Media des Gefäßes bzw. unterbindet ihn eventuell sogar vollständig [Rome et al., 1994]. Daher wird in vielen experimentellen Ansätzen zur adenoviralen Infektion der glatten Gefäßmuskulatur eine Denudierung des Gefäßes, also eine Entfernung der endothelialen Zellschicht, vorgenommen. Eine Verletzung des Endothels hat allerdings potentiell weitreichende Folgen, und kann unter anderem zur Migration von glatten Muskelzellen und zur Neointimabildung führen. Dies konnte z.B. in der Studie von Fingerle und Kraft [Fingerle und Kraft, 1987] gezeigt werden: Bleibt das Endothel der Aorta von Kaninchen intakt, liegt die tägliche Proliferationsrate der glatten Muskelzellen bei weniger als 0,1 %. Wird das Endothel dagegen entfernt, steigt die Proliferation in den ersten Tagen drastisch an und erreicht Werte von ca. 60 %.



Die Auswirkung der Denudierung von Gefäßen auf das kontraktile Verhalten wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird postuliert, daß es durch die Entfernung des Endothels zu einer Schädigung der Morphologie der Media kommt, die sich unter anderem in der geringeren Orientierung und dem vermehrten Zelltod der glatten Muskelzellen zeigt [Ozaki et al., 1998]. Zurückgeführt wird dieses Phänomen auf die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die über verstärkte NO-Produktion Gewebeschäden hervorruft [Ozaki et al., 1998; Binko et al., 1999]. Andere Untersuchungen zeigen dagegen keinen Einfluß der Denudierung auf die Kraftentwicklung der untersuchten Gefäße [Fingerle und Kraft, 1987; Xue et al., 1991]. Da diese widersprüchliche Datenlage nicht als zuverlässige Basis für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet werden kann, die Vorteile der Denudierung allerdings für eine Optimierung der adenoviralen Infektion als sehr groß angesehen werden, wurden die Auswirkungen der Entfernung des Endothels auf den Erhalt der Kontraktilität der Gewebepreparate analysiert.

In dem im Rahmen dieser Arbeit betrachteten experimentellen System scheint dem Endothel eine geringe, aber durchaus meßbare Rolle bei der Erhaltung der Kontraktilität zuzukommen. Die nicht denudierten Muskelringe der A. carotis communis erreichen am Tag 4 d ein um ca. 20 % höheres Kraftniveau als die Präparate ohne Endothel (s. Abb. IV-1; B, S. 96; Tab. IV-2, S. 97). Die verbleibende Kraft in den denudierten Präparaten ist jedoch hoch genug, um die Denudierung als infektionsverbessernde Maßnahme im Rahmen der hier durchgeführten Versuchsreihe zu rechtfertigen; die zu erwartenden Vorteile der Denudierung für die adenovirale Infektion wiegen den vergleichsweise geringen Kraftverlust auf.

### **4.2 Temporäre Veränderungen der endothelialen Zellbarriere durch die Behandlung mit EGTA haben keinen Einfluß auf die Kontraktilität**

Durch Chelierung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  kann eine transiente Öffnung der *tight junctions* von Epithelien erzielt werden, die eine erhöhte Wasserpermeabilität dieser Zellbarrieren zur Folge hat [Martinez-Palomo et al., 1980; Bhat et al., 1993]. Dieser Effekt setzt am intakten Epithel 1 bis 2 Stunden nach Applikation des Chelatbildners EGTA ein und ist innerhalb von 12 Stunden vollständig reversibel [Walters et al., 1999]. Diese Arbeitsgruppe hat die Methode an kultivierten Epithelien getestet, und findet eine

Abnahme der transepithelialen Resistenz, die apikal applizierten Adenoviren den Durchtritt zur basolateralen Seite des Epithels ermöglicht.

Da trotz der im Rahmen dieser Arbeit routinemäßig durchgeführten Denudierung der Gefäße nicht immer von einer kompletten Entfernung des Endothels ausgegangen werden kann, wurden die Gewebepreparate einer für die gegebene Fragestellung optimierten Behandlung mit EGTA unterzogen, um eine erhöhte Permeabilität der verbleibenden endothelialen Zellschicht zu erzielen.

Der Zusatz von hohen Konzentrationen EGTA führt zur drastischen Reduzierung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die am Ende der Behandlung wieder auf ihren Ursprungswert zurückgeführt wird. Derart starke Schwankungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können große Auswirkungen auf die Kontraktilität glatter Muskelgewebe haben, da die Regulation der glattmuskulären Kraftentwicklung primär über die extra- und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verläuft. Da die Behandlung mit EGTA bisher noch nie im Zusammenhang mit glattmuskulären Kontraktionsstudien angewendet wurde, liegen natürlich keine experimentellen Daten zu den Auswirkungen dieser Methode auf die Kontraktilität von Gefäßmuskelpräparaten vor. Im Rahmen dieser Arbeit mußten die potentiellen Effekte dieser Methode daher zunächst in Voruntersuchungen ermittelt werden. Dabei konnte festgestellt werden, daß die zusätzliche temporäre Veränderung im Endothel, die durch die Behandlung mit EGTA hervorgerufen wird, ohne Bedeutung für die Kontraktilität der Gewebepreparate ist (s. Abb. IV-5, S. 102). Entscheidend für den Erhalt der Kontraktilität bei der Anwendung dieser Methode ist höchstwahrscheinlich vor allem die langsame und schrittweise Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die zusätzlich zu der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt wurde. Durch die langsame Hochregulierung der extrazellulären Calciumkonzentration wird einer Überkontraktion der glatten Muskelzellen entgegengewirkt, die man bei sofortiger Überführung der Präparate in Lösungen mit normaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (z.B. PSS: 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$ ) beobachten würde und die nachhaltige Effekte auf die Kraftentwicklung der Muskelringe hätte. Diese potentiell infektionsverbessernde Maßnahme ist somit nach ihrer auf das experimentelle System dieser Arbeit abgestimmten Optimierung durchaus zur Bearbeitung der gegebenen Fragestellungen einsetzbar.

### 4.3 Fötale Kälberserum hat keinen nachteiligen Einfluß auf die Kontraktilität

Im Gegensatz zu vereinzelt Zellen können Gewebepräparate gut in Abwesenheit von fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert werden. FCS liefert eine relativ schlecht definierte Mischung aus diversen Wachstumsfaktoren und stimuliert die DNA-Synthese und Proliferation von Zellen. Im Zusammenhang mit der adenoviralen Infektion von glattmuskulären Geweben kann die Verwendung von FCS allerdings von Vorteil sein. Die Expression der Vitronectinrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ , die bei der adenoviralen Infektion maßgeblich an der Internalisierung der Viruscapside beteiligt sind, wird im glattmuskulären Gewebe nachgewiesener Weise von diversen Wachstumsfaktoren stimuliert (s. I; 7.2.2). Durch Kultivierung von glatten Muskelgeweben in Anwesenheit von FCS könnte demnach eine vermehrte Expression und als Folge davon eine gesteigerte Präsentation der Vitronectinrezeptoren auf der Zelloberfläche erreicht werden, so daß die Anzahl der Internalisierungsrezeptoren für die viralen Capside steigt und eine effizientere Aufnahme der Viren in die Zelle ermöglicht. Auch hier muß allerdings in Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Zielen, effiziente Infektion glatter Muskelzellen im Gewebe und optimale Kontraktilitäts-erhaltung der Muskelpräparate, ermittelt werden, inwieweit die Verwendung von FCS die kontraktile Parameter des glattmuskulären Gewebes in Kultur beeinflußt.

Die Auswirkungen von FCS auf die Kontraktilität glattmuskulärer Gewebe wird im Allgemeinen als hemmend beschrieben. So liegen Daten vor, die eine erhöhte Proliferation, eine verringerte Orientierung und vermehrten Zelltod der glatten Muskelzellen bei Kultivierung mit FCS zeigen [Lindqvist et al., 1999; Yamawaki et al., 2000]. Der Auslöser für den nachteiligen Einfluß des FCS auf die Kontraktilität glattmuskulärer Gewebe scheint allerdings nicht primär in einer gesteigerten Proliferation begründet zu sein. De Mey et al. [De Mey et al., 1989] konnten in Experimenten mit dialysierten FCS-Fractionen eine Entkopplung von gesteigerter DNA-Synthese und gehemmter Kraftentwicklung zeigen. Die Induktion der Proliferation durch die im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren ist somit für die Hemmung der Kraftentwicklung nicht ausschlaggebend. Vielmehr scheint FCS durch die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration inhibierend auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur einzuwirken. Lindqvist et al. [Lindqvist et al., 1997 und 1999] konnten der durch FCS bewirkten Kraftabnahme durch Zugabe des Calciumantagonisten Verapamil vorbeugen. In diesem Zusammenhang wird postuliert, daß die durch FCS erhöhte intrazelluläre

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Sensitivität des Gewebes für extrazelluläres Calcium senkt [Gomez und Swärd, 1997]. Dadurch kommt es bei gleichbleibender extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in mit FCS behandelten Präparaten unter Stimulierung zu einem verringerten Calciumeinstrom und somit zu einer geringeren Kraftentwicklung.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Kultivierung der Muskelringe der *A. carotis communis* des Kaninchens in Anwesenheit von FCS konnte kein Unterschied zu Kontrollpräparaten festgestellt werden. Die verbleibende Kraft am Tag 4 d der Kultur ist mit etwa 82 % in den Kontrollen bzw. ca. 90 % in den FCS-behandelten Präparaten nicht signifikant voneinander verschieden (s. Abb. IV-3, S. 99). Dieser Widerspruch zu den Literaturdaten kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die verwendeten FCS-Konzentrationen zurückgeführt werden. Alle bisher existierenden Daten beruhen auf Experimenten, die in Anwesenheit von relativ hohen Konzentrationen FCS von teilweise bis zu 20 % [z.B. De Mey et al., 1989] durchgeführt wurden. Im Gegensatz dazu wurde in den im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Experimenten mit einer sehr geringen FCS-Konzentration von nur 3 % gearbeitet. Die Beeinflussung sowohl der Calciumhomöostase als auch des proliferativen Verhaltens des Gewebes ist bei derart niedrigen Serumkonzentrationen offensichtlich nur gering und wirkt sich nicht auf die kontraktilen Parameter der glattmuskulären Gewebepräparate aus. Allerdings ist somit auch fraglich, inwieweit diese geringe FCS-Konzentration ausreichend ist, um die Expression der Vitronectinrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  zu steigern. Um den gewünschten Effekt des FCS auf die Expression der Vitronectinrezeptoren nachzuweisen, müßte eine Quantifizierung der Rezeptordichte, z.B. mit Hilfe der Immunpräzipitation membranständiger Rezeptoren nach radioaktiver Markierung, erfolgen.

#### **4.4 Applikation höherer Drücke beeinträchtigt die Kontraktilität nachhaltig**

Eine weitere potentiell infektionsverbessernde Maßnahme, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit in Hinblick auf die gegebenen Zielsetzungen analysiert wurde, ist die Applikation des Virus unter höheren Drücken.

Von einigen Studien zur adenoviralen Infektion wurden Daten veröffentlicht, die von verbesserten Infektionseffizienzen bei Applikation des Virus unter dem Blutdruck angepaßten Drücken berichten [Lee et al., 1993; Shears et al., 1997; Gaballa et al., 1998]. Der vom Lumen des Gefäßes nach außen gerichtete Druck soll dabei zu einer gesteigerten

Penetration der Viruspartikel ins Gewebe sorgen und somit eine bessere Zugänglichkeit der Media für die Viren ermöglichen. Bisher zielten diese Untersuchungen nie auf eine anschließende Charakterisierung der kontraktiven Eigenschaften der Muskelpräparate ab, so daß keine diesbezüglichen Daten vorliegen. Es ist jedoch bereits grundlegend bekannt, daß die starke Dehnung glatter Muskulatur, vor allem vaskulärer Gewebe, zu starken Einbußen bei der Kraftentwicklung, bis hin zum vollständigen Verlust der Kontraktilität, führt. Um eine Abschätzung der wahrscheinlich eher nachteiligen Auswirkungen der Druckapplikation auf die Kontraktilität der Gewebe zu ermöglichen, wurde eine aufwendige Präparation für die *ex vivo*-Applikation von definierten Drücken etabliert und auf ihre Bedeutung für die kontraktiven Eigenschaften der glattmuskulären Präparate hin untersucht.

Bei Applikation eines relativ geringen Drucks von ca. 80 mm Hg konnte keine makroskopisch sichtbare Dehnung des Gefäßes beobachtet und auch kein Einfluß auf die Kontraktilität des Gewebes festgestellt werden (s. Abb. IV-4; A, S. 101). Bei einem Druck von ca. 150 mm Hg liegt eine nicht stark ausgeprägte Dehnung des Gefäßes vor, die sich allerdings schon in starken Krafteinbußen bemerkbar macht (s. Abb. IV-4; B, S. 101). Dies erscheint zunächst wenig verständlich, da ein Druck von 150 mm Hg prinzipiell für ein Widerstandsgefäß der Größe der A. carotis communis des Kaninchens nicht extrem hoch gewählt ist und unter körperlicher Anstrengung sicherlich zeitweilig auch höherer Blutdruck zu erwarten ist. Betrachtet man allerdings die Art des applizierten Drucks, wird das im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Ergebnis verständlich: Der hier *ex vivo* applizierte Druck ist statisch und hält über einen relativ langen Zeitraum von zwei Stunden einen konstant hohen Wert aufrecht. Beim Blutdruck dagegen handelt es sich natürlich um einen pulsierenden Druck.

Die permanente Überdehnung der Muskulatur, die auch bei den experimentellen Ansätzen im lebenden Tier praktiziert wird, hat somit auch schon bei makroskopisch schwach ausgeprägter Ausweitung des Gefäßes einen stark nachteiligen Effekt auf die Kontraktilität. Eine aussagekräftige und reproduzierbare Untersuchung der Kraftentwicklung der Präparate nach der adenoviralen Infektion ist nicht mehr gewährleistet. Die Methode der Druckapplikation zur Verbesserung der adenoviralen Infektion kann somit als ungeeignet für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Fragestellung angesehen werden.

#### **4.5 Elastase bewirkt starke morphologische Veränderungen der Muskelpräparate und führt damit zu Kontraktilitätsverlusten**

Ergebnissen einer Untersuchung von Gaballa et al. zufolge [Gaballa et al., 1998] führt die Behandlung von glattmuskulären Gefäßmuskelpräparaten mit geringen Konzentrationen des Enzyms Elastase zu einer Erhöhung der Wasserpermeabilität des Endothels, und somit zu einer verbesserten Penetration adenoviraler Partikel ins Gewebe, ohne die morphologischen Eigenschaften der Gefäßwand zu beeinträchtigen. Da auch für diese potentiell infektionsverbessernde Maßnahme bisher keine Daten zu den Auswirkungen auf die kontraktile Eigenschaften glatter Muskulatur vorliegen, mußten diese im Rahmen dieser Arbeit erstmalig ermittelt werden.

Es wurde ein starke Diskrepanz zwischen den Literaturdaten und den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bezüglich der morphologischen Integrität der Gewebe festgestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben erwähnten Untersuchung [Gaballa et al., 1998] konnten in den hier durchgeführten Experimenten erhebliche morphologische Veränderungen beobachtet werden. Schon bei makroskopischer Betrachtung des Gewebes fiel die aufgelöste, flockenartige Struktur des Bindegewebes und das stark verkleinerte Gefäßlumen auf (s. Abb. IV-7, S. 104). Bei näherer mikroskopischer Untersuchung wurden stark ausgeprägte strukturelle Veränderungen der Gefäßwand deutlich (s. Abb. IV-8, S. 105): Sowohl Endothel als auch Lamina elastica interna fehlen nach der Behandlung mit Elastase vollständig. Die Adventitia zeigt ebenfalls starke morphologische Veränderungen und besitzt eine sehr unstrukturierte Erscheinung. Auch die Media scheint leicht aufgelockert zu sein.

Die Kontraktilität dieser Präparate ist am Tag 4 d extrem vermindert, und liegt nur noch bei ca. 30 % (s. Abb. IV-5, S. 102). Dies liegt zum einen mit großer Wahrscheinlichkeit daran, daß die potentiell ebenfalls an der Regulation der Kontraktion beteiligten Schichten der Gefäßwand, nämlich Endothel und Adventitia, eindeutig stark beschädigt sind. Das Endothel greift z.B. durch die Bildung des relaxierend wirkenden NO in die Regulation der glattmuskulären Kontraktion ein. Zum anderen kommt es aufgrund der fehlenden endothelialen Zellbarriere zu einem direkten Kontakt der glatten Muskelzellen mit den Nährstoffen des Mediums, vor allem aber auch mit den Stoffwechselprodukten der Zellen, wodurch ebenfalls negative Effekte auf die Kontraktilität ausgelöst werden könnten. Des Weiteren legt der stark invasive Eingriff der Elastase-Behandlung die Vermutung nahe, daß es zur Aktivierung von Reperaturmechanismen im Gewebe, und

somit zur Modifizierung intrazellulärer Signalkaskaden kommt. Vergleichbar zu den Daten von Moses et al. [Moses et al., 2001] wäre ein verletzungsbedingter Phänotypwechsel der glatten Muskelzellen zum synthetischen Typ vorstellbar. Es wäre z.B. denkbar, daß die Synthese kontraktiler Proteine zugunsten struktureller Zellbestandteile reduziert wird oder daß die Rekrutierung von Signalproteinen verstärkt in Signalwegen des Stoffwechsels und weniger der Kontraktilität erfolgt.

Die Behandlung mit Elastase ist somit aufgrund des extrem negativen Effekts für den Erhalt der Kontraktilität und der schlecht definierten Grundvoraussetzungen für eine aussagekräftige und reproduzierbare Charakterisierung des kontraktiven Verhaltens von Gewebepräparaten ungeeignet. Die Methode wurde dennoch im weiteren Verlauf der adenoviralen Infektionsexperimente erneut eingesetzt, da sie zur Klärung einer spezifischen Problemstellung beitragen kann: Aufgrund des fehlenden Endothels und vor allem der fehlenden Lamina elastica interna, steht die Media nach der Behandlung mit Elastase in direktem Kontakt zum Medium, und somit auch zu den Adenoviren. In den so behandelten Präparaten kann daher überprüft werden, inwieweit die Penetration der Viren ins Gewebe ein limitierender Faktor für die Infektion der glatten Muskelzellen in der Media ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig parallel überprüften potentiell infektionsverbessernden Methoden für die gegebene Zielsetzung unterschiedlich gut geeignet sind. Die Aufhebung der endothelialen Zellbarriere durch Denudierung oder Behandlung mit EGTA führt nur zu geringen Krafteinbußen und wird daher aufgrund des zur erwartenden positiven Effekts für die adenovirale Infektion routinemäßig in den experimentellen Aufbau integriert. Sowohl die Behandlung mit Elastase als auch die Applikation höherer Drücke haben so starke nachteilige Effekte auf die Kontraktilität der Muskelpräparate, daß diese Methoden zur Bearbeitung der Zielsetzungen dieser Arbeit nicht in Frage kommen. Die Behandlung mit Elastase wird lediglich zur Durchführung von Kontrollexperimenten zur Analyse limitierender Faktoren der adenoviralen Infektion verwendet.

## **5 Die adenovirale Infektion mit Kontrollviren hat keinen Einfluß auf die Kontraktilität des Gewebes**

Bei der erfolgreichen adenoviralen Infektion von Zellen wird die zelleigene DNA- und Proteinsynthese weitgehend eingestellt und verstärkt die Expression der viralen Proteine stimuliert. Im Falle eines rekombinanten Virus wird dadurch natürlich zum einen das gewünschte Protein stark exprimiert, zum anderen werden aber auch immer virale Proteine synthetisiert. Obwohl diese Veränderungen im Expressionsverhalten des Gewebes allgemein als unerheblich für den natürlichen Ablauf der intrazellulären Signalkaskaden angesehen werden, muß als ein zentraler Aspekt dennoch überprüft werden, inwieweit es zu einer Beeinflussung der Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskelpräparate nach Infektion mit den lacZ-Kontrollviren kommt. Die Literatur liefert diesbezüglich lediglich die Daten zweier Studien. Yu et al. [Yu et al., 1996] habe in ihren Experimenten ebenfalls mit dem Reporter-gen der  $\beta$ -Galactosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors gearbeitet, untersuchen jedoch die Kontraktilität von Muskelpräparaten der Trachea von Pferden und verwenden das Parasympathomimetikum Carbachol als Agonist. Ooboshi et al. [Ooboshi et al., 1997] veröffentlichen in ihrer Studie zwar Daten zur Kontraktion der A. carotis des Kaninchens, verwenden jedoch ein anderes virales Konstrukt ( $\beta$ -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des RSV-Promotors) und stimulieren das Gewebe mit Phenylephrin. Beide Arbeitsgruppen konnten keine Auswirkungen der Infektion mit den adenoviralen Kontrollvektoren auf die Kontraktilität der Gewebes feststellen. Um speziell für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete experimentelle System eigene reproduzierbare Daten zu erhalten, wurde der Einfluß der adenoviralen Infektion mit Kontrollviren auf die Kontraktilität analysiert.

Die ermittelten Meßdaten belegen, daß die Kraftentwicklung durch die Infektion nicht beeinträchtigt wird (s. Abb. IV-10, S. 108). Die entwickelten Kräfte am Tag 4 d des Experiments liegen bei ca. 80 % in den nicht infizierten Kontrollpräparaten und bei ca. 75 % in den infizierten Muskelringen. Damit ist die grundlegende Annahme, daß die  $\beta$ -Galactosidase nicht störend in die Regulation der glattmuskulären Kontraktion eingreift, bestätigt und zudem gezeigt, daß die zusätzlich exprimierten viralen Proteine keinen Einfluß auf das Kontraktionsverhalten des Gewebes haben. Außerdem zeigen diese Daten, daß es trotz der stark reduzierten zelleigenen Proteinsynthese zu keinem Strukturverlust des Gewebes kommt. Die Halbwertszeiten zumindest der für die glattmuskuläre



Kontraktion essentiellen Proteine sind somit groß genug, um während des fünftägigen Kulturzeitraums die strukturelle Aufrechterhaltung des Zellverbandes zu gewährleisten.

## **6 Effizienz der adenoviralen Infektion glatter Muskelzellen im Gewebeverband**

### **6.1 Allgemeine Infektionseffizienz und Identifizierung der infizierten Zellen der Gefäßwand**

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperimenten konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Konzeption des experimentellen Protokolls eine ausgeprägte und spezifische Infektion der glattmuskulären Gewebepräparate ermöglicht und daß der verwendete Adenovirus eine hohes Infektionspotential für die untersuchten Gewebe besitzt. Da diese adenovirale Infektion, wie in Kapitel V-A 5 bereits diskutiert, keinerlei Einfluß auf den Erhalt der Kontraktilität der Muskelpräparate hat, konnten somit Versuchsbedingungen geschaffen werden, die die Bearbeitung der Grundfragestellungen dieser Arbeit ermöglichen.

Die detaillierte Analyse der Effizienz und der Art der adenoviralen Infektion mit LacZ-Kontrollviren wurde mit Hilfe von zwei Methoden, die zur Bearbeitung unterschiedlicher Aspekte der viralen Infektion dienen, durchgeführt: Der  $\beta$ -Galactosidase-Assay in Gewebehomogenaten (s. III; 2.3) ermöglicht aufgrund der gegebenen Linearität der Farbreaktion eine gute allgemeine Abschätzung der Infektionseffizienz. Mit Hilfe der X-gal-Färbung und der histologischen Aufarbeitung (s. III; 2.2) ist dagegen eine Identifizierung der infizierten Zelltypen im Gewebe möglich. Die kombinierte Analyse der infizierten Gewebe mit beiden Nachweismethoden bietet somit die Möglichkeit einer optimalen Auswertung der Experimente und konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse liefern.

Die Durchführung des  $\beta$ -Galactosidase-Assays in den Gewebehomogenaten ergab in allen Ansätzen und mit allen infizierten Präparaten, in denen mit einem 48-stündigen Viruskontakt gearbeitet wurde, eine Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität um mindestens einen Faktor 30, teilweise um bis zu einen Faktor 150, und liegt damit deutlich im Rahmen anderer veröffentlichter Daten [z.B. Lee et al., 1993; Yao und Wang, 1995]. Außerdem konnte ein rascher, und damit spezifischer Verlauf der Infektion mittels des Mausgewebes, das nur für wenige Minuten Kontakt zum Virusmedium hatte, gezeigt werden: Bereits nach

dieser kurzen Infektionszeit liefert der photometrische Nachweis eine sehr gut meßbare Erhöhung der Enzymaktivität (s. Abb. IV-11, S. 109).

Auch mit der X-gal-Farbreaktion konnte in allen untersuchten Gefäßmuskelpräparaten eine deutliche Blaufärbung der infizierten Gewebe beobachtet werden. Auch hier kann das Mauspräparat mit dem nur 10-15-minütigen Viruskontakt, das im mikroskopischen Bild eindeutig infizierte Zellen (s. Abb. V-14; A, S. 112) zeigt, als Beweis für die Spezifität der Infektion und der Nachweisreaktion herangezogen werden.

Außerdem kann anhand dieses Muskelpräparats die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Endothelzellen der Gefäßwand für die Viren am leichtesten zu infizieren sind, da dies die einzigen Zellen sind, die in der kurzen Kontaktzeit vom Virus penetriert wurden (s. Abb. V-14; A, S. 112). Grund dafür ist neben der optimalen Zugänglichkeit der endothelialen Zellschicht sicherlich vor allem auch die Tatsache, daß die für die adenovirale Infektion benötigten Rezeptoren in einer ausreichenden Dichte auf der Oberfläche der Endothelzellen präsentiert werden. Dies wurde bereits mit Daten aus Zellkulturexperimenten, in denen von einer identischen Zugänglichkeit der Zellen für die Viren ausgegangen werden kann, belegt: Zhou et al. [Zhou et al., 1995] haben sowohl Endothel- als auch glatte Gefäßmuskel-Zellkulturen für identische Zeitdauer mit dem gleichen Virustiter infiziert, und finden in den Endothelzellen verglichen mit den glatten Muskelzellen eine doppelt so hohe Infektionseffizienz. Dieser Befund der schnellen und spezifischen Penetration der Endothelzellen durch die Adenoviren konnte im Rahmen dieser Arbeit des weiteren dadurch bestätigt werden, daß bei der histologischen Analyse aller Infektionsexperimenten glatter Gefäßmuskulatur eine positive Reaktion der teilweise verbliebenen Endothelzellen festgestellt wurde (s. Abb. IV-13; A, S. 111).

Zusätzlich dazu konnte mit Hilfe der X-gal-Färbung und der histologischen Analyse der infizierten Präparate auch der eindeutige und reproduzierbare Nachweis von einzelnen infizierten Zellen in der Adventitia erfolgen (s. Abb. IV-12; B, S. 110; Abb. IV-14; B, S. 112). Das Infektionsmuster aus positiven Zellen in Endothel und Adventitia wird auch von anderen Untersuchungen berichtet. Yao und Wang [Yao und Wang, 1995] finden sowohl in der Aorta als auch in der Nierenarterie der Ratte und Ooboshi et al. [Ooboshi et al., 1997] in der A. carotis des Kaninchens dieses Expressionsmuster der  $\beta$ -Galactosidase. Die Dichte der infizierten Zellen in der Adventitia scheint mit 8 Zellen/mm relativ hoch zu sein [Yao und Wang, 1995] und, soweit anhand der veröffentlichten histologischen Daten erkennbar, befinden sich diese Zellen am äußersten Rand der Adventitita [Ooboshi et al., 1997]. Beide Arbeitsgruppen liefern keine Angaben bezüglich der Identifizierung des

infizierten Zelltyps. Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hat sich die eindeutige Identifizierung der in der Adventitia infizierten Zellen als äußerst schwierig herausgestellt. Zellen dieser Erscheinungsform wurden, soweit bekannt, erstmalig in der Adventitia der Gefäßmuskelwand entdeckt und beschrieben, so daß in der Literatur keinerlei Hinweise zur Charakterisierung dieser Zellen existieren. Es handelt sich dabei um einen Zelltyp, der in der Adventitia offensichtlich nur sehr vereinzelt vorkommt, da in den Gefäßquerschnitten aller analysierter Gewebepräparate nur wenige dieser Strukturen angefärbt wurden. Die Zellen sind zum Großteil im Innern der Adventitia an der Grenzfläche zwischen Adventitia und Media lokalisiert und besitzen eine bipolare Erscheinung mit teilweise verzweigten, schmalen Fortsätzen, die zunächst an die typische Morphologie von Nervenzellen denken läßt (s. Abb. IV-13; B, S. 111; Abb. IV-14; B, S. 112). Neuronen bestehen aus einem Zellkörper und den langen, verzweigten Nervenfasern. Um die Infektion einer Nervenzelle durch Adenoviren nachweisen zu können, muß das Virus die Möglichkeit haben, den Zellkörper des Neurons zu penetrieren, da sich dort der Zellkern befindet. Die Gefäßmuskulatur ist nach dem heutigen Wissensstand allerdings lediglich vegetativ innerviert und die Umschaltung von dem prä- auf das postganglionäre Neuron findet beim Sympathikus in der Nähe des Rückenmarks, beim Parasympathikus weiter peripher statt. Die Zellkörper der Neurone sind demnach in beiden Systemen nicht direkt am Erfolgsorgan lokalisiert, so daß in der Gefäßwand keine Nervenzellkörper vorhanden sein sollten, die der Virus infizieren könnte. Außerdem sind die hier angefärbten Strukturen kleiner als die typischen vegetativen Nervenzellkörper wie man sie z.B. im Darmgewebe findet. Weitere Untersuchungen, z.B. mit Antikörpern gegen Neuronenmarkerproteine, könnten herangezogen werden, um die infizierten Zellen eindeutig als Nervenzellen zu identifizieren oder aber als Nervenzellen eindeutig auszuschließen.

Die Morphologie dieser Zellen könnte auch entfernt an die Erscheinung von Fibroblasten erinnern, doch kommen die infizierten Zellen in der Gefäßwand zu selten und an zu vereinzelt Positionen vor, um eine Infektion von Fibroblasten, die in der ganzen Adventitia in großer Zahl existieren, plausibel erscheinen zu lassen. Außerdem sprechen die teilweise gegabelten Fortsätze morphologisch eindeutig gegen Fibroblasten.

Interessanterweise besitzen die in der Einleitung erwähnten Cajal-Zellen (s. I; 2.1.1), die Schrittmacherzellen der glatten Darmmuskulatur, ebenfalls eine fibroblasten-ähnliche, bipolare Morphologie mit teilweise verzweigten Fortsätzen [Übersicht bei Hanani und Freund, 2000]. Das Vorkommen dieser Zellen in der Gefäßmuskulatur wird erst seit

neuester Zeit diskutiert [Pucovský und Bolton, 2002; Povstyan et al., 2002]. In Endothelzellen der Aorta konnte der Nachweis des Proteins c-Kit, das allgemein als Markerprotein für Cajal-Zellen gilt [Übersicht bei Hanani und Freund, 2000], bereits erfolgen [Miyamoto et al., 1994]. Könnten die hier infizierten Zellen der Adventitia mittels immunhistochemischer Methoden, z.B. ebenfalls mit Antikörpern gegen das Protein c-Kit, als Cajal-Zellen identifiziert werden, würde das weitreichende neue Fragen zur Regulation des Gefäßtonus aufwerfen, zu deren Beantwortung die spezifische adenovirale Infektion der Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben und etabliert wurde, beitragen könnte.

Erstaunlicherweise konnte in allen untersuchten Gefäßpräparaten keine Infektion von glatten Muskelzellen detektiert werden. Daß die Penetration der Viren ins Gewebe dabei mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der limitierende Faktor ist, konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt werden. Zum einen sind die gerade beschriebenen infizierten Zellen der Adventitia sehr nah an der Media lokalisiert, befinden sich also nicht an der Peripherie der Gefäßwand und konnten offensichtlich dennoch problemlos vom Virus erreicht werden. Zum anderen hatten die glatten Muskelzellen in den mit Elastase behandelten Gefäßen durch die vollständige Entfernung von Endothel und Lamina elastica interna (s. Abb. IV-13; B, S. 111) direkten Kontakt mit dem Virusmedium und zeigen trotzdem auch in diesen Gefäßen keinerlei Anzeichen einer Infektion.

Des weiteren konnte, wie im folgenden Kapitel näher besprochen (V-A; 5.2), ausgeschlossen werden, daß das verwendete Virus generell nicht zur Infektion glattmuskulärer Zellen in der Lage ist. Wesentlich wahrscheinlicher ist daher, daß die fehlende oder mangelnde Expression der für die Infektion essentiellen Rezeptoren die adenovirale Infektion glatter Gefäßmuskulatur erschwert. Hinweise dazu liefern auch die bereits erwähnten Daten von Zhou et al. [Zhou et al., 1995], die selbst unter Zellkulturbedingungen eine schlechte adenovirale Infektion glatter Gefäßmuskulatur beschreiben. Dies erklärt allerdings nicht, warum in anderen Studien Daten zur erfolgreichen Infektion glattmuskulärer Zellen der Gefäßwand veröffentlicht werden (s. I; 7.3). Die Gründe dafür müssen wahrscheinlich in der Verwendung von Viren unterschiedlichen Genoms und Generation, und vor allen Dingen auch in der Nachweismethode gesucht werden. Viele Arbeitsgruppen gehen mittlerweile dazu über, den Erfolg der Infektion direkt anhand des überexprimierten Proteins, z.B. mit Hilfe von Western Blot Analysen, festzumachen, ohne die Histologie des Gewebes zu untersuchen. Auch der Nachweis im Gewebehomogenat, der keine Identifizierung einzelner Zelltypen

zuläßt, ist weit verbreitet. In diesen Fällen wird die allgemeine Infektion häufig mit einer glattmuskulären Infektion gleichgesetzt, ohne den tatsächlichen Nachweis von infizierten glatten Muskelzellen in der Media der Gefäßwand zu liefern. Bei den veröffentlichten histologischen Analysen der infizierten Präparate ist häufig keine belastbare Aussage über die Identität der infizierten Zellen möglich, da die Gewebeschnitte Artefakte von z.B. Überfärbungen aufweisen. Inwieweit die adenovirale Infektion glattmuskulärer Gefäßzellen im Gewebeverband mit Viren der ersten Generationen unter kontraktionserhaltenden Bedingungen mit ausreichender Effizienz wirklich möglich ist bedarf weiterer Untersuchungen.

Es soll noch erwähnt werden, daß bei allen Infektionsexperimenten, unabhängig vom untersuchten Gewebe (Gefäßmuskulatur oder Ileummuskulatur, s. V-A; 6.2), von der untersuchten Spezies und von der verwendeten Analysemethode, in den nicht infizierten Kontrollpräparaten keinerlei  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Die Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität im Gewebehomogenat sowie die Blaufärbung einzelner Zellen in den Gewebepreparaten ist somit spezifisch und kann zweifelsfrei auf eine Infektion der Gewebe durch die verwendeten Adenoviren zurückgeführt werden.

### **6.2 In den Ileumpräparaten werden glatte Muskelzellen infiziert**

Anhand der Infektionsexperimente mit glatter Ileummuskulatur des Meerschweinchens konnte belegt werden, daß das verwendete Virus prinzipiell zur Infektion glatter Muskelzellen in der Lage ist. In der Ileummuskulatur des Meerschweinchens wurden eindeutig glatte Muskelzellen vom Virus penetriert (s. Abb. IV-15; B und C, S. 113). Der Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzahl ist jedoch mit weniger als 1 % sehr gering und wirft die Frage auf, welche Faktoren zwischen infizierten und nicht infizierten glatten Muskelzellen eine unterscheidende Rolle spielen, da die verwendete Viruskonzentration von  $1 \cdot 10^9$  bfu/ml auch für eine höhere Infektionseffizienz ausreichend Viruspartikel zur Verfügung gestellt hat. Eventuell existieren im Darm, wie für die Gefäßwand bereits postuliert [Frid et al., 1994], verschiedene Populationen an glatten Muskelzellen, die z.B. aufgrund unterschiedlicher Membranrezeptorzusammensetzung für die Adenoviren unterschiedlich zugänglich sind.

Auch in der Ileummuskulatur konnte die Infektion der bereits für die vaskulären Gewebe ausführlich diskutierten bipolaren Zellstrukturen beobachtet werden. Im Darmgewebe

könnte es sich bei diesen Zellen in der Tat um Cajal-Zellen handeln. Diese kommen zwar überwiegend zwischen der Longitudinal- und der Circulärmuskulatur vor, werden vereinzelt aber auch in den Muskelschichten selber gefunden [Übersicht bei Hanani und Freund, 2000].

Weiterführende immunhistochemische Experimente müßten herangezogen werden, um sowohl die Frage der unterschiedlichen Populationen der glatten Muskelzellen im Darmgewebe zu beantworten als auch die eindeutige Identifizierung des spezifisch infizierten Zelltyps zu ermöglichen.

## **B Untersuchungen an permeabilisierten glattmuskulären Geweben**

### **1 Allgemeine Betrachtungen zum experimentellen System und den Meßdaten**

Die Untersuchungen zur Analyse der Effekte der p21-aktivierten Proteinkinase 1 auf die Phosphorylierung der r-MLC des Myosins II und die glattmuskuläre Kontraktion wurden an permeabilisierten Muskelpräparaten durchgeführt. Die Permeabilisierung glatter Muskulatur mit unterschiedlichen Methoden gehört zu den Standardmethoden bei der Erforschung der Regulation der glattmuskulären Kontraktion [Übersicht bei Pfitzer, 1996]. Vor allem die mit Triton X-100 gehäutete Taenia caeci des Meerschweinchens ist ein sehr etabliertes experimentelles System.

Permeabilisierte Muskelpräparate stellen natürlich ein artifizielles experimentelles System dar, das die Situation *in vivo* nur bedingt widerspiegelt. Dies fällt bereits bei einem Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität intakter und permeabilisierter Muskelpräparate auf: Intakte Muskelgewebe reagieren sensitiver auf Calcium als gehäutete Präparate, da die Aktivität der MLCP *in vivo* stark gehemmt ist, und somit im Vergleich zu permeabilisierten Präparaten geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zur Induktion einer ähnlichen starken Kontraktion nötig sind. Der Grund für diese Beobachtung liegt wahrscheinlich im Verlust endogener Proteine, der in gehäuteten Präparaten immer stattfindet. So gehen z.B. unter anderem das Calmodulin und bei der Häutung mit Triton X-100 auch die monomeren G-Proteine nahezu vollständig verloren. Bereits sehr frühe Arbeiten haben gezeigt, daß die exogene Zugabe von Calmodulin für eine möglichst physiologische Regulation der glattmuskulären Kontraktion in permeabilisierten Muskelpräparaten essentiell ist [Sparrow et al., 1984]. Neben den kleinen cytosolischen Proteinen ist auch der Verlust von Strukturproteinen zu verzeichnen. Kossmann et al. [Kossman et al., 1987] konnten in ihrer Untersuchung zeigen, daß beim Häutungsvorgang vor allem auch große Anteile des Myosins und des Aktins verloren gehen. Dadurch kommt es zu einer Neuverteilung der kontraktilen Proteine innerhalb des Muskelgewebes, so daß die physiologische Integrität der Präparate nicht vollständig erhalten bleibt [Kossman et al., 1987].

Des Weiteren werden die Experimente mit gehäuteten Muskelpräparaten in der Regel bei relativ niedrigen, nicht physiologischen Temperaturen um ca. 23 °C durchgeführt. Bei höheren Temperaturen von 37 °C ist in den meisten Fällen zwar eine schnellere Reaktionsantwort der Gewebepreparate zu beobachten, doch ist die Stabilität der Präparate bei dieser Temperatur nicht mehr gewährleistet. Es kommt zu Kraftverlusten und der

Entwicklung eines starken Basaltonus [Sparrow et al., 1984]. Mit den meistens gewählten, niedrigeren Temperaturen kann diesen Effekten weitgehend vorgebeugt werden, doch sind auch dann keine konstanten Meßbedingungen über einen längeren Zeitraum gewährleistet. In vielen Fällen, so auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, kommt es zu einem sequentiellen Kraftverlust der Muskelpräparate, vor allem bei der maximalen Stimulierung (s. Abb. IV-20; A, S. 122). Auch andere kontraktile Parameter, wie z.B. die  $t_{1/2}$ -Zeit der Kontraktion, können sich im Laufe eines experimentellen Meßprotokolls ändern (s. Abb. IV-21; B, S. 124). Bei der Konzeption eines Experiments muß daher darauf geachtet werden, die Analyse eines Aspekts in einem möglichst kurzen Meßprotokoll zu ermöglichen.

Ein weiterer Punkt, der bei der Verwendung von permeabilisierten Muskelpräparaten kritisch betrachtet werden muß, ist die Frage der Zusammensetzung der intrazellulären Lösungen und die exakte Einstellung der Ionenkonzentrationen, besonders die der Calciumionen. Bei den verwendeten Konzentrationen des Chelatbildners EGTA kann in der Regel davon ausgegangen werden, daß zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$ , das aus intrazellulären Speichern wie dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, vollständig abgepuffert wird, und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Lösung konstant bleibt. Dennoch sollte bei der Interpretation der Meßergebnisse immer in Betracht gezogen werden, daß ein beobachteter Effekt auch durch Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Lösung induziert worden sein könnte.

Andererseits bieten permeabilisierte Muskelpräparate aber auch zahlreiche Vorteile sowohl gegenüber intakten Geweben als auch gegenüber rekonstituierten *in vitro*-Systemen. Messungen an intakten Präparaten erlauben in der Regel nur die phänotypische Beschreibung eines Effekts, ohne eine direkte Aussage über die intrazellulären Vorgänge zu ermöglichen. Rekonstituierte Systeme dagegen bieten keinerlei strukturellen Erhalt des Gewebesystems und führen damit leicht zu mißverständlichen Ergebnissen. So kann im biochemisch rekonstituierten System eine Stimulierung der Aktin-aktivierten Myosin-ATPase-Aktivität erst bei ca. 50 %iger Phosphorylierung der r-MLC beobachtet werden [Merkel et al., 1984], während sowohl im intakten als auch im permeabilisierten glatten Muskel ~20 % r-MLC-Phosphorylierung zur vollständigen Aktivierung der Kontraktion ausreichend sind [Cassidy et al., 1981]. Des weiteren bieten die unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Permeabilisierungsmethoden den Vorteil, die Komplexität des



experimentellen Systems ausgehend vom intakten Muskelpräparat schrittweise zu verringern, und so der jeweiligen Fragestellung anzupassen [z.B. Pfitzer und Boels, 1991]. Durch die differentielle Aufhebung der Membranbarriere bei den unterschiedlichen Häutungsverfahren entsteht, wie beim *in vitro*-Modell, die Möglichkeit, dem System zusätzliche, nicht membrangängige Substanzen, wie z.B. Enzyminhibitoren oder rekombinante Proteine, hinzuzufügen und so deren Effekt zu untersuchen. Im Gegenteil zur *in vitro*-Analyse können im permeabilisierten Präparat jedoch neben den direkten Auswirkungen auch potentiell unerwartete indirekte, über Zwischenstufen in den Signalkaskaden weitergeleitete Effekte aufgelöst werden.

Speziell im Hinblick auf die Untersuchung der für die Regulation der glattmuskulären Kontraktion essentiellen r-MLC-Phosphorylierung bieten permeabilisierte Muskelpräparate erhebliche Vorteile. *In vitro*-Phosphorylierungen mit rekombinanten, isolierten r-MLC spiegeln definitiv nicht den physiologischen Zustand wider und können daher leicht mißverständliche Ergebnisse bezüglich der Substratspezifität einer Proteinkinase liefern. Außerdem ist die Bestimmung der Enzymaktivitäten von MLCK und MLCP nur in permeabilisierten Muskelpräparaten verlässlich möglich. *In vitro*-Experimente mit isolierten r-MLC ermöglichen auch hier keinerlei Aussagen bezüglich der physiologischen Relevanz einer Beobachtung, und die Verwendung von Gesamtmyosin als *in vitro*-Substrat ist äußerst kompliziert, da Myosin nach Phosphorylierung der r-MLC Filamente ausbildet. Dadurch ergeben sich permanent variierende Versuchsbedingungen, die reproduzierbare und aussagekräftige Untersuchungen zur Enzymkinetik unmöglich machen.

Des weiteren spielt bei Phosphorylierungsreaktionen auch die räumliche Anordnung der beteiligten Proteine eine wichtige Rolle. Gerade bei der Phosphorylierung der r-MLC ist dieser Aspekt sehr zentral: Sowohl die MLCK als auch die MLCP sind an die Myofilamente gebunden und somit in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Zusätzlich läßt das Konzentrationsverhältnis von MLCK (3  $\mu\text{M}$ ) zu Myosin (30  $\mu\text{M}$ ) [Stull et al., 1996] auf eine komplexe Regulation der r-MLC-Phosphorylierung schließen, die mit *in vitro*-Experimenten nicht nachgestellt werden kann. Ebenso können auch sterische Behinderungen durch Proteine, die anscheinend nicht direkt an der Phosphorylierungsreaktion beteiligt zu sein scheinen, einen großen Einfluß auf den tatsächlichen Ablauf der Ereignisse haben. In permeabilisierten Muskelpräparaten bleibt der strukturelle Aufbau des Cytoskeletts und der eng am kontraktilen Apparat lokalisierten Proteine weitgehend

erhalten, und ermöglicht so Reaktionsbedingungen, die die *in vivo*-Situation deutlich besser widerspiegeln als rekonstituierte Systeme.

Permeabilisierte glatte Muskelpräparate stellen somit eine Art intermediäres System dar, in dem die parallele Untersuchung von physiologischen und biochemischen Aspekten möglich ist. Neben der Analyse der glattmuskulären Kontraktion werden die Vorteile permeabilisierter Systeme auch für die Bearbeitung anderer Fragestellungen genutzt. So existiert eine Vielzahl von Möglichkeiten, um die Membran von Zellen in Kultur zu permeabilisieren. Solche „semi-intakten“ Zellen können z.B. ebenfalls wie glattmuskuläre Gewebepreparate durch den Einsatz von Detergenzien (z.B. Saponin) oder durch die Applikation von mechanischen Scherkräften erzeugt werden [Übersicht bei Avery et al., 1999]. Auch Poren-formende Toxine, wie z.B. das  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus*, werden außer in der Erforschung des glatten Muskels auch zur Permeabilisierung von Zellen verwendet, die dann z.B. zur Untersuchung von exocytotischen Vorgängen herangezogen werden [Ahnert-Hilger et al., 1989 und 1993].

Die Untersuchung kontraktile Vorgänge mit Hilfe permeabilisierter Muskelpräparate ist komplex und mit diversen Schwierigkeiten behaftet. Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen für die gehäuteten Gewebe ist kompliziert und Schwankungen der Ionenkonzentrationen, vor allem der  $\text{Ca}^{2+}$ - und der  $\text{H}^{+}$ -Ionen, wirken sich extrem auf den Verlauf der Kraftmessungen aus. Außerdem ist eine kritische Konzeption der Meßprotokolle nötig, da jedes Präparat nur über einen gewissen Zeitraum definierte Bedingungen bietet. Um optimale und reproduzierbare Meßergebnisse zu ermöglichen, muß daher eine genaue Charakterisierung des jeweiligen Gewebepreparats und eine präzise experimentelle Planung erfolgen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontraktionsstudien an den permeabilisierten Geweben zeichnen sich durch eine hohe experimentelle Genauigkeit aus. Die Standardabweichung der Mittelwerte der einzelnen Meßreihen ist in den allermeisten Fällen nur gering, was die gute Reproduzierbarkeit der Messungen belegt. Gleichzeitig ist dies auch ein eindeutiges Kriterium dafür, daß die Optimierung der verwendeten Meßprotokolle für die jeweilige Problemstellung erfolgreich vorgenommen werden konnte. Die Daten zur semiquantitativen Bestimmung der Phosphorylierungsgrade der r-MLC sind gleichsam lediglich mit kleinen Fehlern behaftet. Die experimentellen Daten ermöglichen somit eine aussagekräftige und belastbare Beurteilung der untersuchten Fragestellungen.

## 2 PAK1 wirkt im glatten Muskel antagonistisch zu PAK3 und ROK

Die Bedeutung der p21-aktivierten Proteinkinasen für die Regulation von cytoskeletären Vorgängen in kultivierten, nicht-muskulären Zellen ist in diversen experimentellen Ansätzen untersucht und beschrieben worden (s. I; 6.4). Die veröffentlichten Ergebnisse sind vielfältig, nicht in allen Fällen eindeutig und im seltensten Fall von einem experimentellen System auf ein anderes übertragbar. Für glattmuskuläre Zellsysteme liegen bisher kaum Literaturdaten vor (s. I; 6.4), für den Einfluß der PAK auf die Regulation der glattmuskulären Kontraktion existiert bislang lediglich eine Arbeit [Van Eyk et al., 1998]. Aufgrund der teilweise kontroversen Datenlage bezüglich der Beteiligung der PAK an nicht-muskulären Bewegungsvorgängen, ist auch im glatten Muskelgewebe keine einfache Übertragung der mit der Isoform PAK3 erzielten Ergebnisse [Van Eyk et al., 1998] auf andere Isoformen zu erwarten. Um die bisher zur Bedeutung der PAK für die Regulation der glattmuskulären Kontraktion vorliegenden Daten entscheidend zu erweitern, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung der Isoform PAK1 an der Myosin II-Phosphorylierung und der Kontraktion der glatten Muskulatur untersucht.

In ersten Experimenten zur Analyse des Effekts von PAK1 auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur konnte gezeigt werden, daß PAK1 in allen untersuchten Geweben eine von PAK3 verschiedene Wirkung ausübt. Van Eyk und ihre Co-Autoren [Van Eyk et al., 1998] haben in ihrem experimentellen Ansatz mit Triton X-100 permeabilisierte Taenia caeci-Fasern des Meerschweinchens unter relaxierten Bedingungen in Gegenwart eines konstitutiv aktiven GST-PAK3 Fusionsproteins inkubiert, und beschreiben die Entwicklung einer langsamen,  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion. Im Gegensatz dazu wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit mit PAK1 inkubierten permeabilisierten Fasern in keinem Fall eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion induziert, sondern im Gegenteil sogar eine Hemmung der Kraftentwicklung in Gegenwart von PAK1 beobachtet, wobei sowohl der Kraftanstieg als auch das Kraftniveau inhibiert wurden (s. Abb. IV-17, S. 118).

Die widersprüchlichen Beobachtungen mit PAK1 und PAK3 sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf das experimentelle System zurückzuführen. In beiden Fällen wird ein konstitutiv aktiviertes rekombinantes GST-Fusionsprotein verwendet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde die GST-PAK1<sup>T422E</sup> verwendet, welche durch eine Punktmutation in der Kinasedomäne aktiviert wird [Manser et al., 1997]. Van Eyk et al. [Van Eyk et al., 1998] haben zwar mit nicht-mutiertem Protein gearbeitet, da die PAK jedoch in Lösung als Dimere vorliegen [Lei et al., 2000] und sich durch

trans-Phosphorylierung schnell wechselseitig aktivieren können, sollte der GST-Anteil des Proteins aufgrund seiner Fähigkeit zur Dimerisierung ebenfalls zu einer erhöhten basalen Aktivität des Enzyms führen. Die Autoren bezeichnen das von ihnen verwendete Konstrukt dementsprechend ebenfalls als konstitutiv aktiv.

Auch die Dauer der Inkubation mit dem Fusionsprotein ist in beiden Arbeiten vergleichbar, und beträgt ca. 60 Minuten. Die von PAK3 induzierte Kontraktion ist sehr langsam und erreicht ihr Plateau erst nach der recht langen Inkubationszeit von ca. 1 Stunde [Van Eyk et al., 1998]. Auch in dieser Arbeit wurde in den meisten Experimenten eine ca. 60-minütige Inkubation in Gegenwart der PAK1 durchgeführt, primär um sicher zu stellen, daß eine eventuelle langsame Kontraktion, wie sie mit PAK3 beobachtet worden ist [Van Eyk et al., 1998], nicht unbemerkt bleibt. Außerdem könnte dieser relativ lange Zeitraum erforderlich sein, da die gereinigten Fusionsproteine eine relativ geringe katalytische Aktivität besitzen und die durch die rekombinanten Kinasen katalysierten Phosphorylierungen vergleichsweise instabil sind [mündliche Mitteilung von E. Manser]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings ebenfalls gezeigt werden, daß PAK1 auch nach Reduktion der Inkubationszeit um 50 % in allen analysierten experimentellen Ansätzen die gleichen Effekte hervorruft (s. Tab. IV-3, S. 119). Dadurch rückt die Inkubationszeit an realistischere Werte für zelluläre Regulationsmechanismen heran. Außerdem sind ähnliche Inkubationszeiten auch bei anderen Experimenten mit gehäuteten glattmuskulären Präparaten verwendet worden: Bei den Experimenten mit konstitutiv aktiver MLCK ist eine 30-40-minütige Inkubationszeit notwendig, um den vollen Effekt auf die Kraft beobachten zu können [Walsh et al., 1982] und Experimente mit Caldesmon, das mit ca. 93 kDa der GST-PAK1<sup>T422E</sup> (ca. 130 kDa) der Größe nach vergleichbar ist, haben gezeigt, daß ca. 30 Minuten Inkubation in Gegenwart von Caldesmon nötig sind, um ein vergleichbares Triton-gehäutetes Muskelpräparat homogen mit dem Protein zu beladen [unveröffentlichtes Ergebnis unserer Arbeitsgruppe]. Die PAK1-Daten dieser Arbeit liegen somit offensichtlich im Rahmen der vom experimentellen System vorgegebenen Bedingungen, so daß den durch PAK1 induzierten Effekten auch tatsächlich eine physiologisch relevante Rolle zukommen kann.

Ein weiterer Vergleich der experimentellen Systeme, die für die Untersuchung der PAK1- bzw. PAK3-induzierten Effekte verwendet wurden, zeigt, daß sowohl Herkunft als auch Präparation des Gewebes in beiden Studien sehr ähnlich sind. Es handelt sich beide Male um glatte Muskulatur der *Taenia caeci* des Meerschweinchens, die mittels eines nahezu identischen Protokolls mit Triton X-100 permeabilisiert wurde. Für die

Permeabilisierungsmethode dieser Arbeit siehe Kapitel III 1.4.3, für die Experimente mit PAK3 wurde ein experimentelles Protokoll nach [Strauss et al., 1992] verwendet. Lediglich die Verwendung des Phosphataseninhibitors Okadainsäure während der Inkubation mit dem rekombinanten Fusionsprotein stellt einen bemerkenswerten Unterschied der experimentellen Ansätze dar. Okadainsäure wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um sowohl die Autophosphorylierung der PAK1 als auch die durch PAK1 katalysierten Substratphosphorylierungen zu stabilisieren. Aufgrund der bereits erwähnten geringen Aktivität des rekombinanten Proteins und des langsamen Ablaufs der Phosphorylierungsreaktionen durch die rekombinante Proteinkinase konnte somit eine deutliche Optimierung des experimentellen Systems erfolgen. Mit der Okadainsäure wurde bewußt ein Phosphataseinhibitor gewählt, der Proteinphosphatasen vom Typ 1 (PP1), zu denen bekanntermaßen auch die MLCP gehört, erst beim Einsatz hoher Konzentrationen beeinflusst, so daß bei einer eingesetzten Konzentration von 10 nM keine Auswirkungen auf die grundlegenden Vorgänge der glattmuskulären Kontraktion und Relaxation erwartet wurden. Diese Vermutung konnte in allen diesbezüglich analysierten Experimenten zur Charakterisierung der kontraktiven Parameter sowie der r-MLC-Phosphorylierung bestätigt werden. Okadainsäure führt in keinem untersuchten Fall zu signifikanten Veränderungen der Meßergebnisse (s. Abb. IV-18, S. 120; Abb. IV-23, S. 127; Abb. IV-26, S. 131; Abb. IV-27, S. 132); die für die Regulation der Kontraktion essentielle MLCP wird, wie bei der eingesetzten Konzentration erwartet [Takai et al., 1989], offensichtlich nicht beeinflusst.

Aus den gerade angeführten Gründen sind Unterschiede im experimentellen System mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht für die Induktion der gegenläufigen Effekte der beiden Proteinkinasen PAK1 und PAK3 verantwortlich. Vielmehr scheint es trotz der hohen Homologie der PAK-Proteine in einem Gewebe Isoform-spezifische Unterschiede zu geben. Die Mechanismen, über die eine Unterscheidung der Isoformen erfolgen könnte, sind bisher nicht untersucht worden. Denkbar wäre z.B. die enge Kopplung der einzelnen PAK-Isoformen an definierte Signalkaskaden, so daß beispielsweise bei der Initiierung eines Rezeptor-gekoppelten Signalweges durch einen bestimmten Stimulus eine einzelne PAK-Isoform gezielt rekrutiert und aktiviert wird. Erreichbar wäre eine solch stringente Zuordnung einzelner Isoformen eines Proteins zu bestimmten extrazellulären Stimuli z.B. durch die distinkte Lokalisierung der einzelnen Isoformen in der Nähe eines bestimmten membranständigen Rezeptors. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant, nicht nur physiologische Agonisten der PAK im glatten Muskelgewebe zu identifizieren,

sondern gleichzeitig eine Unterscheidung der beim jeweiligen Stimulus aktivierten PAK-Isoformen vorzunehmen.

Bezüglich der physiologischen Relevanz der einzelnen PAK-Isoformen speziell für die Regulation der glattmuskulären Kontraktion liefern Schmitz et al. [Schmitz et al., 1998] wichtige Daten. Laut den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe ist PAK1 in kultivierten glatten Muskelzellen eindeutig die dominante Isoform, während PAK3 nur sehr schwach exprimiert wird und eine Expression von PAK2 nicht nachweisbar ist. Mit den im Rahmen dieser Arbeit erstmalig charakterisierten Einflüssen des Signalproteins PAK1 auf die Regulation der glattmuskulären Kontraktion werden somit Daten zu der physiologisch wahrscheinlich bedeutungsvollsten PAK-Isoform veröffentlicht. Der relevante Effekt der PAK im glatten Muskel ist demnach eher die durch PAK1 induzierte Inhibierung der glattmuskulären Kontraktion als die durch PAK3 ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kraftentwicklung.

Auch die Tatsache, daß nach Einwirkung von PAK1 ein zwar gehemmter, aber dennoch normaler Ablauf der Kontraktion möglich ist, PAK1 die Integrität der Myofilamente also nicht zerstört, zeigt, daß die Effekte von PAK1 durchaus von physiologischer Relevanz sein können.

PAK1 als dominanter Isoform der PAK würde somit im glatten Muskel die Rolle eines ROK-Antagonisten zukommen, da ROK sowohl über direkte Phosphorylierung der r-MLC (s. I; 5) als auch über Inhibierung der MLCP (s. I; 4.1.2) eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung der glattmuskulären Kontraktion induziert. Für die monomeren G-Proteine RhoA bzw. Cdc42 und Rac, die bei der intrazellulären Signalweiterleitung den Proteinkinasen ROK bzw. PAK direkt vorangeschaltet sind, wurden kompetitive und teilweise auch antagonistische Einflüsse auf verschiedene cytoskeletäre Vorgänge in nicht-muskulären Systemen wiederholt beschrieben [Übersicht bei Lim et al., 1996] und konnten in Bezug auf die Kontraktion der glatten Muskulatur im Labor von Somlyo [Gong et al., 2001] gezeigt werden. In mit  $\beta$ -Escin permeabilisierter *V. portalis* (Portalvene) des Kaninchens induziert aktives RhoA eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung, die durch konstitutiv aktives Cdc42 und Rac aufgehoben wird [Gong et al., 2001]. Mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen liegen nun erstmals Daten vor, die auf einen Antagonismus der RhoA- bzw. Cdc42/Rac-Signalkaskaden bezüglich der Regulation der glattmuskulären Kontraktion auch auf der Ebene der Effektorproteine ROK und PAK1 hinweisen.

### **3 Die Effekte von PAK1 auf die glattmuskuläre Kontraktion sind spezifisch und reversibel**

Die durch PAK1 induzierten Effekte auf die kontraktile Eigenschaften des glatten Muskelgewebes wurden im weiteren Verlauf der experimentellen Vorgehensweise mit Hilfe systematischer Kontrollmessungen auf ihre Spezifität hin untersucht. Die Experimente mit Hitze-inaktivierter PAK1, bei denen keine Beeinträchtigung der Kontraktion beobachtet werden konnte, liefern dabei deutliche Hinweise für die spezifische Wirkung der PAK1 (s. Abb. IV-19, S. 121). In weiteren Kontrollexperimenten konnte außerdem eine partielle Reversibilität der durch PAK1 auf die kontraktile Parameter der glatten Muskulatur ausgeübten Einflüsse gezeigt werden (s. Abb. IV-21, S. 124), auch dies ein Hinweis für eine spezifische Wirkung der rekombinanten Proteinkinase. Durch Inkubation in PAK1-freier Lösung wurde ein vollständiges Auswaschen des Fusionsproteins und gleichzeitig die Aufhebung der Inhibition sowohl des Kraftniveaus als auch des Kraftverlaufs erzielt.

Eine parallel zu den Experimenten zur Reversibilität durchgeführte Western Blot Analyse (s. Abb. IV-22, S. 125) belegt zunächst die Expression von Mitgliedern der PAK-Familie im glatten Muskelgewebe der Taenia caeci, so daß eine Beteiligung dieser Proteine an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion auch tatsächlich von physiologischer Relevanz sein kann. Das Erscheinen von drei distinkten Banden auf der Blotmembran nach Inkubation mit einem anti-PAK1-Antikörper kann mehrere Gründe haben. Zum einen wird von der Herstellerfirma des Antikörpers eine Kreuzreaktion mit den PAK-Isoformen 2 und 3 beschrieben, so daß die einzelnen detektierten Banden verschiedene PAK-Proteinen repräsentieren könnten. Zum anderen zeigt die Literatur, daß die PAK in unterschiedlich stark phosphorylierten Zuständen vorkommen können und dann ein heterogenes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel besitzen [Manser et al., 1995].

Des weiteren belegt der Western Blot, daß die endogenen PAK-Proteine im Laufe eines Experiments aus dem Gewebe heraus gewaschen werden. Anhand dieses Ergebnisses können vielfältige Schlußfolgerungen bezüglich der zellulären Lokalisierung der PAK-Proteine abgeleitet werden. Zunächst ist die Tatsache, daß der stark invasive Eingriff der Permeabilisierung mit Triton X-100 nicht automatisch den Verlust der PAK-Proteine bewirkt, ein guter Hinweis für eine vergleichsweise enge Assoziation der PAK mit dem kontraktilem Apparat. Diese räumliche Nähe zum Cytoskelett macht eine Beteiligung der PAK an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion unter physiologischen

Bedingungen möglich. Allerdings ist dieser Kontakt zum Cytoskelett nicht statisch, da auch die endogenen PAK-Proteine am Ende eines Experiments nicht mehr im Gewebe vorhanden sind. Aufgrund der bekannten Datenlage, die eine Translokation der PAK zur Membran unter verschiedenen experimentellen Bedingungen belegen (s. I; 6.3), ist eine gewisse Mobilität der Proteine zu erwarten. Der Translokation zur Membran müßte demnach anhand der hier ermittelten Ergebnisse eine Dissoziation der PAK von einem am Cytoskelett lokalisierten Bindungspartner, der während des Häutungsvorgangs für den Verbleib der PAK im Gewebepreparat verantwortlich ist, vorausgehen. Da im mit Triton X-100 permeabilisierten Muskelpräparat die Zellmembran nicht mehr vorhanden ist, würde dieser Vorgang zum Auswaschen der PAK führen.

Durch differentielles Auswaschen endogener Proteine kann auch der sehr häufig beobachtete Kraftverlust der maximalen Kontraktionen (s. Abb. IV-20, S. 122), sowie der Verlauf der  $t_{1/2}$ -Zeit der submaximalen Kontraktion (s. Abb. IV-21; B, S. 124) erklärt werden. Betrachtet man die gemessenen Kraftverläufe, erkennt man unter Kontrollbedingungen eine stetige Abnahme sowohl der Maximalkraft als auch der Halbwertszeit der submaximalen Kontraktion. Wie die PAK-Proteine könnten sich auch andere regulatorische Signalproteine im Verlauf der Messungen von ihren Bindungspartner am Cytoskelett lösen und aufgrund der fehlenden Zellmembran verloren gehen.

#### **4 Der Wirkmechanismus und die Substratspezifität von PAK1 im glatten Muskel**

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte die Aufklärung des Hemm-Mechanismus und die Identifizierung der PAK1-Substrate im glatten Muskel erfolgen.

Für die Familie der p21-aktivierten Proteinkinasen sind sowohl an den Intermediärfilamenten als auch am Aktin-Myosin-Apparat verschiedene Substrate identifiziert worden. PAK1 führt zu einer inhibitorischen Phosphorylierung der MLCK, und damit zu einer Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung [Sanders et al., 1999], kann unter anderen experimentellen Bedingungen aber auch eine Erhöhung der r-MLC-Phosphorylierung bewirken [Sells et al., 1999]. Die beiden Substrate MLCK und r-MLC sind auch für PAK2 beschrieben worden [Chew et al., 1998; Goeckeler et al., 2000; Zeng et al., 2000]. Auch hier wird wieder offensichtlich, daß die bisher bekannte Datenlage teilweise anscheinend widersprüchlich ist und keine einfachen Übertragungen zuläßt. Alle



diese Ergebnisse stammen aus Untersuchungen an kultivierten Zellen nicht-muskulären Ursprungs. Lediglich für PAK3 existieren Angaben über potentielle glattmuskuläre Substrate. Für PAK3 wurden mit *in vitro*-Experimenten die r-MLC, sowie in permeabilisiertem glatten Muskelgewebe Caldesmon und Desmin als potentielle Substrate identifiziert [Van Eyk et al., 1998; Foster et al., 2000].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden basierend auf der bekannten Datenlage erstmalig alle drei bisher beschriebenen, direkt an der Kontraktion der glatten Muskulatur beteiligten PAK-Substrate (r-MLC, MLCK, Caldesmon) untersucht. Dabei konnte die Identifizierung des Substrats der PAK1 im glatten Muskel erfolgen, und gezeigt werden, daß PAK1 von PAK3 unterschiedliche Phosphorylierungsreaktionen katalysiert. Aufgrund der nahezu identischen experimentellen Systeme dieser Arbeit und der Studie von Van Eyk [Van Eyk et al., 1998] konnten somit erste Hinweise zu Isoform-spezifischen Effekten der PAK im glatten Muskel geliefert werden.

### 4.1 Die r-MLC sind kein Substrat für PAK1

Die Untersuchung der r-MLC als potentielles Substrat für PAK1 wurde aufgrund der bereits erwähnten Aspekte (s. V-B; 1) nicht *in vitro* durchgeführt, sondern statt dessen parallel zur Untersuchung der Kontraktionskraft analysiert. Dadurch ist die direkte Korrelation zwischen Kontraktionsverlauf und r-MLC-Phosphorylierung gewährleistet.

Es konnte festgestellt werden, daß die glattmuskulären r-MLC kein Substrat für PAK1 darstellen, da unter allen experimentellen Bedingungen kein Anstieg, sondern im Gegenteil sogar eine Abnahme des Phosphorylierungsgrades in Gegenwart von PAK1 beobachtet werden konnte (s. Abb. IV-23, S. 127; Abb. IV-27, S. 132). PAK1 phosphoryliert die r-MLC demnach weder direkt, noch führt PAK1 indirekt über die Aktivierung einer anderen Proteinkinase zu einer Erhöhung der r-MLC-Phosphorylierung.

Bei *in vitro*-Experimenten mit gereinigtem Gesamtmyosin konnte dieser Befund bestätigt werden [de Lanerolle, unveröffentlichte Ergebnisse]: Wird aus der Trachea des Rinds gereinigtes Myosin II mit konstitutiv aktiver PAK1 in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert und anschließend der Phosphorylierungsgrad der r-MLC analysiert, kann keine Inkorporation von Radioaktivität in die r-MLC detektiert werden. PAK1 ist demnach auch *in vitro* nicht in der Lage, die r-MLC als Bestandteil des Myosinmoleküls zu phosphorylieren.

#### 4.2 PAK1 phosphoryliert die MLCK und hemmt so deren Aktivität

Die Untersuchung der MLCK-Aktivität unter Einwirkung von PAK1 erfolgte wie die Analyse der r-MLC-Phosphorylierung ebenfalls in permeabilisierten Muskelpräparaten. Als Meßprotokoll wurde eine für die spezielle Fragestellung optimierte Versuchsvorschrift von Lee et al. [Lee et al., 1997a] verwendet (s. Abb. IV-24, S. 128). Bei diesem Protokoll kann nach vollständiger Inhibierung der MLCP eine rein MLCK-abhängige Kontraktion ausgelöst werden. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zu *in vitro*-Untersuchungen ist die Tatsache, daß das Substrat in seiner physiologischen Umgebung verbleibt und indirekte Effekte auf die Aktivität der MLCK nachgewiesen werden können.

In Kontrollmessungen mit dem MLCK-Inhibitor Wortmannin konnte zunächst gezeigt werden, daß die reproduzierbare Auflösung von Hemmeffekten auf die Aktivität der MLCK mit dem verwendeten Meßprotokoll möglich ist (s. Abb. IV-25; A, S. 130). Analog zu den Ergebnissen von Lee et al. [Lee et al., 1997a] kommt es mit Wortmannin zu einer deutlichen Hemmung des Kraftanstiegs, so daß die Korrelation zwischen MLCK-Aktivität und Rate der Kontraktion belegt ist.

In diesem Ansatz wurde mit einer hohen Konzentration von 10 µM Wortmannin, die eine vollständige Hemmung der MLCK bewirken sollte, gearbeitet. Es wurde jedoch keine komplette Unterbindung der Kraftentwicklung, sondern eine zeitlich stark verzögerte, schleichende Kontraktion beobachtet, die verglichen mit den Kontrollmessungen relativ hohe Kraftniveaus erreicht. Auslöser dieser unerwarteten Kontraktion können mehrere Faktoren sein. So ist bekannt, daß Wortmannin mit ATP um die Bindung an das aktive Zentrum der Proteinkinase konkurriert [Nakanishi et al., 1992]. Da die zur Induktion der Kontraktion verwendete Reaktionslösung relativ hohe ATP-Konzentrationen (7,5 mM) enthält, könnte es zu einer Verdrängung des Wortmannins und damit zur teilweisen Aufhebung des Hemmeffektes kommen.

Ein weiterer Grund könnte die Existenz der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen r-MLC-Proteinkinasen ROK [Amano et al., 1996], ZIPK [Niïro und Ikebe, 2001] und ILK [Deng et al., 2001] sein. Diese relativ neu entdeckte Gruppe von Proteinkinasen ist Wortmannin gegenüber eher insensitiv, so daß sie auch in Gegenwart von Wortmannin zur Phosphorylierung der r-MLC in der Lage sind, und damit die beobachtete Kontraktion induzieren könnten.

Nach der Etablierung dieses Meßprotokolls konnte auch der Effekt von PAK1 auf die Aktivität der MLCK in glattmuskulärem Gewebe untersucht werden (s. Abb. IV-25; A, S. 130).

In Anwesenheit von PAK1 war nicht nur der Kraftanstieg, sondern auch die Rate der r-MLC-Phosphorylierung (s. Abb. IV-27, S. 132; Tab. IV-4, S. 133) signifikant inhibiert. Kontraktion und r-MLC-Phosphorylierung zeigen eine sehr gute Korrelation. Die Kraftdaten und noch stärker die Daten zur r-MLC-Phosphorylierung lassen auf einen inhibitorischen Einfluß von PAK1 auf die MLCK-Aktivität schließen.

Die Modifizierung der MLCK-Aktivität durch PAK1 sollte von einer verstärkten Phosphorylierung der MLCK in Gegenwart von PAK1 begleitet sein. Dies konnte in Experimenten mit radioaktiv markiertem ATP gezeigt werden (s. Abb. IV-28; D, S. 134). Die MLCK ist in Muskelfasern, die mit PAK1 inkubiert wurden, signifikant stärker phosphoryliert als in Kontrollpräparaten, die ohne das rekombinante Protein inkubiert wurden. Für nicht-muskuläre Systeme ist die inhibitorische Phosphorylierung der MLCK durch Mitglieder der PAK-Familie bereits beschrieben worden. Die Überexpression von konstitutiv aktivem PAK1 in BHK-21-Zellen führt zu einer Hemmung der MLCK-Aktivität und zu einer Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung [Sanders et al., 1999]. Daraus resultiert eine inhibierte Ausbreitung der Zellen auf der extrazellulären Matrix [Sanders et al., 1999]. In Saponin-permeabilisierten Endothelzellen wird durch PAK2 ebenfalls eine gesenkte MLCK-Aktivität bewirkt, die hier zu einer signifikanten Verringerung der Zugkraft der Zellen führt [Goeckeler et al., 2000].

Der Wirkmechanismus der MLCK-Hemmung ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Es wird postuliert, daß es sich eher um eine Beeinflussung der Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ), als um eine veränderte Affinität der MLCK für Calmodulin ( $K_{CaM}$ ) handelt [Sanders et al., 1999]. Bei einer Veränderung des  $K_{CaM}$ -Wertes der MLCK wäre eine Phosphorylierung der MLCK an der sogenannten Position A zu erwarten [Übersicht bei Gallagher et al., 1997]. Die Phosphorylierung dieses Serinrestes in der Nähe der  $Ca^{2+}$ /CaM-Bindungsstelle der MLCK bewirkt eine Erhöhung des  $K_{CaM}$ -Wertes um einen Faktor 10. In der Tat liegen Daten vor, mit denen die Phosphorylierung der MLCK durch PAK2 an zwei Serinresten belegt wird, von denen ein Serinrest in der Nähe der sogenannten Position A liegt [Goeckeler et al., 2000]. Um die Frage nach dem genauen Mechanismus der Hemmung der MLCK-Aktivität durch die PAK-katalysierte Phosphorylierung zu klären, wären zusätzliche *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente hilfreich.

Die Phosphorylierung der MLCK durch andere Proteinkinasen wird bekanntermaßen zumindest *in vitro* durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM an die MLCK verhindert. Dies scheint nach der bisherigen Datenlage auch für die durch PAK katalysierte MLCK-Phosphorylierung zuzutreffen. Goeckeler et al. [Goeckeler et al., 2000] berichten von einer Blockierung der MLCK-Phosphorylierung durch PAK2 nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM. Die hier durchgeführten Untersuchungen liefern Hinweise darauf, daß die Bindung von CaM auch die Phosphorylierung der MLCK durch PAK1 modifiziert, und sollen später diskutiert werden (s. V-B; 6).

Die Experimente zur radioaktiven Markierung von Proteinen, wie z.B. der MLCK, in den Geweben zeigen als einzige eine deutliche Reaktion auf die Anwesenheit des Phosphataseinhibitors Okadainsäure (s. Abb. IV-28, S. 134; Abb. IV-29, S. 136). Sowohl bei der Untersuchung der MLCK-Phosphorylierung als auch bei der später diskutierten Caldesmon-Phosphorylierung kommt es durch Okadainsäure zu einer sehr deutlichen Verstärkung der Inkorporation von  $^{32}\text{P}$  in das untersuchte Protein im Vergleich zur basalen Kontrolle in Abwesenheit von Okadainsäure. Dieser Befund erklärt sich direkt dadurch, daß mit 10 nM Okadainsäure die Proteinphosphatasen vom Typ 2A (PP2A), die mit den PP1 den Großteil der zellulären Phosphatasen ausmachen, nahezu vollständig gehemmt sind. Eine Dephosphorylierung von Serin- und Threoninresten in zellulären Proteinen findet unter diesen Bedingungen nur noch in sehr geringem Ausmaß statt. Auch die Dephosphorylierung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine MLCK [Übersicht bei Gallagher et al., 1997] und Caldesmon [Pato et al., 1993] wird unter anderem von den PP2A katalysiert. Unter dieser Voraussetzung und der Annahme, daß in den Gewebepräparaten  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Proteinkinasen für MLCK und Caldesmon existieren, wird die verstärkte Inkorporation von radioaktivem Phosphat in diese Proteine in Gegenwart von 10 nM Okadainsäure direkt verständlich. Es soll in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins II von der MLCP, einer PP1, ausgeführt und, wie in mehreren experimentellen Ansätzen gezeigt, von der Präsenz der Okadainsäure nicht beeinflußt wird.

Obwohl es in Anwesenheit von Okadainsäure zu der gerade geschilderten starken Phosphorylierung der MLCK im Vergleich zur basalen Kontrolle kommt, verhalten sich die glattmuskulären Präparate hinsichtlich ihres Kontraktionsverhaltens unter Gleichgewichtsbedingungen gleich (s. Abb. IV-18, S. 120). Bei der Ermittlung der Rate

der Kontraktion (s. Abb. IV-26, S. 131) und der Rate der r-MLC-Phosphorylierung (s. Abb. IV-27, S. 132) treten allerdings geringe Abweichungen auf, die auf eine leicht höhere Aktivität der MLCK in Abwesenheit von Okadainsäure schließen lassen. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Der hohe Phosphoryierungsgrad der MLCK scheint somit keinen großen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms zu haben. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt wurde [Stull et al., 1990], weist die Sequenz der MLCK vielfältige Phosphorylierungsmotive auf und kann auch *in vivo* multipel phosphoryliert vorliegen. Die Bedeutung der meisten dieser Phosphorylierungsstellen für die Regulation der MLCK-Aktivität wird im Allgemeinen als unerheblich angesehen.

#### 4.3 PAK1 beeinflusst die Aktivität der MLCP höchstwahrscheinlich nicht

Wie bereits in der Einleitung dargestellt (s. I; 4.1), kann neben einer Inhibierung der MLCK auch eine Aktivierung der MLCP der Grund für die in Anwesenheit von PAK1 beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung und die Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung sein. Für die Bedeutung von Mitgliedern der PAK-Familie für die Regulation der MLCP liegen in der Literatur bislang keine Daten vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Experimente durchgeführt, die den Einfluß von PAK1 auf die Aktivität der glattmuskulären MLCP untersuchen. Die Rate der Relaxation unter vollständiger Hemmung der MLCK wurde hier, analog zur Rate der Kontraktion, als erstes Maß für die MLCP-Aktivität gewertet.

Das für diese Fragestellung optimierte Meßprotokoll wurde zunächst in Kontrollmessungen getestet. Diese wurden in Anwesenheit von cGMP durchgeführt (s. Abb. IV-32; A, S. 141). Die desensitivierende Wirkung von cGMP auf die glattmuskuläre Kontraktion ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [Pfitzer et al., 1986; Nishimura und Van Breemen, 1989; Savineau und Marthan, 1994] und konnte auf eine durch die Proteinkinase G (PKG) vermittelte Stimulierung der MLCP-Aktivität zurückgeführt werden [Wu et al., 1996; Lee et al., 1997a]. Für diese Versuche mußten  $\beta$ -Escin permeabilisierte Ileumfasern des Meerschweinchens verwendet werden, da die Häutung mit Triton X-100 zum Verlust der Proteinkinase G führt, so daß cGMP in diesen Präparaten nur bei gleichzeitiger Zugabe von aktiver PKG eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung induzieren kann.

Die analog zu einer früheren Studie [Lee et al., 1997a] erwartete Erhöhung der Relaxationsrate in Gegenwart von cGMP konnte auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontrollmessungen gezeigt werden und belegt die erfolgreiche Konzeption des experimentellen Protokolls. Der Effekt des cGMP konnte außerdem zusätzlich in Untersuchungen der isometrischen Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen bestätigt werden. In beiden experimentellen Ansätzen konnte eine geringe, aber signifikante Desensitivierung der Kontraktionskraft festgestellt werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigt, daß auch in der Arbeit von Lee et al. [Lee et al., 1997a] die Beschleunigung der Relaxation durch cGMP moderat ausfällt. Auch die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Hemmung der Kraft unter Gleichgewichtsbedingungen liegt mit ca. 17 % (s. Abb. IV-32; B, S. 141) in der Größenordnung bereits veröffentlichter Daten. Die Arbeitsgruppe um Somlyo [Wu et al., 1998] beschreibt die Induktion einer ca. 15 %igen Relaxation durch 8-Br-cGMP in permeabilisierter Ileummuskulatur des Kaninchens.

Wird mit diesem experimentellen Protokoll die Rate der Relaxation in An- und Abwesenheit von PAK1 untersucht, findet sich zwischen den beiden Reaktionsbedingungen kein Unterschied im Kraftverlauf (s. Abb. IV-31; B, S. 139). Eine Modifizierung der MLCP-Aktivität durch PAK1 im glatten Muskelgewebe kann dadurch weitgehend ausgeschlossen werden. Da die Kontraktionskraft ein indirektes Maß für die Enzymaktivität darstellt, ist für die endgültige Klärung dieser Fragestellung analog zur Rate der r-MLC-Phosphorylierung noch die Rate der Gegenreaktion, der r-MLC-Dephosphorylierung, zu bestimmen.

#### **4.4 PAK1 phosphoryliert Caldesmon im glatten Muskel kaum**

Die einzigen bisher durchgeführten Untersuchungen mit PAK-Proteinen an glattmuskulärem Geweben zeigen die Entwicklung einer durch PAK3 induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion, die von den Experimentatoren auf eine Phosphorylierung des Caldesmons zurückgeführt wird [Van Eyk et al., 1998; Foster et al., 2000]. Aus *in vitro*-Daten, die eine Hemmung der Myosin-ATPase-Aktivität durch Caldesmon gezeigt haben, die durch Phosphorylierung des Caldesmons aufgehoben werden kann (s. I; 4.2.2), wurde die Vermutung abgeleitet, daß dieser Mechanismus auch

*in vivo* von Relevanz sein könnte. Die Daten von Van Eyk et al. [Van Eyk et al., 1998] würden diese Schlußfolgerung bestätigen. Obwohl nach den bisher im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eine Phosphorylierung des Caldesmons sehr unwahrscheinlich ist, wurde im Sinne einer umfassenden Untersuchung auch die Analyse der Phosphorylierung des Caldesmons in An- und Abwesenheit von PAK1 vorgenommen. Caldesmon wird zu diesem Zweck, ebenso wie die MLCK, aus Muskelfasern, die in An- bzw. Abwesenheit von PAK1 in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert wurden, immunpräzipitiert und der Phosphorylierungsgrad mittels Autoradiographie analysiert.

Ein erster Vergleich der angefärbten MLCK- und Caldesmon-Immunpräzipitate im SDS-Gel zeigt, daß die Proteinbande der Caldesmon-Immunpräzipitate um ein Vielfaches intensiver ist als das Signal der MLCK. Erklärt werden kann diese Beobachtung direkt durch die intrazellulären Konzentrationen der beiden Proteine. Während der Gehalt an MLCK bei ca. 3  $\mu\text{M}$  liegt [Stull et al., 1996], beträgt die Caldesmon-Konzentration ca. 8  $\mu\text{M}$  [Haeberle et al., 1992], und ist somit deutlich höher. Außerdem muß noch erwähnt werden, daß die Präzipitation des Caldesmons nicht ohne Verunreinigung erfolgte, sondern immer Spuren von MLCK mit isoliert wurden (s. Abb. IV-30, S. 138).

Die korrespondierende Autoradiographie der Caldesmon-Immunpräzipitate zeigt, daß unter den drei gewählten Versuchsbedingungen (basal, Puffer, PAK1) eine Phosphorylierung des Caldesmons kaum detektierbar ist. In Anwesenheit von PAK1 wird mehr Phosphat inkorporiert als in der Kontrolle in Gegenwart des Puffers (s. Abb. IV-29; D, S. 136).

Unter Berücksichtigung der Verunreinigung der Caldesmon-Immunpräzipitate mit MLCK und der Tatsache, daß die beobachteten Verhältnisse der Caldesmon-Phosphorylierung zwischen den drei unterschiedlichen Versuchsbedingungen (basal < Puffer < PAK1) exakt den für die MLCK beschriebenen Verhältnissen entsprechen, liegt die Vermutung nahe, daß die detektierte Phosphorylierung nicht dem Caldesmon, sondern der MLCK zugeordnet werden muß.

Sollte es sich bei der beobachteten Phosphorylierung trotz allem um die Inkorporation von Phosphat in das Caldesmon handeln, kann mit folgenden Überlegungen eine vorläufige Abschätzung des Phosphorylierungsgrades, und damit der physiologischen Relevanz dieser Phosphorylierung, erfolgen: Das Verhältnis der durch PAK1 induzierten MLCK- zur Caldesmon-Phosphorylierung liegt um einen Faktor 30 auf der Seite der MLCK-Phosphorylierung. Unter der Annahme, daß die MLCK in Gegenwart von PAK1 mit einer Phosphatinkorporation von 2 mol  $\text{P}_i$ /mol MLCK vollständig phosphoryliert vorliegt

[Goeckeler et al., 2000], würde das unter Berücksichtigung der präzipitierten Proteinkonzentrationen einem Phosphateinbau von  $< 0,1 \text{ mol P}_i/\text{mol Caldesmon}$  entsprechen. Selbst die stöchiometrische Phosphorylierung von Caldesmon mit konstitutiv aktiver PAK3 unter *in vitro*-Bedingungen, die mit  $2 \text{ mol P}_i/\text{mol Caldesmon}$  deutlich höher liegt als der hier abgeschätzte Wert, führt nur zu einer ca. 50 %igen Aufhebung der inhibierenden Wirkung des Caldesmons auf die Myosin-ATPase-Aktivität [Foster et al., 2000]. Die in den hier durchgeführten Experimenten beobachtete Caldesmon-Phosphorylierung ist daher höchstwahrscheinlich ohne funktionelle Relevanz. Des Weiteren ist bereits bekannt, daß auch hohe Phosphorylierungsgrade des Caldesmons nicht zwangsläufig einen Einfluß auf die Kontraktion des glatten Muskels haben. Nixon et al. [Nixon et al., 1995] konnten zeigen, daß rekombinante, konstitutiv aktive MAPK in Triton-gehäuteten Kaninchenarterien zu einer hohen Caldesmon-Phosphorylierung führt, ohne im relaxierten Muskel eine Kontraktion auszulösen oder unter Aktivierung die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität zu beeinflussen.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Phosphorylierungsexperimente lassen demnach darauf schließen, daß PAK1 Caldesmon im glatten Muskel nicht phosphoryliert, bzw. daß die potentielle Phosphorylierung für die Induktion eines physiologisch relevanten Effekts nicht ausreichend ist. Caldesmon kann somit als physiologisches Substrat für PAK1 im glatten Muskel mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

#### **4.5 Die Bedeutung von PAK1 für die Aktivität $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Proteinkinasen ist nicht eindeutig**

Einige Beobachtungen der vorliegenden Arbeit legten die Vermutung nahe, daß PAK1 in dem betrachteten experimentellen System nicht nur die MLCK, sondern möglicherweise auch andere an der Regulation der Kontraktion beteiligte Proteine beeinflusst.

Ein erster Hinweis auf einen von der MLCK unabhängigen Effekt der PAK1 ist die reduzierte r-MLC-Phosphorylierung, die unter relaxierten,  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen beobachtet wurde (s. Abb. IV-23, S. 127). Es ist bisher weitgehend ungeklärt, welche Proteinkinasen welchen Anteil an der r-MLC-Phosphorylierung im relaxierten Muskel haben. Die MLCK war aus diversen Gründen (s. I; 3.1 und 5) bisher allgemein als eher unbeteiligt betrachtet worden, doch wurde mit neueren Untersuchungen gezeigt, daß



MLCK-Inhibitoren die basale r-MLC-Phosphorylierung im intakten Muskel senken können [Weber et al., 2000].

Um die Bedeutung der MLCK für den beobachteten Effekt der reduzierten basalen r-MLC-Phosphorylierung in Anwesenheit von PAK1 zu klären, wurden entsprechende Experimente mit dem MLCK-Inhibitor Wortmannin durchgeführt. Wird die Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung in Anwesenheit von PAK1 durch Hemmung der MLCK vermittelt, sollte in Gegenwart von Wortmannin ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Die Meßdaten zeigen allerdings (s. Abb. IV-33, S. 143), daß Wortmannin offensichtlich keinen Effekt auf die r-MLC-Phosphorylierung im relaxierten Muskel hat. Eine Beteiligung der MLCK an der Katalyse der basalen r-MLC-Phosphorylierung kann durch diese Beobachtung dennoch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, da Enzyminhibitoren in der Regel nicht die benötigte hohe Spezifität besitzen. Weitere Experimente mit anderen inhibitorischen Substanzen, wie z.B. ML-9, und vor allem Untersuchungen mit inhibitorischen Peptiden, wie z.B. dem AV25, sind für eine umfassende Analyse dieser Fragestellung nötig.

Wird die MLCK als Enzym für die Katalyse der basalen r-MLC-Phosphorylierung ausgeschlossen, müssen andere Proteinkinasen diese Rolle übernehmen. Am wahrscheinlichsten ist die Beteiligung der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kinase ROK [Amano et al., 1996], ZIPK [Niïro und Ikebe, 2001] und ILK [Deng et al., 2001]. Für alle drei Proteinkinasen konnte eine Phosphorylierung der r-MLC unter Relaxationsbedingungen und die Induktion einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kontraktion bei vollständiger Inhibierung der MLCP gezeigt werden. Während die Immunreaktivität der ROK in mit Triton permeabilisierten Geweben drastisch verringert ist [Pfitzer et al., 2001], sind ILK und ZIPK auch in Triton-gehäutetem Gewebe noch vorhanden [unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe], und könnten daher an der Katalyse der basalen r-MLC-Phosphorylierung in dem hier verwendeten experimentellen System beteiligt sein.

Zwei Beobachtungen bei der Durchführung der Experimente dieser Arbeit lieferten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteinkinasen an der Regulation der glattmuskulären Kontraktion. Zum einen wurde trotz der angestrebten vollständigen Hemmung der MLCK mit Wortmannin im Kontrollexperiment zur Ermittlung der Rate der Kontraktion eine Kraftentwicklung registriert (s. Abb. IV-25; A, S. 130), die durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kinasen induziert werden könnte. Zum anderen konnte im gleichen Meßprotokoll des Öfteren eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Kontraktion in Rigorlösung unter vollständiger Inhibierung der MLCP beobachtet werden (s. Abb. IV-24, S. 128). Die

MLCK sollte unter diesen Bedingungen lediglich eine sehr basale Aktivität besitzen, die zur Induktion einer Kontraktion der gemessenen Rate nicht ausreichen sollte. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurden experimentelle Ansätze konzipiert, mit denen die Untersuchung einer potentiellen Modifizierung der Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Proteinkinasen durch PAK1 ermöglicht wurde (s. IV-B; 1.15.2).

Die Daten der Kontraktion unter Rigorbedingungen weisen im Vergleich zu den sonstigen Ergebnissen dieser Arbeit eine recht hohe Streuung auf (s. Abb. IV-35; B, S. 146), die wahrscheinlich durch Variationen im ATP-Gehalt der Fasern bei den einzelnen Messungen bedingt ist. Bei der Konzeption dieses Meßprotokolls war der Einsatz einer Kombination aus Hexokinase und Glukose als ATP-verbrauchendes System essentiell, um auswertbare Messungen zur ermöglichen. Schwankungen in der Enzymaktivität der Hexokinase können allerdings zu einem variablen ATP-Gehalt in den Präparaten führen, so daß den Proteinkinasen je nach experimentellem Ansatz mehr oder weniger ATP zur Katalyse der r-MLC-Phosphorylierung zur Verfügung steht. Daraus könnten unterschiedliche Phosphorylierungsgrade und damit unterschiedliche Kraftverläufe resultieren.

Während die Ergebnisse zur r-MLC-Phosphorylierung einen Effekt von PAK1 auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Proteinkinasen eher nahelegen, lassen die Kraftdaten diesbezüglich keine eindeutige Schlußfolgerung zu (s. Abb. IV-34; B, S. 144; Abb. IV-35; B, S. 146). Eventuell ist die Regulation der r-MLC-Phosphorylierung sensitiver, so daß unter bestimmten experimentellen Bedingungen bereits eine Zunahme der r-MLC-Phosphorylierung beobachtet werden kann, während zur Induktion einer Kontraktion erst ein gewisser Schwellenwert der r-MLC-Phosphorylierung überschritten werden muß. Kleine Effekte von PAK1 auf die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Proteinkinasen würden dann eher bei der Untersuchung der r-MLC-Phosphorylierung als bei der Analyse der Kraftentwicklung aufgelöst werden.

### **5 Involvierung von PAK1 in Signalkomplexen**

Die Mitglieder der PAK-Familie besitzen eine Vielzahl von zellulären Bindungspartnern und sind an verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden beteiligt (s. I; 6.4). Die Interaktionen der einzelnen Proteine sind dabei zumindest in einigen Fällen sehr stabil, so daß es zur Ausformung von Signalkomplexen kommt. So existieren Daten, die in

Fibroblasten des Hühnerembryos die Ausbildung eines stabilen Phosphotyrosinkomplexes auf ein onkogenes EGFR-Signal hin zeigen. Diesem Komplex gehören neben verschiedenen Adaptormolekülen, wie z.B. Shc und Grb2, auch phosphorylierte Formen von PAK, MLCK und Caldesmon an [McManus et al., 2000]. Dieser Komplex kann sowohl mit Shc- als auch mit PAK-Antikörpern aus den Zellen immunpräzipitiert werden, was die enge Assoziation der Proteine zeigt. Im glatten Muskel könnten ebensolche Komplexe existieren, die eine gezielte Isolierung einzelner Proteine mittels Immunpräzipitation deutlich erschweren würden und die auch die gemeinsame Isolierung von Caldesmon und MLCK bei den Immunpräzipitationen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden (s. Abb. IV-30, S. 138), erklären könnten.

Auch von anderen Arbeitsgruppen wird die Beteiligung von PAK-Proteinen an Signalkomplexen beschrieben. Nach Studien von Westphal [Westphal et al., 1999] können sowohl PAK1 als auch PAK3 zusammen mit Proteinphosphatasen vom Typ 2A intrazelluläre Komplexe bilden. Außerdem existieren nach Ergebnissen von Koh et al. [Koh et al., 2002] Daten über Proteinphosphatasen vom Typ 2C, die mit den PIX (*PAK-interacting exchange factor*) interagieren, und als POPX (*Partner of PIX*) bezeichnet werden. Den POPX ist über die Interaktion mit den PIX die gezielte Co-Lokalisierung mit den p21-aktivierten Proteinkinasen möglich. Solche Signalkomplexe zwischen Proteinkinase und Proteinphosphatase zeigen einen Mechanismus für eine eng gekoppelte und schnelle Regulation der Kinaseaktivität in der Zelle auf. Für die vorliegenden Untersuchungen könnte die Existenz solcher Signalkomplexe die fast notwendige Anwesenheit eines Phosphataseninhibitors wie der Okadainsäure erklären: Erst die Hemmung der an die PAK gebundenen Phosphatasen macht es möglich, die relativ langsamen und instabilen, durch die rekombinanten PAK-Proteine katalysierten Phosphorylierungsereignisse, und die dadurch ausgelösten Effekte auf die Kontraktion des glatten Muskels, sichtbar zu machen.

### **6 Der Effekt von PAK1 zeigt leichte Unterschiede an verschiedenen glattmuskulären Geweben**

Neben den bisher diskutierten Experimenten an der Triton-gehäuteten *Taenia caeci* des Meerschweinchens, wurde der Effekt von PAK1 auf die isometrische Kraft und die r-MLC-Phosphorylierung unter Gleichgewichtsbedingungen auch erstmals in Triton-

gehäuteter glatter Gefäßmuskulatur untersucht. Bisher wurden alle in der Literatur beschriebenen Untersuchungen mit PAK-Proteinen mit jeweils einer Isoform an nur einem, meist zellulären, nicht-muskulären System bzw. einem Gewebe untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bieten nun die Möglichkeit, den Effekt einer PAK-Isoform auf die Kontraktilität unterschiedlicher Gewebe in parallelen experimentellen Ansätzen zu analysieren.

Auch in der Muskulatur der *A. carotis communis* des Kaninchens und des Meerschweinchens konnte eine Hemmung der Kraftentwicklung und, soweit analysiert, eine Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung durch PAK1 beobachtet werden. Das Ausmaß dieser Effekte war jedoch je nach betrachtetem Gewebe variabel. In den mit Triton permeabilisierten Muskelringen der *A. carotis communis* des Kaninchens konnte unter submaximaler Stimulierung eine zwar signifikante, im Vergleich zur *Taenia caeci* des Meerschweinchens allerdings nur schwache Hemmung festgestellt werden (s. Abb. IV-37; A, S. 149). Während in den Fasern der *Taenia caeci* die submaximale Kraftentwicklung um 50 % gehemmt wird, nimmt diese Kraft in den Gefäßmuskelringen lediglich um knapp 30 % ab. Die Maximalkraft der Kontraktion, die in der *Taenia caeci* ebenfalls durch PAK1 gehemmt wird, ist in der *A. carotis communis* des Kaninchens von PAK1 unbeeinflusst. Die korrespondierenden Daten der r-MLC-Phosphorylierung korrelieren sehr gut mit diesen Ergebnissen. Die Reduktion der basalen r-MLC-Phosphorylierung unterbleibt vollständig, bei submaximaler Stimulierung ist der Grad der r-MLC-Phosphorylierung um ca. 20 % gesenkt (s. Abb. IV-37; B, S. 149). In der *Taenia caeci* wurde dagegen bei submaximaler Aktivierung des Gewebes auch für die r-MLC-Phosphorylierung eine Reduktion um ca. 50 % beobachtet.

Die Muskelringe der *A. carotis communis* des Meerschweinchens dagegen zeigen unter submaximaler Stimulierung eine mit der *Taenia caeci* vergleichbar inhibierte Kontraktion (s. Abb. IV-39, S. 152).

Der Grund für die beobachtete Diskrepanz der durch PAK1 induzierten Effekte kann in spezies- und/oder gewebespezifischen Unterschieden liegen. Es ist allgemein bekannt, daß die Bedeutung einzelner Regulationsmechanismen in phasischer (z.B. Ileum-muskulatur, Muskulatur der *Taenia caeci*) und tonischer (z.B. Gefäßmuskulatur) glatter Muskulatur variiert. Auch die Sensitivität der einzelnen Gewebe für Enzyminhibitoren ist unterschiedlich. So ist z.B. die Ileummuskulatur des Meerschweinchens wesentlich

sensitiver für den ROK-Inhibitor Y27632 als die Muskulatur kleiner Widerstandsgefäße des Meerschweinchens [Sonntag-Bensch, 2001].

Die bereits erwähnte Tatsache, daß die Phosphorylierung der MLCK durch die PAK in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  offensichtlich inhibiert ist [Goeckeler et al., 2000], kann auch für die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten gewebespezifischen Unterschiede der Auslöser sein. Die Konzentration des CaM variiert zwischen phasischen und tonischen Muskelpräparaten, wobei phasische glattmuskuläre Gewebe einen höheren Anteil an CaM besitzen [Szymanski et al., 2002]. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wäre also zu erwarten, daß die MLCK phasischer Gewebe verstärkt  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  gebunden hat und daher für eine Phosphorylierung durch PAK1 nicht so zugänglich wäre. Dies wäre der gegenteilige Befund der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse. Andererseits ist auch bekannt, daß CaM selbst bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in der Zelle nicht frei diffusiv, sondern durch vielfältige Bindungspartner in seiner Mobilität eingeschränkt ist [Luby-Phelps, 1985 und 1995]. Darüber hinaus zeigen neuere Daten, daß im gehäuteten Muskel ein Teil des Calmodulins fest an den Myofilamenten assoziiert ist [Wilson et al., 2002]. Im vergleichsweise sehr dicken Präparat der *A. carotis communis* des Kaninchens könnte somit wesentlich mehr Calmodulin zurückgehalten werden als in der *Taenia caeci*. Die Phosphorylierung der MLCK durch PAK1 würde in diesem Fall durch die Bindung des im Präparat verbliebenen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  zwar nicht komplett unterbunden, könnte jedoch eventuell stark behindert werden. Bei den Muskelringen der *A. carotis communis* des Meerschweinchens, bei denen es sich wiederum um ein sehr dünnes, nur wenige Zellschichten dickes Muskelpräparat handelt, erfolgt der Verlust des CaM dagegen wahrscheinlich wesentlich vollständiger. Dieses Präparat zeigt unter submaximaler Stimulierung dementsprechend auch wieder eine den Muskelfasern der *Taenia caeci* vergleichbare Inhibierung.

---

**VI Literaturverzeichnis**

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M.S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., Minden, A. (1998)** PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* 17: 6527-6540
- Adam, L.P., Haeberle, J.R., Hathaway, D.R. (1989)** Phosphorylation of caldesmon in arterial smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 264: 7698-7703
- Adam, L.P. und Hathaway, D.R. (1993)** Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-Caldesmon. *FEBS Lett.* 322: 56-60
- Ahnert-Hilger, G., Mach, W., Fohr, K.J., Gratzl, M. (1989)** Poration by  $\alpha$ -toxin and streptolysin O: an approach to analyze intracellular processes. *Methods Cell Biol.* 31: 63-90
- Ahner-Hilger, G., Stecher, B., Beyer, C., Gratzl, M. (1993)** Exocytotic membrane fusion as studied in toxin-permeabilized cells. *Methods Enzymol.* 221: 139-149
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994)** Molecular biology of the cell. 3<sup>rd</sup> edition, *Garland Publishing, Inc.*
- Albrecht, K., Schneider, A., Liebetrau, C., Rüegg, J.C., Pfitzer, G. (1997)** Exogenous caldesmon promotes relaxation of guinea-pig skinned taenia coli smooth muscles: inhibition of cooperative reattachment of latch bridges? *Pflugers Arch.* 434: 534-542
- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., 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
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1996)** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271: 20246-20249
- Avery, J., Jahn, R., Edwardson, J.M. (1999)** Reconstitution of regulated exocytosis in cell-free systems: a critical appraisal. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 777-807
- Babij, P. und Periasamy, M. (1989)** Myosin heavy chain isoform diversity in smooth muscle is produced by differential RNA processing. *J. Mol. Biol.* 210: 673-679
- Babij, P. (1993)** Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing of a visceral isoform of smooth muscle myosin heavy chain. *Nucleic Acid Res.* 21: 1467-1471
- Babu, G.J., Loukianov, E., Loukianova, T., Pyne, G.J., Huke, S., Osol, G., Low, R.B., Paul, R.J., Periasamy, M. (2001)** Loss of SM-B myosin affects muscle shortening velocity and maximal force development. *Nat. Cell Biol.* 3: 1025-1029
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Creasy, C.L., Chernoff, J., Cerione, R.A. (1995a)** Identification of a mouse p21<sup>Cdc42/Rac</sup> activated kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 22731-22737
- Bagrodia, S., Dérijard, B., Davis, R.J., Cerione, R.A. (1995b)** Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270: 27995-27998
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Jordon, K.A., Van Aelst, L., Cerione, R.A. (1998)** A novel regulator of p21-activated kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 23633-23636
- Bagrodia, S. und Cerione, R.A. (1999)** PAK to the future. *Trends Cell Biol.* 9: 350-355
- Baron, C.B., Pring, M., Coburn, R.F. (1989)** Inositol lipid turnover and compartmentation in canine trachealis smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 256: C375-383
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W. (1997)** Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323
- Bergelson, J.M. (1999)** Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem. Pharmacol.* 57: 975-979

- Berk**, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M., Tsuda, T. (1989) Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13: 305-314
- Bhat**, M., Toledo-Velasquez, D., Wang, L., Malanga, C.J., Ma, J.K., Rojanasakul, Y. (1993) Regulation of tight junction permeability by calcium mediators and cell cytoskeleton in rabbit tracheal epithelium. *Pharm. Res.* 10: 991-997
- Bialojan**, C., Rüegg, J.C., Takai, A. (1988) Effect of ocaidaic acid on isometric tension and myosin phosphorylation of chemically skinned guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 398: 81-95
- Binko**, J., Meachem, S., Majewski, H. (1999) Endothelium removal induces iNOS in rat aorta in organ culture, leading to tissue damage. *Am. J. Physiol.* 276: E125-134
- Birukov**, K.G., Schavocky, J.P., Shirinsky, V.P., Chibalina, M.V., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M. (1998) Organization of the genetic locus for chicken myosin light chain kinase is complex: multiple proteins are encoded and exhibit differential expression and localization. *J. Cell. Biochem.* 70: 402-413
- Blumenthal**, D.K., Takio, K., Edelman, A.M., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K.A., Krebs, E.G. (1985) Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3187-3191
- Bokoch**, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A., Knaus, U.G. (1996) Interaction of Nck adapter protein with p21-activated kinase 1 (PAK1). *J. Biol. Chem.* 271: 25746-25749
- Bokoch**, G.M., Reilly, A.M., Daniels, R.H., King, C.C., Olivera, A., Spiegel, S., Knaus, U.G. (1998) A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J. Biol. Chem.* 273: 8137-8144
- Bradford**, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254
- Bradley**, A.B. und Morgan, K.G. (1987) Alterations in cytoplasmic calcium by sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J. Physiol.* 385: 437-448
- Brenner**, B., Yu, L.C., Chalovich, J.M. (1991) Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness in skeletal muscle by caldesmon: Implications for the pathway to force generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5739-5743
- Brown**, A.M. und Birnbaumer, L. (1990) Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 197-213
- Brown**, S.L., Lundgren, C.H., Nordt, T., Fujii, S. (1994) Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 28: 1815-1820
- Brown**, J.L., Stowers, L., Baer, M., Trejo, J., Coughlin, S., Chant, J. (1996) Human Ste20 homologue hPak1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr. Biol.* 6: 598-605
- Burbelo**, P.D., Drechsel, D., Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270: 29071-29074
- Byzova**, T.V., Rabbani, R., D'Souza, S.E., Plow, E.F. (1998) Role of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in vascular biology. *Thromb. Haemost.* 80: 726-734
- Calara**, F., Ameli, S., Hultgardh-Nilsson, A., Cercek, B., Kupfer, J., Hedin, U., Forrester, J., Shah, P.K., Nilsson, J. (1996) Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells. Potential role of FGF and PDGF. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 187-193

- Cassidy**, P.S., Kerrick, W.G., Hoar, P.E., Malencik, D.A. (1981) Exogenous calmodulin increases  $Ca^{2+}$  sensitivity of isometric tension activation and myosin phosphorylation in skinned smooth muscle. *Pflugers Arch.* 392: 115-120
- Chalovich**, J.M. und Pfitzer, G. (1997) Structure and function of the thin filament proteins of smooth muscle. In: Cellular aspects of smooth muscle function. ed. Kao, C.Y. und Carsten, M.E. *Cambridge University Press*: 253-287
- Chamley-Campbell**, J., Campbell, G.R., Ross, R. (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiological Reviews* 59: 1-61
- Chamley-Campbell**, J.H. und Campbell, G.R. (1981) What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* 40: 347-357
- Chen**, Y.H., Chen, M.X., Alessi, D.R., Campbell, D.G., Shanahan, C., Cohen, P., Cohen, P.T. (1994) Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett.* 356: 51-55
- Chen**, W., Chen, S., Yap, S.F., Lim, L. (1996) The *Caenorhabditis elegans* p21-activated kinase (CePAK) colocalizes with CeRac1 and Cdc42Ce at hypodermal cell boundaries during embryo elongation. *J. Biol. Chem.* 271: 26362-26368
- Chew**, T.-L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M., Wysolmerski, R.B. (1998) Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase ( $\gamma$ -PAK). *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19: 839-854
- Childs**, T.J., Watson, M.H., Sanghera, J.S., Campbell, D.L., Pelech, S.L., Mak, A.S. (1992) Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by mitogen-activated protein (MAP) kinase and expression of MAP kinase in differentiated smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267: 22853-22859
- Chong**, C., Tan, L., Lim, L., Manser, E. (2001) The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J. Biol. Chem.* 276: 17347-17353
- Cohen**, C.J., Shieh, J.T.C., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.-T., Bergelson, J.M. (2001) The coxsackie and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15191-15196
- Conti**, M.A. und Adelstein, R.S. (1981) The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3',5' cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3178-3181
- Corjay**, M.H., Diamond, S.M., Schlingmann, K.L., Gibbs, S.K., Stoltenberg, J.K., Racanelli, A.L. (1999)  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , and osteopontin are coordinately upregulated at early time points in a rabbit model of neointima formation. *J. Cell. Biochem.* 75: 492-504
- Dan**, C., Nath, N., Liberto, M., Minden, A. (2002) PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Mol. Cell. Biol.* 22: 567-577
- Daniels**, R.H., Hall, P.S., Bokoch, G.M. (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J.* 17: 754-764
- Dechert**, M.A., Holder, J.M., Gerthoffer, W.T. (2001) p21-activated kinase 1 participates in tracheal smooth muscle cell migration by signaling to p38 MAPK. *Am. J. Physiol.* 281: C123-132
- de Lanerolle**, P., Adelstein, R.S., Feramisco, J.R., Burridge, K. (1981) Characterization of antibodies to smooth muscle myosin light chain kinase and their use in localizing myosin kinase in nonmuscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4738-4742
- de Lanerolle**, P., Nishikawa, M., Yost, D.A., Adelstein, R.S. (1984) Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle. *Science* 223: 1415-1417



- de Lanerolle**, P., Strauss, J.D., Felsen, R., Doerman, G.E., Paul, R.J. (1991) Effects of antibodies to myosin light chain kinase on contractility and myosin phosphorylation in chemically permeabilized smooth muscle. *Circ. Res.* 68: 457-465
- del Pozo**, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D., Schwartz, M.A. (2000) Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* 19: 2008-2014
- De Mey**, J.G., Uitendaal, M.P., Boonen, H.C., Vrijdag, M.J., Daemen, M.J., Struyker-Boudier, H.A. (1989) Acute and long-term effects of tissue culture on contractile reactivity in renal arteries of the rat. *Circ. Res.* 65: 1125-1135
- Deng**, J.T., Van Lierop, J.E., Sutherland, C., Walsh, M.P. (2001)  $Ca^{2+}$ -independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 16365-16373
- Dohadwala**, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., Berndt, N. (1994) Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6408-6412
- Earley**, J.J., Su, X., Moreland, R.S. (1998) Caldesmon inhibits active crossbridge in unstimulated vascular smooth muscle. An antisense oligodeoxynucleotide approach. *Circ. Res.* 83: 661-667
- Edelman**, A.M., Takio, K., Blumenthal, D.K., Hansen, R.S., Walsh, K.A., Titani, K., Krebs, E.G. (1985) Characterization of the calmodulin-binding and catalytic domains in skeletal muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 260: 11275-11285
- Edwards**, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N. (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell. Biol.* 1: 253-259
- Eto**, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K., Morita, F. (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J. Biochem.* 118: 1104-1107
- Fabiato**, A. und Fabiato, F. (1979) Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol.* 75: 463-505
- Fatigati**, V. und Murphy, R.A. (1984) Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J. Biol. Chem.* 259: 14383-14388
- Faure**, S., Vigneron, S., Doree, M., Morin, N. (1997) A member of the Ste20/PAK family of protein kinases is involved in both arrest of *Xenopus* oocytes at G2/prophase of the first meiotic cell cycle and in prevention of apoptosis. *EMBO J.* 16: 5550-5561
- Feng**, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J., Nakano, T. (1999a) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274: 37385-37390
- Feng**, J., Ito, M., Kureishi, Y., Ichikawa, K., Amano, M., Isaka, N., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T. (1999b) Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 274: 3744-3752
- Fingerle**, J. und Kraft, T. (1987) The induction of smooth muscle cell proliferation in vitro using an organ culture system. *Int. Angiol.* 6: 65-72
- Foster**, D.B., Shen, L.-H., Kelly, J., Thibault, P., Van Eyk, J.E., Mak, A.S. (2000) Phosphorylation of caldesmon by p21-activated kinase. Implications for the  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 275: 1959-1965
- Freimuth**, P., Springer, K., Berard, C., Hainfeld, J., Bewley, M., Flanagan, J. (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J. Virol.* 73: 1392-1398

- Frid**, M.G., Moiseeva, E.P., Stenmark, K.R. (1994) Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circ. Res.* 75: 669-681
- Frost**, J.A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M.A., Cobb, M.H. (1998) Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J. Biol. Chem.* 273: 28191-28198
- Gaballa**, M.A., Peppel, K., Lefkowitz, R.J., Aguirre, M., Dolber, P.C., Pennock, G.D., Koch, W.J., Goldman, S. (1998) Enhanced vasorelaxation by overexpression of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in large arteries. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 1037-1045
- Gailly**, P., Gong, M.C., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1997) Possible role of atypical protein kinase C activated by arachidonic acid in  $Ca^{2+}$  sensitization of rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 500: 95-109
- Galisteo**, M.L., Chernoff, J., Su, Y.-C., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J. (1996) The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J. Biol. Chem.* 271: 20997-21000
- Gallagher**, P.J., Garcia, J.G.N., Herring, B.P. (1995) Expression of a novel myosin light chain kinase in embryonic tissues and cultured cells. *J. Biol. Chem.* 270: 29090-29095
- Gallagher**, P.J., Herring, B.P., Stull, J.T. (1997) Myosin light chain kinases. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18: 1-16
- Ganitkevich**, V.Y. und Isenberg, G. (1991) Stimulation-induced potentiation of T-type  $Ca^{2+}$ -channel currents in myocytes from guinea-pig coronary artery. *J. Physiol.* 443: 703-725
- Gerthoffer**, W.T., Yamboliev, I.A., Shearer, M., Pohl, J., Haynes, R., Dang, S., Sato, K., Sellers, J.R. (1996) Activation of MAP kinase and phosphorylation of caldesmon in canine colonic smooth muscle. *J. Physiol.* 495: 597-609
- Goeckeler**, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.-L., Gallagher, P., Wysolmerski, R.B. (2000) Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J. Biol. Chem.* 275: 18366-18374
- Gomez**, M. und Swärd, K. (1997) Long-term regulation of contractility and calcium current in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 273: C1714-1720
- Gong**, M.C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1992a) Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J. Biol. Chem.* 267: 21492-21498
- Gong**, M.C., Cohen, P., Kitazawa, T., Ikebe, M., Masuo, M., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (1992b) Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 267: 14662-14668
- Gong**, M.C., Kinter, M.T., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1995) Arachidonic acid and diacylglycerol release associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 486: 113-122
- Gong**, M.C., Gorenne, I., Read, P., Jia, T., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (2001) Regulation by GDI of RhoA/Rho-kinase-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of smooth muscle myosin II. *Am. J. Physiol.* 281: C257-269
- Gopalakrishna**, R. und Anderson, W.B. (1982)  $Ca^{2+}$ -induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 830-836
- Gopalakrishna**, R. und Anderson, W.B. (1985) Monovalent cation-insensitive hydrophobic region on calmodulin facilitates the rapid isolation and quantitation of calmodulin free from other  $Ca^{2+}$ -dependent hydrophobic proteins. *J. Appl. Biochem.* 7: 311-322

- Goto**, H., Tanabe, K., Manser, E., Lim, L., Yasui, Y., Inagaki, M. (2002) Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells*. 7: 91-97
- Guerriero**, V. Jr., Rowley, D.R., Means, A.R. (1981) Production and characterization of an antibody to myosin light chain kinase and intracellular localization of the enzyme. *Cell* 27: 449-458
- Guzman**, R.J., Lemarchand, P., Crystal, R.G., Epstein, S.E., Finkel, T. (1993) Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima. *Circulation* 88: 2838-2848
- Haeberle**, J.R., Hathaway, D.R., Smith, C.L. (1992) Caldesmon content of mammalian smooth muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13: 81-9
- Hai**, C.-M. und Murphy, R.A. (1988) Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 254: C99-106
- Hai**, C.-M. und Murphy, R.A. (1989)  $Ca^{2+}$ , crossbridge phosphorylation, and contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 285-298
- Hanani**, M. und Freund, H.R. (2000) Interstitial cells of Cajal- their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol. Scand.* 170: 177-190
- Harden**, N., Lee, J., Loh, H.-Y., Ong, Y.-M., Tan, I., Leung, T., Manser, E., Lim, L. (1996) A *Drosophila* homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1896-1908
- Hartshorne**, D.J., Ito, M., Erdödi, F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19: 325-341
- Hasegawa**, Y., Ueno, H., Horie, K., Morita, F. (1988) Two isoforms of 17-kDa essential light chain of aorta media smooth muscle myosin. *J. Biochem. (Tokyo)* 103: 15-18
- Hashimoto**, Y. und Soderling, T.R. (1990) Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 278: 41-45
- Hashimoto**, S., Tsubouchi, A., Mazaki, Y., Sabe, H. (2001) Interaction of paxillin with p21-activated kinase (PAK). Association of paxillin alpha with the kinase-inactive and the Cdc42-activated forms of PAK3. *J. Biol. Chem.* 276: 6037-6045
- Himpens**, B., Matthijs, G., Somlyo, A.V., Butler, T.M., Somlyo, A.P. (1988) Cytoplasmic free calcium, myosin light chain phosphorylation, and force in phasic and tonic smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 92: 713-729
- Himpens**, B., Kitazawa, T., Somlyo, A.P. (1990) Agonist-dependent modulation of  $Ca^{2+}$ -sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Arch.* 417: 21-28
- Hirano**, K., Phan, B.C., Hartshorne, D.J. (1997) Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272: 3683-3688
- Hong**, S.S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D.T., Boulanger, P.A. (1997) Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I  $\alpha 2$  domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 16: 2294-2306
- Horowitz**, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G. (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews* 76: 967-1003
- Horwitz**, M.S. (1985) Adenoviruses and their replication. *Virology*, Raven Press, New York, ed. Fields, B.N. et al., Chapter 23: 433-476
- Horzinek**, M.C. (1985) Kompendium der allgemeinen Virologie. 2. Auflage, Verlag Paul Parey
- Howe**, A.K. und Juliano, R.L. (2000) Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat. Cell. Biol.* 2: 593-600

- Howe, A.K. (2001)** Cell adhesion regulates the interaction between Nck and p21-activated kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 14541-14544
- Ichikawa, K., Hirano, K., Ito, M., Tanaka, J., Nakano, T., Hartshorne, D.J. (1996a)** Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry* 35: 6313-6320
- Ichikawa, K., Ito, M., Hartshorne, D.J. (1996b)** Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 271: 4733-4740
- Iizuka, K., Ikebe, M., Somlyo, A.V. Somlyo, A.P. (1994)** Introduction of high molecular weight (IgG) proteins into receptor coupled, permeabilized smooth muscle. *Cell Calcium* 16: 431-445
- Ikebe, M. und Hartshorne, D.J. (1985)** Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 260: 10027-10031
- Ikebe, M., Hartshorne, D.J., 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
- Ikebe, M. und Reardon, S. (1990a)** Phosphorylation of smooth myosin light chain kinase by smooth muscle  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 8975-8978
- Ikebe, M. und Reardon, S. (1990b)** Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of the phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 265: 17607-17612
- Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., Bax, A. (1992)** Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256: 632-638
- Inagaki, N., Nishizawa, M., Ito, M., Fujioka, M., Nakano, T., Tsujino, S., Matsuzawa, K., Kimura, K., Kaibuchi, K., Inagaki, M. (1997)** Myosin binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase at the cell-cell adhesion sites in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 552-556
- Ingebritsen, T.S. und Cohen, P. (1983)** The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 132: 255-261
- Ishibashi, K., Evans, A., Shingu, T., Bian, K., Bukoski, R.D. (1995)** Differential expression and effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on myosin in arterial tree of rats. *Am. J. Physiol.* 269: C443-450
- Ishibashi, K. und Bukoski, R.D. (1997)** Myosin isoform expression and force generation in cultured resistance arteries. *Am. J. Physiol.* 272: C1144-1150
- Ito, M., Dabrowska, R., Guerriero, V. Jr., Hartshorne, D.J. (1989)** Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 264: 13971-13974
- Ito, M., Guerriero, V. Jr., Chen, X.M., Hartshorne, D.J. (1991)** Definition of the inhibitory domain of smooth muscle myosin light chain kinase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 30: 3498-3503
- Ito, M., Feng, J., Tsujino, S., Inagaki, N., Inagaki, M., Tanaka, J., Ichikawa, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T. (1997)** Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry* 36: 7607-7614
- Itoh, H., Shimomura, A., Okubo, S., Ichikawa, K., Ito, M., Konishi, T., Nakano, T. (1993)** Inhibition of myosin light chain phosphatase during  $Ca^{2+}$ -independent vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 265: C1319-1324
- Jaffer, Z.M. und Chernoff, J. (2002)** p21-activated kinases: three more join the PAK. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34: 713-717

- Janat**, M.F., Argraves, W.S., Liau, G. (1992) Regulation of vascular smooth muscle cell integrin expression by transforming growth factor  $\beta$ 1 and by platelet-derived growth factor-BB. *J. Cell. Physiol.* 151: 588-595
- Johansen**, J.W. und Ingebritsen, T.S. (1986) Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by pp60v-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 207-211
- Johnson**, J.D., Snyder, C., Walsh, M., Flynn, M. (1996a) Effects of myosin light chain kinase and peptides on  $\text{Ca}^{2+}$  exchange with the N- and C-terminal  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites of calmodulin. *J. Biol. Chem.* 271: 761-767
- Johnson**, D.F., Moorhead, G., Caudwell, F.B., Cohen, P., Chen, Y.H., Chen, M.X., Cohen, P.T. (1996b) Identification of protein-phosphatase-1-binding domains on the glycogen and myofibrillar targeting subunits. *Eur. J. Biochem.* 239: 317-325
- Johnson**, D., Cohen, P., Chen, M.X., Chen, Y.H., Cohen, P.T. (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
- Jones**, J.I., Prevetie, T., Gockerman, A., Clemmons, D.R. (1996) Ligand occupancy of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2482-2487
- Kamm**, K.E. und Stull, J.T. (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 593-620
- Kamm**, K.E. und Stull, J.T. (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J. Biol. Chem.* 276: 4527-4530
- Kaneko**, T., Amano, M., Maeda, A., Goto, H., Takahashi, K., Ito, M., Kaibuchi, K. (2000) Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 110-116
- Kanoh**, S., Ito, M., Niwa, E., Kawano, Y., Hartshorne, D.J. (1993) Actin-binding peptide from smooth muscle myosin light chain kinase. *Biochemistry* 32: 8902-8907
- Kappert**, K., Blaschke, F., Meehan, W.P., Kawano, H., Grill, M., Fleck, E., Hsueh, W.A., Law, R.E., Graf, K. (2001) Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res. Cardiol.* 96: 42-49
- Katsuyama**, H., Wang, C.-L. A., Morgan, K.G. (1992) Regulation of vascular smooth muscle tone by caldesmon. *J. Biol. Chem.* 267: 14555-14558
- Kelley**, C.A., Takahashi, M., Yu, J.H., Adelstein, R.S. (1993) An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J. Biol. Chem.* 268: 12848-12854
- Kemp**, B.E., Pearson, R.B., Guerriero, V. Jr., Bagchi, I.C., Means, A.R. (1987) The calmodulin binding domain of chicken smooth muscle myosin light chain kinase contains a pseudosubstrate sequence. *J. Biol. Chem.* 262: 2542-2548
- Kimura**, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248
- Kitazawa**, T., Takizawa, N., Ikebe, M., Eto, M. (1999) Reconstitution of protein kinase C-induced contractile  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization in Triton X-100-demembrated rabbit arterial smooth muscle. *J. Physiol.* 520: 139-152
- Kitazawa**, T., Eto, M., Woodsome, T.P., Brautigan, D.L. (2000) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J. Biol. Chem.* 275: 9897-9900

- Klemke**, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., Cheresh, D.A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* 137: 481-492
- Knaus**, U.G. und Bokoch, G.M. (1998) The p21<sup>Rac/Cdc 42</sup>-activated kinases (PAKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 857-862
- Kobayashi**, S., Kitazawa, T., Somlyo A.V., Somlyo A.P. (1989) Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle. Physiological role of inositol-1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J. Biol. Chem.* 264: 17997-18004
- Koh**, C.G., Tan, E.J., Manser, E., Lim, L. (2002) The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr. Biol.* 12: 317-321
- Kossmann**, T., Fürst, D., Small, J.V. (1987) Structural and biochemical analysis of skinned smooth muscle preparations. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 8: 135-44
- Koyama**, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T. (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett.* 475: 197-200
- Krueger**, J.K., Olah, G.A., Rokop, S.E., Zhi, G., Stull, J.T., Trewella, J. (1997) Structures of calmodulin and a functional myosin light chain kinase in the activated complex: a neutron scattering study. *Biochemistry* 36: 6017-6023
- Krueger**, J.K., Bishop, N.A., Blumenthal, D.K., Zhi, G., Beckingham, K., Stull, J.T., Trewella, J. (1998) Calmodulin binding to myosin light chain kinase begins at substoichiometric Ca<sup>2+</sup> concentrations: a small-angle scattering study of binding and conformational transitions. *Biochemistry* 37: 17810-17817
- Krymsky**, M.A., Kudryashov, D.S., Shirinsky, V.P., Lukas, T.J., Watterson, D.M., Vorotnikov, A.V. (2001) Phosphorylation of kinase-related protein (telokin) in tonic and phasic smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22: 425-437
- Kubota**, Y., Nomura, M., Kamm, K.E., Mumby, M.C., Stull, J.T. (1992) GTPγS-dependent regulation of smooth muscle contractile elements. *Am. J. Physiol.* 262: C405-410
- Kureishi**, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., Ito, M. (1997) Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272: 12257-12260
- Lederberg**, J. (1950) The β-D-galactosidase of *Escherichia coli* strain K-12. *J. Bacteriol.* 60: 381-392
- Lee**, S.W., Trapnell, B.C., Rade, J.J., Virmani, R., Dichek, D.A. (1993) In vivo adenoviral vector-mediated gene transfer into balloon-injured rat carotid arteries. *Circ. Res.* 73: 797-807
- Lee**, S.-F., Egelhoff, T.T., Mahasneh, A., Côté, G.P. (1996) Cloning and characterization of a *Dictyostelium* myosin I heavy chain kinase activated by Cdc42 and Rac. *J. Biol. Chem.* 271: 27044-27048
- Lee**, M.R., Li, L., Kitazawa, T. (1997a) Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272: 5063-5068
- Lee**, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T., Williams, L.T. (1997b) Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13642-13647
- Lee**, S.R., Ramos, S.M., Ko, A., Masiello, D., Swanson, K.D., Lu, M.L., Balk, S.P. (2002) AR and ER interaction with a p21-activated kinase (PAK6). *Mol. Endocrinol.* 16: 85-99

- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.C., Eck, M.J., Mayer, B.J., Harrison, S.C. (2000)** Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102: 387-397
- Leinweber, B.D., Leavis, P.C., Grabarek, Z., Wang, C.L., Morgan, K.G. (1999)** Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem. J.* 344: 117-123
- Leinweber, B., Parissenti, A.M., Gallant, C., Gangopadhyay S.S., Kirwan-Rhude, A., Leavis, P.C., Morgan, K.G. (2000)** Regulation of protein kinase C by the cytoskeletal protein calponin. *J. Biol. Chem.* 275: 40329-40336
- Leonhardt, H. (1985)** Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., Lim, L. (1995)** A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* 270: 29051-29054
- Li, L., Eto, M., Lee, M.R., Morita, F., Yazawa, M., Kitazawa, T. (1998a)** 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, E., Stupack, D., Klemke, R., Cheresch, D.A., Nemerow, G.R. (1998b)** Adenovirus endocytosis via  $\alpha_v$  integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J. Virol.* 72: 2055-2061
- Lim, L., Manser, E., Leung, T., Hall, C. (1996)** Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur. J. Biochem.* 242: 171-185
- Lin, P., Luby-Phelps, K., Stull, J.T. (1999)** Properties of filament-bound myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 5987-5994
- Lindqvist, A., Nilsson, B.-O., Hellstrand, P. (1997)** Inhibition of calcium entry preserves contractility of arterial smooth muscle in culture. *J. Vasc. Res.* 34: 103-108
- Lindqvist, A., Nordstrom, I., Malmqvist, U., Nordenfelt, P., Hellstrand, P. (1999)** Long-term effects of  $Ca^{2+}$  on structure and contractility of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 277: C64-73
- Lövdahl, C., Thyberg, J., Hultgårdh-Nilsson, A. (2000)** The synthetic metalloproteinase inhibitor batimastat suppresses injury-induced phosphorylation of MAP kinase ERK1/ERK2 and phenotypic modification of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *J. Vasc. Res.* 37: 345-354
- Lu, W., Katz, S., Gupta, R., Mayer, B.J. (1997)** Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr. Biol.* 7: 85-94
- Luby-Phelps, K., Lanni, F., Taylor, D.L. (1985)** Behavior of a fluorescent analogue of calmodulin in living 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 101: 1245-1256
- Luby-Phelps, K., Hori, M., Phelps, J.M., Won, D. (1995)**  $Ca^{2+}$ -regulated dynamic compartmentalization of calmodulin in living smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 21532-21538
- MacDonald, J.A., Borman, M.A., Murányi, A., Somlyo, A.V., Hartshorne, D.J., Haystead, T.A.J. (2001)** Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2419-2424
- MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T., Cohen, P., MacKintosh, C. (1995)** The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 371: 236-240
- Malmqvist, U. und Arner, A. (1991)** Correlation between isoform composition of the 17 kDa myosin light chain and maximal shortening velocity in smooth muscle. *Pflugers Arch.* 418: 523-530

- Malmqvist**, U., Trybus, K.M., Yagi, S., Carmichael, J., Fay, F.S. (1997) Slow cycling of unphosphorylated myosin is inhibited by calponin, thus keeping smooth muscle relaxed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7655-7660
- Manser**, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.-H., Lim, L. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367: 40-46
- Manser**, E., Chong, C., Zhao, Z.-S., Leung, T., Michael, G., Hall, C., Lim, L. (1995) Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* 270: 25070-25078
- Manser**, E., Huang, H.-Y., Loo, T.-H., Chen, X.-Q., Dong, J.-M., Leung, T., Lim, L. (1997) Expression of constitutively active  $\alpha$ -PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1129-1143
- Manser**, E., Loo, T.-H., Koh, C.-G., Zhao, Z.-S., Chen, X.-Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol. Cell* 1: 183-192
- Martin**, G.A., Bollag, G., McCormick, F., Abo, A. (1995) A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J.* 14: 1970-1978
- Martinez-Palomo**, A., Meza, I., Beaty, G., Cereijido, M. (1980) Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J. Cell. Biol.* 87: 736-745
- Matsui**, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15: 2208-2216
- McManus**, M.J., Boerner, J.L., Danielsen, A.J., Wang, Z., Matsumura, F., Mairle, N.J. (2000) An oncogenic epidermal growth factor receptor signals via a p21-activated kinase-caldesmon-myosin phosphotyrosine complex. *J. Biol. Chem.* 275: 35328-35334
- Meador**, W.E., Means, A.R., Quioco, F.A. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257: 1251-1255
- Menice**, C.B., Hulvershorn, J., Adam, L.P., Wang, C.-L.A., Morgan, K.G. (1997) Calponin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 272: 25157-25161
- Merkel**, L., Meisheri, K.D., Pfitzer, G. (1984) The variable relation between myosin light chain phosphorylation and actin-activated ATPase activity in chicken gizzard smooth muscle. Modulation by tropomyosin. *Eur. J. Biochem.* 138: 429-434
- Miller**, J.R., Silver, P.J., Stull, J.T. (1983) The role of myosin light chain kinase phosphorylation in  $\beta$ -adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 24: 235-242
- Miyamoto**, T., Sasaguri, Y., Sugama, K., Azakami, S., Morimatsu, M. (1994) Expression of the c-kit mRNA in human aortic endothelial cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 513-520
- Morgan**, K.G. und Gangopadhyay, S.S. (2001) Signal transduction in smooth muscle. Invited review: Cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J. Appl. Physiol.* 91: 953-962
- Morrison**, D.L., Sanghera, J.S., Stewart, J., Sutherland, C., Walsh, M.P., Pelech, S.L. (1996) Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin light chain kinase by MAP kinase and cyclin-dependent kinase-1. *Biochem. Cell Biol.* 74: 549-557



- Moses, S., Dreja, K., Lindqvist, A., Lövdahl, C., Hellstrand, P., Hultgårdh-Nilsson, A. (2001)** Smooth muscle cell response to mechanical injury involves intracellular calcium release and ERK1/ERK2 phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 269: 88-96
- Nagai, R., Kuroo, M., Babij, P., Periasamy, M. (1989)** Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J. Biol. Chem.* 264: 9734-9737
- Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H., Matsuda, Y., Hashimoto, Y., Nonomura, Y. (1992)** Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 267: 2157-2163
- Nelson, M.T., Standen, N.B., Brayden, J.E., Worley, J.F. (1988)** Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 336: 382-385
- Nemerow, G.R. (2000)** Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* 274: 1-4
- Nguyen, D.H.D., Catling, A.D., Webb, D.J., Sankovic, M., Walker, L.A., Somlyo, A.V., Weber, M.J., Gonias, S.L. (1999)** Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J. Cell Biol.* 146: 149-164
- Niiro, N. und 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
- Nishikawa, M., Shirakawa, S., Adelstein, R.S. (1985)** Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites. *J. Biol. Chem.* 260: 8978-8983
- Nishimura, J. und van Breemen, C. (1989)** Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 929-935
- Nixon, G.F., Iizuka, K., Haystead, C.M.M., Haystead, T.A.J., Somylo, A.P., Somlyo, A.V. (1995)** Phosphorylation of caldesmon by mitogen-activated protein kinase with no effect on  $Ca^{2+}$  sensitivity in rabbit smooth muscle. *J. Physiol.* 487: 283-289
- North, A.J., Gimona, M., Lando, Z., Small, J.V. (1994)** Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* 107: 445-455
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H. (1977)** High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142
- Ohtakara, K., Inada, H., Goto, H., Taki, W., Manser, E., Lim, L., Izawa, I., Inagaki, M. (2000)** p21-activated kinase PAK phosphorylates desmin at sites different from those for rho-associated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 712-716
- Ooboshi, H., Chu, Y., Rios, C.D., Faraci, F.M., Davidson, B.L., Heistad, D.D. (1997)** Altered vascular function after adenovirus-mediated overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.* 273: H265-270
- Otto, B., Steusloff, A., Just, I., Aktories, K., Pfitzer, G. (1996)** Role of Rho proteins in carbachol-induced contractions in intact and permeabilized guinea-pig intestinal smooth muscle. *J. Physiol.* 496: 317-329
- Ozaki, H., Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Karkai, H. (1998)** Long-term effects of growth-activating agents on smooth muscle contraction and endothelial function in organ-cultured rabbit mesenteric artery. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 112: 63-67
- Park, S. und Rasmussen H. (1986)** Carbachol-induced protein phosphorylation changes in bovine tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 261: 15734-15739
- Parker, C.A., Takahashi, K., Tao, T., Morgan, K.G. (1994)** Agonist-induced redistribution of calponin in contractile vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 267: C1262-1270
- Pato, M.D., Sutherland, C., Winder, S.J., Walsh, M.P. (1993)** Smooth-muscle caldesmon phosphatase is SMP-1, a type 2A protein phosphatase. *Biochem. J.* 293: 35-41

- Pavalko**, F.M., Adam, L.P., Wu, M.F., Walker, T.L., Gunst, S.J. (1995) Phosphorylation of dense-plaque proteins talin and paxillin during tracheal smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol.* 268: C563-571
- Pfitzer**, G., Merkel, L., Rüegg, J.C., Hofman, F. (1986) Cyclic GMP-dependent protein kinase relaxes skinned fibers from guinea pig taenia coli but not from chicken gizzard. *Pflugers Arch.* 407: 87-91
- Pfitzer**, G. und Boels, P.J. (1991) Differential skinning of smooth muscle: a new approach to excitation-contraction coupling. *Blood Vessels* 28: 262-267
- Pfitzer**, G., Zeugner, C., Troschka, M., Chalovich, J.M. (1993) Caldesmon and a 20-kDa actin-binding fragment of caldesmon inhibit tension development in skinned gizzard muscle fiber bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5904-5908
- Pfitzer**, G. (1996) Permeabilized smooth muscle. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. ed. Bárány, M., *Academic Press*, San Diego: 191-199
- Pfitzer**, G. und Arner, A. (1998) Involvement of small GTPases in the regulation of smooth muscle contraction. *Acta Physiol. Scand.* 164: 449-456
- Pfitzer**, G. (2001) Signal transduction in smooth muscle. Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 91: 497-503
- Pfitzer**, G., Sonntag-Bensch, D., Brkic-Koric, D. (2001) Thiophosphorylation-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of guinea-pig ileum contractility is not mediated by Rho-associated kinase. *J. Physiol.* 533: 651-664
- Pollard**, T.D. und Cooper, J.A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 987-1035
- Povstyan**, O.V., Gordienko, D.V., Harhun, M.I., Bolton, T.B. (2002) ICC-like cell type in the rabbit portal vein. *Biophys. J.* 82: 2031
- Pucovský**, V. und Bolton, T.B. (2002) Cells with non-myocyte phenotype in the media of guinea pig mesenteric arteries. *Biophys. J.* 82: 2030
- Rabilloud**, T., Carpentier, G., Tarroux, P. (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9: 288-291
- Roelvink**, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G.M., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I., Wickham, T.J. (1998) The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72: 7909-7915
- Rome**, J.J., Shayani, V., Flugelman, M.Y., Newman, K.D., Farb, A., Virmani, R., Dichek, D.A. (1994) Anatomic barriers influence the distribution of in vivo gene transfer into the arterial wall. Modeling with microscopic tracer particles and verification with a recombinant adenoviral vector. *Arterioscler. Thromb.* 14: 148-161
- Rovner**, A.S., Freyzon, Y., Trybus, K.M. (1997) An insert in the motor domain determines the functional properties of expressed smooth muscle myosin isoforms. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18: 103-110
- Rowe**, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84: 570-573
- Rudel**, T. und Bokoch, G.M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-1574
- Rüegg**, J.C. (1996) Smooth muscle. Comprehensive human physiology. *Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg*, Volume 1: 895-910
- Sadoshima**, J., Xu, Y., Slayter, H.S., Izumo, S. (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 977-984

- Salinovich**, O. und Montelaro, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156: 341-347
- Sambrook**, J. und Russel, D.W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Chapter 17, 3<sup>rd</sup> edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York
- Sanders**, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., de Lanerolle, P. (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283: 2083-2085
- Satoh**, S., Steusloff, A., Pfitzer, G. (1992) The loss of the Ca<sup>2+</sup> sensitizing effect of GTPγS in Triton-skinned smooth muscle is associated with the loss of small GTP-binding proteins. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13: 253
- Sauzeau**, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 275: 21722-21729
- Savineau**, J.P. and Marthan, R. (1994) Activation properties of chemically skinned fibres from human isolated bronchial smooth muscle. *J. Physiol.* 474: 433-438
- Schiedner**, G., Hertel, S., Kochanek, S. (2000) Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11: 2105-2116
- Schmitz**, U., Ishida, T., Ishida, M., Surapisitchat, J., Hasham, M.I., Pelech, S., Berk, B.C. (1998) Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. *Circ. Res.* 82: 1272-1278
- Schmitz**, U., Thömmes, K., Beier, I., Wagner, W., Sachinidis, A., Düsing, R., Vetter, H. (2001) Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J. Biol. Chem.* 276: 22003-22010
- Schmitz**, U., Thömmes, K., Beier, I., Vetter, H. (2002) Lysophosphatidic acid stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 687-691
- Schoenle**, E.J., Adams, L.D., Sammons, D.W. (1984) Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 12112-12116
- Sells**, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M., Chernoff, J. (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr. Biol.* 7: 202-210
- Sells**, M.A., Boyd, J.T., Chernoff, J. (1999) p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 145: 837-849
- Sells**, M.A., Pfaff, A., Chernoff, J. (2000) Temporal and spatial distribution of activated Pak1 in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 151: 1449-1458
- Shears II**, L.L., Kibbe, M.R., Murdock, A.D., Billiar, T.R., Lizonova, A., Kovesdi, I., Watkins, S.C., Tzeng, E. (1998) Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. *J. Am. Coll. Surg.* 187: 295-306
- Shibata**, S., Ishida, Y., Kitano, H., Ohizumi, Y., Habon, J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H. (1982) Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca<sup>2+</sup> deficiency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 135-143
- Shimizu**, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T. (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 269: 30407-30411

- Shin**, H.-M., Je, H.-D., Gallant, C., Tao, T.C., Hartshorne, D.J., Ito, M., Morgan, K.G. (2002) Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ. Res.* 90: 546-553
- Shirazi**, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., Haystead, T.A. (1994) Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 31598-31606
- Shirinsky**, V.P., Vorotnikov, A.V., Birukov, K.G., Nanaev, A.K., Collinge, M., Lukas, T.J., Sellers, J.R., Watterson, D.M. (1993) A kinase-related protein stabilizes unphosphorylated smooth muscle myosin minifilaments in the presence of ATP. *J. Biol. Chem.* 268: 16578-16583
- Shoemaker**, M.O., Lau, W., Shattuck, R.L., Kwiatkowski, A.P., Matrisian, P.E., Guerra-Santos, L., Wilson, E., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M. (1990) Use of DNA sequence and mutant analyses and antisense oligodesoxynucleotides to examine the molecular basis of nonmuscle myosin light chain kinase autoinhibition, calmodulin recognition, and activity. *J. Cell Biol.* 111: 1107-1125
- Silver**, P.J. und Stull, J.T. (1982) Quantitation of myosin light chain phosphorylation in small tissue samples. *J. Biol. Chem.* 257: 6137-6144
- Sjuve**, R., Arner, A., Li, Z., Mies, B., Paulin, D., Schmittner, M., Small, J.V. (1998) Mechanical alterations in smooth muscle from mice lacking desmin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19: 415-429
- Smillie**, L.B. (1996) Tropomyosin. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. ed. Bárány, M., *Academic Press*, San Diego
- Smith**, L., Su, X., Lin, P., Zhi, G., Stull, J.T. (1999) Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 29433-29438
- Smith**, L. und Stull, J.T. (2000) Myosin light chain kinase binding to actin filaments. *FEBS Lett.* 480: 298-300
- Sobue**, K., Muramoto, Y., Fujita, M., Kakiuchi, S. (1981) Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5652-5655
- Somlyo**, A.P. und Himpens, B. (1989) Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 3: 2266-2276
- Somlyo**, A.P. und Somlyo, A.V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236
- Sonntag-Bensch**, D. (2001) Regulation der Kontraktion in der glatten Muskulatur: Die Bedeutung der monomeren GTPase Ras und des Rho/Rho-Kinase Signalweges. *Dissertation der Universität Gießen*
- Sparrow**, M.P., Pfitzer, G., Gagelmann, M., Rüegg, J.C. (1984) Effect of calmodulin,  $Ca^{2+}$ , and cAMP protein kinase on skinned tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 246: C308-14
- Strauss**, J.D., de Lanerolle, P., Paul, R.J. (1992) Effects of myosin kinase inhibiting peptide on contractility and LC<sub>20</sub> phosphorylation in skinned smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 262: C1437-1445
- Stull**, J.T., Hsu, L.-C., Tansey, M.G., Kamm, K.E. (1990) Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 265: 16683-16690
- Stull**, J.T., Krueger, J.K., Kamm, K.E., Gao, Z.-H., Zhi, G., Padre, R. (1996) Myosin light chain kinase. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. ed. Bárány, M., *Academic Press*, San Diego: 119-130
- Sutherland**, C. und Walsh, M.P. (1989) Phosphorylation of caldesmon prevents its interaction with smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 264: 578-583

- Szpacenko, A., Wagner, J., Dabrowska, R., Rüegg, J.C. (1985)** Caldesmon-induced inhibition of ATPase activity of actomyosin and contraction of skinned fibres of chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett.* 192: 9-12
- Szymanski, P.T., Szymanska, G., Goyal, R.K. (2002)** Differences in calmodulin and calmodulin-binding proteins in phasic and tonic smooth muscles. *Am. J. Physiol.* 282: C94-104
- Takahashi, K., Hiwada, K., Kokubu, T. (1988)** Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T like protein. *Hypertension* 11: 620-626
- Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M., Rüegg, J.C. (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, A.V. (1989)** Protein phosphatase composition in smooth muscle of guinea-pig ileum studied with okadaic acid and inhibitor 2. *Biochem. J.* 262: 617-623
- Tanaka, M., Ikebe, R., Matsuura, M., Ikebe, M. (1995)** Pseudosubstrate sequence may not be critical for autoinhibition of smooth muscle myosin light chain kinase. *EMBO J.* 14: 2839-2846
- Tang, Y., Chen, Z., Ambrose, D., Liu, J., Gibbs, J.B., Chernoff, J., Field, J. (1997)** Kinase-deficient Pak1 mutants inhibit Ras transformation of Rat-1 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4454-4464
- Tansey, M.G., Word, R.A., Hidaka, H., Singer, H.A., Schworer, C.M., Kamm, K.E., Stull, J.T. (1992)** Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267: 12511-12516
- Tansey, M.G., Luby-Phelps, K., Kamm, K.E., Stull, J.T. (1994)** Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269: 9912-9920
- Teo, M., Manser, E., Lim, L. (1995)** Identification and molecular cloning of a p21<sup>cdc42/rac1</sup>-activated serine/threonine kinase that is rapidly activated by thrombin in platelets. *J. Biol. Chem.* 270: 26690-26697
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. (1999)** Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*
- Tokui, T., Ando, S., Ikebe, M. (1995)** Autophosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase at its regulatory domain. *Biochemistry* 34: 5173-5179
- Trinkle-Mulcahy, L., Ichikawa, K., Hartshorne, D.J., Siegman, M.J., Butler, T.M. (1995)** Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with a decreased activity of myosin light chain phosphatase in  $\alpha$ -toxin-permeabilized smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 270: 18191-18194
- Tu, H. und Wigler, M. (1999)** Genetic evidence for Pak1 autoinhibition and its release by Cdc42. *Mol. Cell. Biol.* 19: 602-611
- Tuazon, P.T., Spanos, W.C., Gump, E.L., Monnig, C.A., Traugh, J.A. (1997)** Determinants for substrate phosphorylation by p21-activated protein kinase ( $\gamma$ -PAK). *Biochemistry* 36: 16059-16064
- Vadlamudi, R.K., Adam, L., Wang, R.-A., Mandal, M., Nguyen, D., Sahin, A., Chernoff, J., Hung, M.-C., Kumar, R. (2000)** Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 275: 36238-36244
- Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1978)** At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126: 783-802

- van der Flier**, A. und Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305: 285-298
- Van Eyk**, J.E., Arrell, D.K., Foster, D.B., Strauss, J.D., Heinonen, T.Y.K., Furmaniak-Kazmierczak, E., Côté, G.P., Mak, A.S. (1998) Different molecular mechanisms for Rho family GTPases-dependent,  $\text{Ca}^{2+}$ -independent contraction of smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 273: 23433-23439
- Vorotnikov**, A.V., Gusev, N.B., Hua, S., Collins, J.H., Redwood, C.S., Marston, S.B. (1994) Phosphorylation of aorta caldesmon by endogenous proteolytic fragments of protein kinase C. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15: 37-48
- Vorotnikov**, A.V. (1997) Kinase-related protein: a smooth muscle myosin-binding protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 727-730
- Walker**, J.W., Somlyo, A.V., Goldman, Y.E., Somlyo, A.P., Trentham, D.R. (1987) Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 327: 249-252
- Walsh**, M.P., Bridenbaugh, R., Hartshorne, D.J., Kerrick, W.G. (1982) Phosphorylation-dependent activated tension in skinned gizzard muscle fibers in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* 257: 5987-5990
- Walter**, B.N., Huang, Z., Jakobi, R., Tuazon, P.T., Alnemri, E.S., Litwack, G., Traugh, J.A. (1998) Cleavage and activation of p21-activated protein kinase  $\gamma$ -PAK by CPP32 (caspase 3). Effects of autophosphorylation on activity. *J. Biol. Chem.* 273: 28733-28739
- Walters**, R.W., Grunst, T., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Welsh, M.J., Zabner, J. (1999) Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.* 274: 10219-10226
- Wang**, S., Wright, G., Geng, W., Wright, G.L. (1997) Retinol influences contractile function and exerts an anti-proliferative effect on vascular smooth muscle cells through an endothelium-dependent mechanism. *Pflugers Arch.* 434: 669-677
- Watterson**, D.M., Collinge, M., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Birukov, K.G., Stepanova, O.V., Shirinsky, V.P. (1995) Multiple gene products are produced from a novel protein kinase transcription region. *FEBS Lett.* 373: 217-220
- Weber**, L.P., Van Lierop, J.E., Walsh, M.P. (1999)  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J. Physiol.* 516: 805-824
- Weber**, L.P., Seto, M., Sasaki, Y., Sward, K., Walsh, M.P. (2000) The involvement of protein kinase C in myosin phosphorylation and force development in rat tail arterial smooth muscle. *Biochem. J.* 352: 573-582
- Westphal**, R.S., Coffee, R.L., Marotta, A., Pelech, S.L., Wadzinski, B.E. (1999) Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A. *J. Biol. Chem.* 274: 687-692
- White**, S., Martin, A.F., Periasamy, M. (1993) Identification of a novel smooth muscle myosin heavy chain cDNA: isoform diversity in the S1 head region. *Am. J. Physiol.* 264: C1252-1258
- Wilson**, D.P., Sutherland, C., Walsh, M.P. (2002)  $\text{Ca}^{2+}$  activation of smooth muscle contraction. Evidence for the involvement of calmodulin that is bound to the triton-insoluble fraction even in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* 277: 2186-2192
- Winder**, S.J., und Walsh, M.P. (1990) Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265: 10148-10155
- Winnacker**, E.-L. (1990) Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. *VCH-Verlagsgesellschaft*. 3. Auflage: Kapitel 7

- Wright**, G., Wang, S., Bailey, G., Reichenbecher, V., Wright, G.L. (1996) Effect of retinoic acid on contractile competence of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 270: H1363-1370
- Wu**, X., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 658-663
- Wu**, X., Haystead, T.A.J., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1998) Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 11362-11369
- Xue**, H., McCarron, D.A., Bukoski, R.D. (1991) 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> attenuates the loss of resistance artery contractile function associated with incubation in culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 11-17
- Yablonski**, D., Kane, L.P., Qian, D., Weiss, A. (1998) A Nck-Pak1 signaling module is required for T-cell receptor-mediated activation of NFAT, but not of JNK. *EMBO J.* 17: 5647-5657
- Yamashiro**, S., Yamakita, Y., Ishikawa, R., Matsumura, F. (1990) Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature* 344: 675-678
- Yamashiro**, S., Yamakita, Y., Hosoya, H., Matsumura, F. (1991) Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. *Nature* 349: 169-172
- Yamawaki**, H., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Nakamura, S., Nakayama, H., Doi, K., Karaki, H. (2000) Morphological and functional changes of rabbit mesenteric artery cultured with fetal bovine serum. *Life Sci.* 67: 807-820
- Yang**, F., Li, X., Sharma, M., Zarnegar, M., Lim, B., Sun, Z. (2001) Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6. *J. Biol. Chem.* 276: 15345-15353
- Yao**, A. und Wang, D.H. (1995) Heterogeneity of adenovirus-mediated gene transfer in cultured thoracic aorta and renal artery of rats. *Hypertension* 26: 1046-1050
- Yu**, M.-F., Ewaskiewicz, J.I., Adda, S., Bailey, K., Harris, V., Sosnoski, D., Tomasic, M., Wilson, J., Kotlikoff, M. (1996) Gene transfer by adenovirus in smooth muscle cells. *Respir. Physiol.* 105: 155-162
- Zeidan**, A., Nordstrom, I., Dreja, K., Malmqvist, U., Hellstrand, P. (2000) Stretch-dependent modulation of contractility and growth in smooth muscle of rat portal vein. *Circ. Res.* 87: 228-234
- Zeng**, Q., Lagunoff, D., Masaracchia, R., Goeckeler, Z., Côté, G., Wysolmerski, R. (2000) Endothelial cell retraction is induced by PAK2 monophosphorylation of myosin II. *J. Cell. Sci.* 113: 471-482
- Zhang**, S., Han, J., Sells, M.A., Chernoff, J., Knaus, U.G., Ulevitch, R.J., Bokoch, G.M. (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* 270: 23934-23936
- Zhao**, Z.-S., Manser, E., Chen, X.-Q., Chong, C., Leung, T., Lim, L. (1998) A conserved negative regulatory region in  $\alpha$ PAK: Inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2153-2163
- Zhao**, Z.-S., Manser, E., Lim, L. (2000) Interaction between PAK and Nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3906-3917
- Zhou**, H., Zeng, G., Zhou, A., Tang, J., Huang, Q., Chen, G., Peng, T., Hu, B. (1995) Adenovirus mediated gene transfer of vascular smooth muscle cells and endothelial cells in vitro. *Chin. Med. J.* 108: 493-496

### VII Zusammenfassung

Um die Bedeutung der p21-aktivierten Proteinkinase 1 für die glattmuskuläre Kontraktion zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit neben adenoviralen Infektionen auch Experimente mit permeabilisierten Muskelpräparaten durchgeführt.

An permeabilisierten glatten Muskelgeweben konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Fusionsprotein der p21-aktivierten Proteinkinase 1, GST-PAK1<sup>T422E</sup>, eine spezifische und reversible Ca<sup>2+</sup>-Desensitivierung der glattmuskulären Kontraktion bewirkt. Bei der Aufklärung des Wirkmechanismus und der Substratspezifität konnte gezeigt werden, daß PAK1 über eine inhibitorische Phosphorylierung der MLCK die Aktivität dieses Enzyms hemmt und somit eine Reduktion der r-MLC-Phosphorylierung bei konstanter Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induziert. Die beiden anderen direkt am kontraktilen Apparat für Mitglieder der PAK-Familie identifizierten Substrate r-MLC und Caldesmon konnten im glatten Muskel als physiologisch relevante Substrate von PAK1 weitgehend ausgeschlossen werden. Ebenso konnte in ersten Untersuchungen zur Aktivität der MLCP kein regulativer Einfluß von PAK1 auf die Phosphatase festgestellt werden. Bei der parallelen Analyse der PAK1-Effekte in intestinalen und vaskulären glatten Muskelgeweben konnten leichte Unterschiede in der Ausprägung der Hemmwirkung der PAK1 festgestellt werden. Die eindeutige Zuordnung dieser Beobachtung zu gewebe- oder speziesspezifischen Ursachen erfordert weitergehende Studien.

In ersten Arbeiten zur adenoviral vermittelten Überexpression von Signalproteinen in intakten Gefäßmuskelpräparaten konnten experimentelle Grundbedingungen optimiert und etabliert werden, die eine sehr gute Kontraktilitätserhaltung liefern und so reproduzierbare Kontraktionsstudien an funktionell intaktem, adenoviral infiziertem Gewebe ermöglichen. Die spezifische Infektion glatter Muskelzellen in der Gefäßwand konnte auch durch die Anwendung verschiedener potentiell infektionsverbessernder Maßnahmen nicht erreicht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das verwendete Virus eine Subpopulation glatter Muskelzellen im Darmgewebe infiziert. Außerdem konnte weitgehend ausgeschlossen werden, daß die Penetration des Virus in die Gefäßwand einen limitierenden Faktor bei der Infektion der glatten Muskelzellen darstellt. In den Gefäßen wurden an der Grenzfläche der Media und der Adventitia lokalisierte Zellen bislang unbekanntem Typs entdeckt, die hoch spezifisch infiziert werden konnten. Erste vorsichtige Überlegungen zur Identität dieser Zellen gehen in Richtung nervöser oder den Schrittmacherzellen im Darm verwandten Zellen.



## VIII Summary

In this thesis adenoviral infection of smooth muscle tissue as well as experiments with permeabilised smooth muscle tissue were carried out to analyse the role of p21-activated kinase 1 in the regulation of smooth muscle contraction.

In permeabilised smooth muscle tissue it was shown that the recombinant fusion protein GST-PAK1<sup>T422E</sup> leads to specific and reversible Ca<sup>2+</sup> desensitization of smooth muscle contraction. Analysis of the desensitization mechanism and the substrate specificity demonstrated that PAK1 phosphorylates MLCK. This reaction thus inhibits MLCK activity and induces reduction of r-MLC phosphorylation at a constant Ca<sup>2+</sup> concentration. The other two substrates for members of the PAK family so far identified at the contractile apparatus, r-MLC and caldesmon, can be excluded as physiologically relevant targets of PAK1 in smooth muscle tissue. Furthermore, PAK1 appears to have no influence on MLCP activity. Parallel studies on the effects of PAK1 on tissues of different origin show that there are slight differences in the inhibitory action of PAK1 in intestinal and vascular smooth muscle tissue. Whether this phenomenon is due to species-specific or tissue-specific effects remains to be analysed in greater detail.

Studies were carried out in which the adenoviral mediated overexpression of proteins in vascular smooth muscle tissue was analysed. Experimental conditions were optimised to ensure satisfactory preservation of force, thus allowing reproducible characterisation of the contractile properties of infected, and functionally intact smooth muscle tissue. Specific infection of smooth muscle cells in the media of the vessel wall could not be achieved, although different methods were tested that potentially increase infection efficiency. This was most likely not due to limited penetration of the virus into the vessel wall. Furthermore, it was shown that the virus used in these experiments infects a subpopulation of smooth muscle cells in small intestine. In the arteries, at the interface between the media to the adventitia, distinct cells of an as yet unknown type were found to be specifically infected. First attempts to identify these cells point to nerve cells or cells related to the pacemaker cells of the intestinal tract.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. G. Pfitzer für die interessante wissenschaftliche Aufgabenstellung, die vertrauensvolle und freundliche Betreuung sowie die anregenden Diskussionen, nicht nur auf fachlicher Ebene. Ohne ihre engagierte und kompetente Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft, als Zweitgutachter zu wirken.

Herrn Prof. Dr. P. de Lanerolle, University of Illinois, Chicago, möchte ich für die freundliche mehrwöchige Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe danken. Neben seiner fachlichen Unterstützung, die sich auch über die räumliche Distanz hinweg hilfreich fortgesetzt hat, haben er, seine Familie und insbesondere auch seine Mitarbeiter mir einen nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht lohnenden Aufenthalt ermöglicht.

Herrn Dr. E. Manser, Glaxo-IMCB-Group, University of Singapore, danke ich für die großzügige Bereitstellung des gereinigten Fusionsproteins GST-PAK1.

Herrn Priv.-Doz. Dr. S. Kochanek und Frau Dr. G. Schiedner möchte ich für die zur Verfügung gestellten LacZ-Adenoviren danken.

Herrn Prof. Dr. W. F. Neiss, Institut für Anatomie der Universität zu Köln, danke ich für die Kooperation bei den Experimenten zur adenoviralen Infektion glatter Muskelzellen im Gewebe. Er hatte stets Zeit, kenntnisreiche Einführungen in die enzymhistochemischen Nachweismethoden zu geben, und hat außerdem mit wesentlichen Impulsen zur Interpretation der Untersuchungsergebnisse beigetragen. Mein Dank gilt außerdem Fr. I. Rohrman für die hervorragende histologische Aufarbeitung der zahlreichen Gewebeproben jeder Größe und Form.

Herrn Dr. W. Lehmann, Boston-University, danke ich für die Bereitstellung des spezifischen Antikörpers gegen Caldesmon.

Allen meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen am Institut möchte ich für ein freundliches, kooperatives und kommunikatives Arbeitsklima danken.

Frau Dr. D. Sonntag-Bensch gilt mein Dank für die Einführung in die experimentellen Grundmethoden der glattmuskulären Kontraktionsforschung, sowie für viele gemeinsame arbeitsreiche, aber auch kurzweilige Nachmittage im Meßraum. Frau R. Kemkes möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der 2D-Gelelektrophorese zur Analyse der r-MLC-Phosphorylierung, sowie für das Kopieren etlicher Paper in der Bibliothek danken, Frau D. Metzler für die stets prompten Hilfestellungen bei Grafik- und „Bastel“-problemen, bei denen sie Dank ihrer Kreativität und Kompetenz eine große Stütze war. Herrn Dr. P. Scherer danke ich für die tatkräftige Erhellung diverser Computermysterien. Frau M. Krüger möchte ich für die zahlreichen Gespräche über fachliche Probleme, aber auch über „Gott und die Welt“ und für ihren freundschaftlichen Beistand auch außerhalb des Instituts danken.

Frau L. Glahe danke ich für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft, den Mitarbeitern des Tierstalls für die hervorragende Pflege und Zucht der Tiere, sowie der Elektronik- und Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Vegetative Physiologie sei für die freundliche, kompetente und unbürokratische Hilfe bei verschiedensten Problemen gedankt.

Für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit möchte ich Frau M. Krüger und Frau Dr. M. Schroeter danken.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die mir immer durch verschiedenste Unterstützung die Verwirklichung meiner Ziele ermöglichten und nicht zuletzt meinem Ehemann Marcus, der mir immer eine unermeßliche Hilfe und Stütze war und ist.

## **Erklärung**

„Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. G. Pfitzer betreut worden.“

Teilpublikation in Vorbereitung:

„Inhibition of smooth muscle contraction and myosin light chain phosphorylation by p21-activated kinase PAK1.“