

**Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Regensburg**

**Funktionelle Charakterisierung des cGMP-abhängigen
Proteinkinase Substrates IRAG und des potentiellen „second
messenger“ zyklisches Cytidin-3',5'-monophosphat im glatten
Muskel**



DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT CHEMIE UND PHARMAZIE
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**vorgelegt von
Matthias Desch
aus Kirchham
im Jahr 2010**

Dissertation eingereicht:

April 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. Jörg Heilmann

1. Gutachter (1. Prüfer):

Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

2. Gutachter (2. Prüfer):

Herr Prof. Dr. Frank Schweda

3. Prüfer:

Herr Prof. Dr. Achim Göpferich

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
A. Einleitung	1
A.1. Calciumregulation und Glattmuskelkontraktion	1
A.2. Der NO/cGMP/cGKI Signalweg	3
A.3. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen	5
A.4. cGMP-vermittelte Glattmuskelrelaxation	7
A.5. Das IP ₃ RI- assoziierte cGKI-Substrat (IRAG)	9
A.6. Sepsis und die NO/cGMP-Signalkaskade	10
A.7. Zyklische Nukleotide als „second messenger“	12
A.8. Ziele dieser Arbeit	13
B. Material und Methoden	15
B.1. Materialien	15
B.1.1. Geräte	15
B.1.2. Verbrauchsmaterialien und Kits	17
B.1.3. Chemikalien und Arzneistoffe	18
B.2. Versuchstiere	20
B.3. Erstellung einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve	21
B.4. Kraftmessung am glatten Muskel	21
B.4.1. Isolierung von thorakaler Aorta, Colon und Jejunum	21
B.4.2. Versuchsdurchführung mit Colon / Jejunum	22
B.4.3. Versuchsdurchführung mit <i>Aorta thoracalis</i>	22
B.4.4. Versuchsauswertung	24
B.5. Invasive, radiotelemetrische Blutdruckbestimmung	24
B.6. Retrograde Perfusion von narkotisierten Tieren	26
B.7. Organismen und Plasmide	26
B.8. Anzucht und Stammhaltung	27
B.8.1. Escherichia coli	27
B.8.1.1. Nährmedium	27

B.8.1.2.	Antibiotika (als Nährmediumzusatz).....	28
B.8.1.3.	Kultivierung und Stammhaltung	28
B.8.1.4.	Transformation von <i>E.coli</i>	28
B.8.1.5.	Herstellung von elektrokompenten Zellen (Hanahan, 1983).....	28
B.8.1.6.	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen (Hanahan, 1983).....	29
B.8.1.7.	Durchführung der Elektroporation	29
B.8.1.8.	Durchführung der Hitzeschock-Transformation	30
B.8.2.	Sf9-Zellen.....	30
B.8.2.1.	Nährmedium und Mediumzusätze.....	30
B.8.2.2.	Kultivierung und Stammhaltung	30
B.8.2.3.	Zählen von Insektenzellen	31
B.9.	Molekularbiologische Methoden.....	31
B.9.1.	Isolierung von Total-RNA aus Mausgeweben	31
B.9.2.	Gewinnung von Plasmid-DNA.....	31
B.9.3.	Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	32
B.9.4.	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten	33
B.9.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
B.9.6.	Enzymatische Modifikation von DNA	33
B.9.6.1.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	33
B.9.6.2.	Dephosphorylierung linearer DNA durch Alkalische Phosphatase	34
B.9.6.3.	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	34
B.9.7.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
B.9.7.1.	PCR-Primer	35
B.9.7.2.	Reagenzien und Polymerasen	35
B.9.7.3.	Standard-PCR (für DNA-Fragmente bis 1 kB).....	36
B.9.7.4.	Subklonierung von PCR-Amplifikaten	36
B.9.8.	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	36
B.9.9.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real-time-PCR)	37
B.9.10.	Sequenzierung von DNA.....	38
B.9.11.	Generierung von rekombinanten Baculoviren	39
B.10.	Proteinbiochemische Methoden	41
B.10.1.	Proteingewinnung aus Mausgeweben	41
B.10.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	42
B.10.3.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	42
B.10.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
B.10.5.	Coomassie-Färbung.....	44

B.10.6. Westernblot	44
B.10.7. Identifizierung rekombinanter Viren auf Proteinebene	45
B.10.8. Expression von cG-Kinasen in Sf9-Zellen	45
B.10.8.1. Ernte und Aufarbeitung von Sf9-Zellkulturen	46
B.10.8.2. Schnellnachweis von löslichen cG-Kinasen	47
B.10.8.3. Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Proteins	47
B.10.9. Aufreinigung von löslichen cG-Kinasen	47
B.10.9.1. Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	47
B.10.9.2. Affinitätschromatographie mit 8-AEA-cAMP-Agarose	48
B.10.10. Konzentration von Proteinen durch Ultrafiltration	49
B.10.11. Phosphotransferase-Assay	50
B.10.11.1. Standard-Test zum Nachweis von cG-Kinase	51
B.10.11.2. Bestimmung der Aktivierungskonstanten für cNMP (K_a -Wert)	53
B.10.11.3. Aktivitätsbestimmung endogener cG-Kinasen (Aortenlysat)	53
B.11. Bestimmung von cGMP in thorakaler Aorta	53
B.11.1. EIA-Analyse von cGMP im Gewebehomogenat	55
B.11.2. HPLC-Analyse von cGMP im Gewebehomogenat	55
B.12. Statistik	56
C. Ergebnisse	57
C.1. Phänotyp von IRAG defizienten Mäusen	57
C.2. Medianes Überleben von IRAG-KO Mäusen	59
C.3. Expressionsanalyse von Proteinen im Gewebe	59
C.4. Effekte von cGKI-Aktivatoren auf glatte Muskulatur	61
C.4.1. Wirkung von 8-Br-cGMP auf die thorakale Aorta	61
C.4.2. Wirkung von 8-Br-cGMP auf Colon und Jejunum	62
C.4.3. Effekte von DEA-NO auf Aorta und Colon	65
C.4.4. Effekte von endogenem NO auf die thorakale Aorta	67
C.4.5. Aktivierung von pGC in der thorakalen Aorta	68
C.4.6. K85-Depolarisation von Aortengewebe	69
C.5. Bestimmung von cGMP in der thorakalen Aorta	71
C.6. Radiotelemetrische Blutdruckbestimmung	73
C.6.1. Basale Parameter von wachen und schlafenden Tieren	73
C.6.2. Effekte von $[cGMP]_i$ -erhöhenden Substanzen auf den MAP	75
C.7. Effekte einer schweren, LPS-induzierten Sepsis	78

C.7.1. Veränderung des MAP bei WT- und IRAG-KO-Tieren.....	78
C.7.2. mRNA-Level diverser Gene der cGKI-Signalkaskade.....	79
C.8. Analyse der funktionellen Rolle von cCMP	82
C.8.1. Expression und Reinigung von cGKI	82
C.8.1.1. Klonierung eines C-terminalen (His) ₆ -Tags an cGKI-cDNA	82
C.8.1.2. Expression und Reinigung von cGKI _{(His)6} in Sf9-Zellen	83
C.8.1.3. Aktivitätsbestimmung von aufgereinigter cGKI _{(His)6}	85
C.8.1.4. Expression, Reinigung und Charakterisierung von cGKI _{wt}	87
C.8.2. Analyse von cCMP im <i>in vitro</i> Phosphotransferase-Assay	90
C.8.3. Effekte von cCMP auf den vaskulären glatten Muskel	93
C.8.3.1. Effekte von Butyraten auf den Tonus der glatten Muskulatur	95
C.8.3.2. Potentielle Hemmung von Phosphodiesterasen durch cCMP	96
C.8.3.3. Aktivierung endogener, glattemuskulärer cGKI durch cCMP.....	98
C.8.3.4. Potentielle Sensibilisierung von cGKI durch cCMP	101
D. Diskussion	103
D.1. Physiologische Rolle von IRAG im glatten Muskel.....	103
D.2. Der Einfluss von IRAG auf die Blutdruckregulation	110
D.3. Fungiert cCMP als „second messenger“?.....	113
E. Zusammenfassung.....	119
F. Literaturverzeichnis	121
F.1. Zitierte wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	121
F.2. Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen	135
F.2.1. Abstracts	135
F.2.2. Originalarbeiten	135
G. Anhang.....	136
G.1. Verwendete Antikörper.....	136
G.2. Verwendete Restriktionsenzyme	137
G.3. Verwendete Oligonukleotide	138
G.4. Danksagung	139
G.5. Eidesstattliche Erklärung	141

Abbildungsverzeichnis

A.1. Generierung von cGMP	4
A.2. Schema der cGK.....	5
A.3. Signalkaskade im glatten Muskel.....	8
A.4. Trimerer Komplex	9
A.5. Schema von IRAG	10
A.6. Zentrale Aktivierungskaskade einer Sepsis	12
B.1. Implantation eines Radiotransmitters.....	25
B.2. Zyklus von Baculoviren	40
C.1. Phänotyp von IRAG-defizienten Mäusen.....	58
C.2. Kaplan-Meier-Überlebenskurve von Wildtyp- und IRAG ^{-/-} -Mäusen.....	59
C.3. Westernblotanalyse diverser Proteine	60
C.4. Relaxation von Aorta durch 8-Br-cGMP.....	62
C.5. Relaxation von Colon durch 8-Br-cGMP	63
C.6. Relaxation von Jejunum durch 8-Br-cGMP	64
C.7. Tonuseniedrigung bei Aorta und Colon durch DEA-NO	66
C.8. Acetylcholin relaxiert Aortengewebe.....	68
C.9. Aktivierung von pGC durch ANP.....	69
C.10. K85-Depolarisation von Aortengewebe.....	70
C.11. cGMP-Analyse mittels EIA.....	71
C.12. cGMP-Analyse mittels HPLC.....	72
C.13. Basale Blutdruckdaten	74
C.14. Effekte [cGMP] _i -erhöhender Substanzen auf Blutdruck und Herzfrequenz.....	76
C.15. Statistische Auswertung des Blutdruckabfalles.....	77
C.16. Effekte von LPS auf den Blutdruck	79
C.17. iNOS-mRNA in diversen Organen	80
C.18. mRNA-Expression diverser Gene der cGKI-Kaskade.....	81
C.19. Schematische Darstellung der cGKIα/β-cDNA	83
C.20. Proteinbiochemische Analyse von cGKI-(His) ₆	84
C.21. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ni ²⁺ -TED-gereinigter cGKIα	85
C.22. Analyse von Zellextrakten.....	86
C.23. Proteinbiochemische Analyse aufgereinigter cGKI _{wt}	88
C.24. Phosphotransferaseassays unterschiedlicher Expressions- und Reinigungschargen	89

C.25. <i>In vitro</i> -Aktivierung von cGKI durch cCMP	91
C.26. Keine Sensibilisierung von cGKI durch cCMP	92
C.27. db-cCMP kann cGKI nicht aktivieren	93
C.28. Effekte von db-cCMP auf den glatten Muskel der Aorta	94
C.29. Effekte von Butyrat auf Aortengewebe.....	95
C.30. Keine Hemmung cGMP-abhängiger PDEs durch db-cCMP	97
C.31. Defekt in der db-cCMP vermittelten Relaxation von genetisch verändertem Aortenengewebe	99
C.32. Relaxation von SMI α -rescue-Gewebe durch db-cCMP	100
C.33. db-cCMP kann cGKI nicht sensibilisieren	102
D.1. cGKI-Signalkaskade im vaskulären glatten (IRAG-KO)-Muskel.....	108
D.2. Potentieller Signalmechanismus von cCMP im glatten Muskel.....	118

Tabellenverzeichnis

Tab. B.1.: Verwendete Geräte.....	15
Tab. B.2.: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Kits	17
Tab. B.3.: Verwendete Aktivatoren und Inhibitoren (Myographie)	23
Tab. B.4.: Verwendete Organismen	26
Tab. B.5.: Verwendete Plasmide / Virus-DNA	27
Tab. B.6.: Antibiotika als Nährmediumzusätze	28
Tab. B.7.: Verwendete Proteaseinhibitoren.....	46
Tab. G.1.: Verwendete Antikörper	136
Tab. G.2.: Verwendete Restriktionsenzyme	137
Tab. G.3.: Verwendete Oligonukleotide.....	138

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
8-Br	8-Bromo
A	Adenosin oder Ampere
AA	Acrylamid, Amino Acid
AC	Adenylylzyklase
Amp	Ampicillin
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
bidest	zweimal destilliert
BNP	brain derived natriuretic peptide
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bt ₂ - / db-	dibutyryliertes
C	Cytidin
c	Zenti (10^{-2})
cA, cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CC	Cytidylylzyklase
CCh	Carbachol
cCMP	zyklisches Cytidin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CNP	C-type natriuretic peptide
cG, cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II
cGKIα	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ Iα
cGKIβ	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ Iβ
CNG	cyclic nucleotide gated ion channel
cNK	cNMP-abhängige Proteinkinase
cNMP	zyklisches Nukleosid-3',5'-monophosphat
cpm	Zähler pro Minute

Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEA-NO	2-(N,N-Diethylamino)-diazanol-2-oxid
DETA-NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EIA	Enzym Immuno Assay
EtOH	Ethanol
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	Faraday
FCS	fötales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
g	Gramm oder Gravitationskonstante
G	Guanosin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IRAG	Inositoltriphosphat Rezeptor assoziiertes cG-Kinasesubstrat
k	kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
KG	Körpergewicht
KO	„knock out“ (allgemein: Defizienz eines Proteins durch Ausschalten eines Gens mittels homologer Rekombination)
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LEW	Lyse-Äquilibration und Waschpuffer
L-NAME	N_{ω} -Nitro-L-Argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharide
m	Milli (10^{-3}) oder Meter

M	molar
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MCS	multiple cloning site
min	Minute
Mio	Millionen
MLCK	Myosin leichte Kette Kinase
MLCP	Myosin leichte Kette Phosphatase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, 4-Morpholinopropansulfonsäure
MWCO	molmassenabhängige Abtrennungsgrenze
MYPT1	regulatory subunit of myosin light chain phosphatase
n	nano (10^{-9})
N	Newton
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-on
p	piko (10^{-12})
pA	pro analysi, Qualität zu Analysenzwecken
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte (Koch)Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
pGC	partikuläre Guanylylzyklase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGS	regulator of G-Protein signaling
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s, sec	Sekunde
SAP	Alkalische Shrimpphosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9-Zelllinie
sGC	lösliche Guanylylzyklase
SMIβ	Smooth Muscle cGKI β
SNP	Natriumnitroprussid
SOB	Super Optimal Broth

T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetraethylenmethyldiamin
TN	Tris-Natriumchloridpuffer
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
Vol	Volumen
VT	Volumenteil
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol
ZK	Zellkern
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium
Δ12	Bezeichnung für die IRAG-Δ12 Mausmutante (Deletion von Exon 12)
Ω	Ohm

A. Einleitung

Schon vor mehr als 100 Jahren wurde Stickstoffmonoxid (NO) für medizinische Zwecke eingesetzt. Damals war zwar die pharmakologische Wirkungsweise von NO noch nicht bekannt, doch eines der herausragenden historischen Beispiele für die therapeutische Anwendung war der Sprengstofffabrikant Alfred Nobel, der unter Angina Pectoris litt. Interessanterweise wurde ihm genau der Stoff zur Kupierung der immer wieder auftretenden pektanginösen Schmerzen verordnet, der in seinen Fabriken hergestellt wurde.

1998 wurden dann die drei Amerikaner Furchgott, Ignarro und Murad für die Identifizierung des gefäßerweiternden Stoffes EDRF („endothelium derived relaxing factor“) als NO mit dem nach seinem Gründer Alfred Nobel benannten Preis ausgezeichnet.

Über die Pharmakologie von NO wurde bis dahin lange gerätselt, und selbst nach der Entdeckung (Ignarro et al., 1987) sind noch nicht alle Wirkungen entschlüsselt, weshalb Forschungsanstrengungen über das Radikal NO nach wie vor im Fokus der Wissenschaft stehen.

A.1. Calciumregulation und Glattnuskelkontraktion

Calcium (Ca^{2+}) ist ein bedeutender physiologischer Botenstoff, der vor allem intrazellulär seine besonders wichtige Rolle entfaltet. Im Laufe der Jahre wurden ihm viele regulatorische Prozesse wie Transkription, Proliferation, Vesikeldegranulation oder eine Steuerung der Glattnuskelkontraktion zugeschrieben. All diese Prozesse werden insbesondere durch die intrazelluläre Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert. Eine glatte Muskelzelle verfügt normalerweise über $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernde und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -senkende Mechanismen. Der Ca^{2+} -Spiegel kann dabei entweder durch den Einstrom von extrazellulär über Ca^{2+} -Kanäle (z.B. L-Typ Calciumkanal oder $\text{Ca}_v1.2$) oder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern im endoplasmatischen Retikulum (ER) erhöht werden (Berridge et al., 1998, Berridge et al., 2003, McDaniel et al., 2001). Beide Mechanismen können sich gegenseitig verstärken oder beeinflussen. Diverse Agonisten, wie z.B. Adrenalin, Endothelin, Bradykinin oder Thromboxan binden dabei an ihren 7-transmembranären, G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR). Das GTP-bindende Protein (meist $G_{q/11}$) aktiviert die Phospholipase C β (PLC β), was zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) führt (Ushio-Fukai et al., 1998, Xia et al., 2001, Filtz et al., 2004). IP_3 bindet an den im ER verankerten Ca^{2+} -Kanal IP_3 -Rezeptor (IP_3R), was einen Ausstrom von Ca^{2+} aus den Speichern ins Zytosol zur Folge hat (Bootman et

al., 2002, Hisatsune et al., 2005). Dies wiederum führt zum kapazitiven Einstrom von extrazellulärem Calcium („Calcium-getriggert Calciumeinstrom“) über spannungsabhängige und spannungsunabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran (McDaniel et al., 2001). Dies dient einerseits der Wiederauffüllung der entleerten Calciumspeicher und andererseits auch der Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die dadurch angestiegene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und leitet damit die Phosphorylierung von regulatorischer Myosin-Leichte-Kette (MLC) an Ser-19 ein (Schlossmann et al., 2003). Myosin-ATPase wird aktiviert und dies resultiert in der Verkürzung des kontraktile Apparats und damit in einer Glattmuskelkontraktion (Hofmann et al., 2000, Feil et al., 2003, Webb, 2003).

Eine Kontraktion des glatten Muskels kann auch ohne Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eingeleitet werden. Normalerweise dient Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) als Gegenspieler zu MLCK, welche bei sinkenden Calciumspiegeln die MLC dephosphoryliert (Lee et al., 1997). MLCP ist ein Holoenzym, das aus drei Untereinheiten besteht: einer katalytischen 37 kDa Einheit (PP1c), einer 130 kDa regulatorischen Untereinheit (MYPT1) und einer 20 kDa Untereinheit mit bis dato unbekannter Funktion (Kitazawa et al., 2003). $\text{G}_{12/13}$ aktiviert das kleine GTP-bindende Protein RhoA, welches wiederum die Rho-Kinase (ROCK) stimuliert (Gohla et al., 2000). ROCK bewirkt folglich eine Inhibierungsphosphorylierung an der regulatorischen Untereinheit MYPT1 der MLCP an Ser-696 (Wooldridge et al., 2004). Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen MLCK und MLCP in Richtung MLCK verschoben, ohne dass sich $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ändert. Dies führt letztlich zu einer verstärkten Kontraktion des glatten Muskels bei gleich bleibender Calciumkonzentration („Calciumsensibilisierung“) (Bonnevier et al., 2004, Somlyo et al., 1998).

An der Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind verschiedene ATPasen beteiligt, wie zum Beispiel die Sarko/Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Phospholamban (PLB)-abhängig eine Wiederaufnahme des zytosolischen Calciums in die intrazellulären Speicher bewirkt, oder in der Zellmembran lokalisierte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die aufgrund von Konzentrationsgradienten intrazelluläres Calcium nach außen befördern (Berridge et al., 2000).

Darüber hinaus stellen die Phosphorylierung des Protein Kinase C-stimulierten Inhibitorproteins (CPI-17) (Eto et al., 1995, Kitazawa et al., 2000, Kitazawa et al., 2004) und die Arachidonsäure-induzierte Dissoziation der MLCP (Xiao et al., 2005) weitere Möglichkeiten zur Hemmung der Aktivität der MLCP dar. Die Phosphorylierung des CPI-17 wird neben der Protein Kinase C (Stevenson et al., 2004) auch durch anderen Kinasen vermittelt, unter anderem durch Rho-Kinase (Koyama et al., 2000) und durch Protein Kinase N (Hamaguchi et al., 2000). Weiterhin phosphorylieren vermutlich auch die „MYPT1-assoziierten“-Kinase (MacDonald et al., 2001) und die „integrin-linked“-Kinase

(Deng et al., 2001) CPI-17. Das Gleichgewicht des Phosphorylierungsgrads der MLC wird sowohl durch den RhoA/Rho-Kinase-Signalweg als auch durch das phosphorylierte CPI-17 in Richtung phosphorylierter MLC verschoben und so eine Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion am glatten Muskel induziert (Hofmann, 2005, Somlyo et al., 2000).

A.2. Der NO/cGMP/cGKI Signalweg

NO (früher als EDRF (Furchgott et al., 1980) bezeichnet, das von Ignarro et al., 1987 als NO identifiziert wurde) wird endogen von drei verschiedenen Isoenzymen gebildet. Hierbei handelt es sich um die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3), die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2). Die ersten beiden werden konstitutiv exprimiert: eNOS überwiegend im Endothel, nNOS meist in Neuronen (z.B. NANC-Neurone), in denen NO als Neurotransmitter fungiert. iNOS wird in sehr niedrigen Konzentrationen exprimiert und ist durch Endotoxine (LPS) und Zytokine (INF γ , TNF α , IL-1 β) meist in Makrophagen, Mesangialzellen, Kardiomyozyten und glatten Muskeln induzierbar (Ghosh et al., 2003, Dedkova et al., 2002, Walford et al., 2003).

Die Aktivitäten der konstitutiven NO-Synthasen nNOS und eNOS sind Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig (Hanafy et al., 2001). eNOS ist zusätzlich auch Scherstress-abhängig, wodurch NO permanent in niedrigen Konzentrationen gebildet wird. Zur verstärkten NO-Synthese ist ein aktives Tetramer aus zwei NOS-Molekülen und zwei Ca^{2+} /Calmodulin-Teilen nötig. iNOS wird als Ca^{2+} -unabhängig beschrieben, wobei seine verstärkte Expression im Entzündungsfall die NO-Synthese der konstitutiven Synthasen um das über 1000-fache steigern kann. NO entfaltet dann u.a. durch Reaktion mit Superoxid zu Peroxynitrit seine zytotoxische Funktion (Klein, 2002).

Allen drei Enzymen liegt die Umwandlung von L-Arginin durch Oxidation des terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe zu L-Citrullin und NO zugrunde (Abb. A.1., Lloyd-Jones et al., 1996, Dejam et al., 2004).

Stickstoffmonoxid wird diverse Funktionen zugeschrieben, wie z.B. Glattnuskelrelaxation, Neurotransmission, neuronale Plastizität, Thrombozytenaggregationshemmung oder gastrointestinale Motilität (Hofmann et al., 2006). NO ist sehr kurzlebig, diffundiert schnell in entsprechende Zielgewebe und aktiviert über eine Häm-Gruppe die lösliche Guanylylzyklase (sGC), welche als NO-Rezeptor fungiert und sich aus jeweils einer von zwei Alpha-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$) und einer von zwei Beta-Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$) zusammensetzt (Garthwaite, 2010).

sGC katalysiert die Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in den „second messenger“ zyklisches Guanosin- 3',5'-monophosphat (cGMP) (Abb. A.1., Krümenacker et al., 2004). Neben der Synthese durch sGC entsteht cGMP auch nach Aktivierung von

membranständiger Guanylylzyklase (pGC) durch die Agonisten „atrial natriuretic peptide“ (ANP), „brain derived natriuretic peptide“ (BNP), „C-type natriuretic peptide“ (CNP) oder Guanylin (Abb. A.1., Potter et al., 2009). cGMP aktiviert diverse Zielstrukturen (Schmidt et al., 2009, Stasch et al., 2009, Megson et al., 2009). Dies sind insbesondere cNMP-regulierende Phosphodiesterasen (PDEs), die den Abbau von zyklischen Nukleotiden katalysieren (Sonnenburg et al., 1994), „cyclic nucleotide gated ion channels“ (CNGs) (Biel et al., 2009) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) (Schlossmann et al., 2003, Hofmann et al., 2009). Eine Kreuzaktivierung des cAMP Signalweges wurde ebenfalls beschrieben, entweder durch Blockade von PDEs, die dadurch einen $[cAMP]_i$ -Anstieg auslösen oder durch direkte Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen (cAK) (Bender et al., 2006, Wörner et al., 2007).

cGMP wird in Glattmuskelzellen insbesondere durch die PDE5-Isoform hydrolysiert (Rybalkin et al., 2003, Francis et al., 2009). Pharmakologisch wird in diese Signalkaskade heutzutage routinemäßig an verschiedenen Stellen eingegriffen. Zur Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie oder der erektilen Dysfunktion steht Sildenafil (Ravatio®, Viagra®), ein PDE 5-Hemmer, zur Verfügung. Weiterhin sind die beiden PDE 5-Hemmer Vardenafil (Levitra®) und Tadalafil (Cialis®) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf dem Markt. Schnell freisetzende, inhalative oder sublingual zu applizierende NO-Donoren wie Glyceroltrinitrat (Nitrolingual®) dienen der Kupierung von Angina Pectoris-Anfällen. Riociguat, ein oral bioverfügbarer Stimulator der sGC zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie, befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung (Belik, 2009).

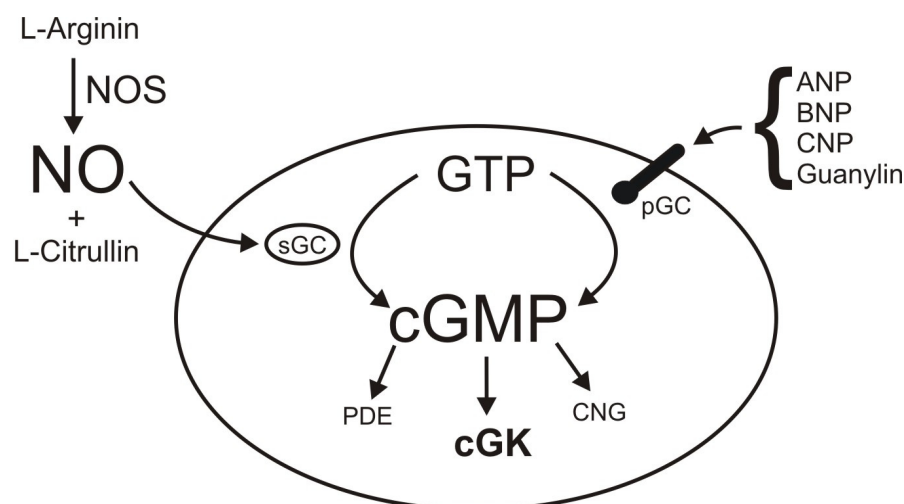


Abb. A.1. Generierung von cGMP. NO wird durch die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet. NO aktiviert sGC, was zur Synthese von cGMP aus GTP führt. Dieser Schritt ist ebenfalls durch pGC (nach Aktivierung mit ANP, BNP, CNP oder Guanylin) katalysierbar. cGMP aktiviert seine Zielstrukturen PDE, cGK oder CNG; in der Glattmuskelzelle ist cGK eines der Hauptzielstrukturen.

A.3. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen

cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK oder PKG) gehören der Klasse der Serin/Threonin-Kinasen an und stellen eine Hauptzielstruktur für cGMP dar (Pfeifer et al., 1999, Hofmann et al., 2009). In Eukaryoten wurden zwei Gene identifiziert, *prkg1*, das für die cGKI codiert und aus 10 Exons besteht, und *prkg2* (19 Exons), welches für cGKII codiert (Abb. A.2.). cGKI wird durch alternatives Spleißen in zwei Isoformen, cGKI α und cGKI β , exprimiert. Beides sind lösliche Kinasen, die im Zytosol lokalisiert sind. Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich lediglich in ihrer N-terminalen Domäne (ca. 100 AS) (Hofmann et al., 2009). Bei cG-Kinasen sind regulatorische und katalytische Domänen in einem einzigen Protein lokalisiert und unterscheiden sich hierdurch z.B. von den cA-Kinasen, die verschiedene Untereinheiten aufweisen (Tasken et al., 1997).

cGKII ist an Gly2 myristoyliert, wodurch sie in der Zellmembran verankert ist. Der strukturelle Aufbau ähnelt ansonsten dem der cGKI.

cG-Kinasen bestehen grundsätzlich aus drei Domänen:

- N-terminale Domäne mit Leucinzipper (relevant für Homodimerisierung und spezifischer Substratbindung) und autoinhibitorischer Domäne (Pseudosubstrat).
- Regulatorische Domäne mit hoch- und niedrigaffiner cGMP-Tandembindungsstelle zur Aktivierung des Enzyms.
- C-terminale katalytische Domäne mit ATP-Bindungsstelle, die den Transfer des γ -Phosphatrestes auf ein Serin oder Threonin des Substratproteins katalysiert.

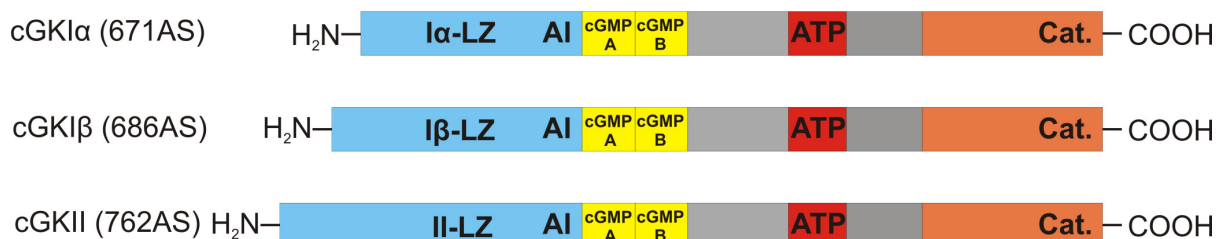


Abb. A.2. Schema der cGK. Gegenüberstellung von cGKI α , cGKI β und cGKII. Strukturelle Ähnlichkeit ist bei allen drei Enzymen gegeben. Bei den cGKI-Isoformen ist nur der N-terminale Bereich (blau) unterschiedlich.

AS: Aminosäure; AI: autoinhibitorische Domäne; LZ: Leucinzipper; Cat.: katalytische Domäne

cGKI α wird vor allem in Herz, Lunge und Cerebellum exprimiert. Beide Isoformen (cGKI α und cGKI β) kommen in etwa in gleichem Ausmaß in glatten Muskelzellen des arteriellen Systems (Hofmann et al., 2006), des Uterus, des Gastrointestinaltrakts und der Trachea vor. cGKI β wird verstärkt in Thrombozyten, im Hippocampus und im *Bulbus olfactorius* (Hofmann et al., 2009, Geiselhöringer et al., 2004) exprimiert.

Wenn zwei Moleküle cGMP an ein Molekül Enzym an die dafür vorgesehenen Stellen der regulatorischen Domäne binden, kommt es zur Autophosphorylierung des Amino-Terminus an Thr-59 der cGKI α bzw. an Ser-64 und Ser-80 der cGKI β , wodurch das Enzym jeweils seine Konformation ändert. Dies hebt die Hemmung der katalytischen Domäne durch die N-terminale Pseudosubstratbindungsstelle auf. Die katalytische Domäne enthält eine MgATP-Bindungstasche und eine Bindungstasche für das Substratpeptid. Interagiert das Substrat mit der Bindungsstelle in der katalytischen Domäne, wird das γ -Phosphat des ATP auf den Serin/Threoninrest des Zielproteins katalysiert (Pfeifer et al., 1999).

cGKI α ist ca. 10fach sensitiver als cGKI β , d.h. sie wird bereits bei 10fach niedrigeren Konzentrationen von cGMP aktiviert (K_a (cGKI α) = 0.1 μ M; K_a (cGKI β) = 1.0 μ M, Pöhler et al., 1995, Gamm et al., 1995, Ruth et al., 1997).

Weiterhin weisen beide cGKI-Isoenzyme 8 Cystein-Reste außerhalb des Aminoterminus auf. cGKI α hat zusätzliche Cystein-Reste an den Positionen 43 und 118. Eine Oxidation von boviner cGKI α durch Cu^{2+} aktiviert das Enzym durch Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen Cys-118 und Cys-196 sowie Cys-313 und Cys-519 (Landgraf et al., 1991). Eine physiologische Bedeutung konnte dieser Art von Aktivierung bisher nicht zugeordnet werden, da eine Oxidation *in vivo* durch diese Metallionen (und andere) nicht wahrscheinlich erscheint. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei cGKI α eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys-43 entsteht, die beide Monomere verbindet. Oxidiert man diese durch Wasserstoffperoxid, kommt es zu einer cGMP-unabhängigen Aktivierung (Burgoyne et al., 2007). Da es Cys-43 nur in der α -Isoform gibt, scheint die Kinase ggf. eine Rolle bei oxidativem Stress zu spielen, da diese Oxidation einen möglichen alternativen Aktivierungsmechanismus der Kinase darstellen könnte.

cGKI β , welche ebenfalls als Homodimer agiert, ist in der Plasmamembran verankert und überwiegend in der Darmmucosa, in der Niere (aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife, Bürstensaum des proximalen Tubulus (Gambaryan et al., 1996)), in Chondrozyten (Pfeifer et al., 1996), in der Lunge (Hofmann et al., 2009) und in vielen Bereichen des Gehirns lokalisiert (de Vente et al., 2001, Werner et al., 2004). cGKI β scheint eine wichtige Rolle in der gastrointestinalen Sekretion zu spielen, möglicherweise durch Phosphorylierung des CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Vaandrager et al., 1998). Weiterhin wurde beschrieben, dass cGKI β den Na^+/H^+ -Austauscher 3 (NHE3) inhibiert und dadurch eine verstärkte Natrium-Rückresorption im Dünndarm bewirkt. Die NHE3-Inhibition erfolgt durch Interaktion mit dem Ankerprotein NHERF2 (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor) (Cha et al., 2005).

Auch eine Beeinflussung der Aldosteronsekretion durch cGKI β wurde beschrieben. Basale Konzentrationen von Aldosteron sind bei Wildtyp und cGKI $\beta^{-/-}$ -Tieren gleich, jedoch konnte

eine zuvor durch ACTH (adrenocorticotropes Hormon) erhöhte Aldosteronsekretion durch Applikation von ANP bei cGKII-defizienten Tieren im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren nicht gehemmt werden (Spiessberger et al., 2009).

Hitzestabiles Enterotoxin (STa) aus *E.coli*, sowie Guanylin stimulieren die GC-C und aktivieren somit die cGK-Signalkaskade. Dadurch kommt es zu Diarrhoe durch verstärkte Wassersekretion ins Darmlumen. Dieser Effekt auf die Wassersekretion ist bei cGKII-defizienten Tieren aufgehoben. Weiterhin scheint cGKII am Knochenwachstum durch Sox9-Interaktion beteiligt zu sein. cGKII^{-/-}-Tiere sind Zwerge und zeigen einen Defekt in der endochondralen Verknöcherung (Pfeifer et al., 1996, Talts et al., 1998).

A.4. cGMP-vermittelte Glattmuskelrelaxation

cGKI phosphoryliert in der (vaskulären) glatten Muskelzelle eine Vielzahl an Substraten, die im Endeffekt eine Senkung des intrazellulären Calciumspiegels, bzw. eine Calciumdesensibilisierung des kontraktile Apparates zur Folge haben. Dies führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Eine ubiquitäre cGKI-Defizienz in Mäusen ist im Schnitt 6 Wochen post partum letal. Diese Tiere zeigen in den ersten Wochen eine ausgeprägte Hypertonie und einen Defekt in der cGMP-vermittelten Vasorelaxation (Pfeifer et al., 1998). cGKI α phosphoryliert zum Beispiel RGS2, wodurch die GTPase-Aktivität der G $\alpha_{q/11}$ -Untereinheit 100-1000fach erhöht wird und die Signalstärke der entsprechenden GPCR-Aktivierung gesenkt wird (Heximer et al., 1999, Hepler, 1999, Tang et al., 2003). cGKI α phosphoryliert auch die regulatorische Untereinheit MYPT1 der MLCP an Ser-695. Dadurch kommt es zu einer erhöhten MLCP-Aktivität und zu einer Calcium-desensibilisierung (Surks et al., 1999, Surks et al., 2003), da das Aktivitätsverhältnis zwischen MLCK und MLCP auf Seiten von MLCP verschoben wird. Die Phosphorylierung an Ser-695 durch cGKI (und cAK) verhindert gleichzeitig die Inhibierungsphosphorylierung an Ser-696 durch ROCK (Wooldridge et al., 2004).

cGKI β zeigt eine sehr hohe Affinität zum Inositoltriphosphat-Rezeptor-assoziierten-cG-Kinasesubstrat (IRAG), welches im endoplasmatischen Retikulum mit dem IP₃-Rezeptor I assoziiert ist (Schlossmann et al., 2000, Ammendola et al., 2001). Eine verminderte Glattmuskelrelaxation sowie eine verlangsamte Magen-Darm-Passage konnte bei Nagern mit mutiertem IRAG (IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ -Mutante) gezeigt werden (Geiselhöringer et al., 2004). Eine Phosphorylierung von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen (BK_{Ca}) durch cGKI erhöht deren Offenwahrscheinlichkeit. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran und damit zum Verschluss von spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanälen, was im Endeffekt [Ca²⁺]_i vermindert (Alioua et al., 1998, Fukao et al., 1999). Tiere mit einer BK_{Ca}-Defizienz zeigen beispielsweise einen erhöhten Blutdruck (Sausbier et al., 2005).

Jüngstens konnten noch eine Reihe weiterer Substrate (SMTNL1 (Wooldridge et al., 2008), RhoA (Ellerbroek et al., 2003), Telokin (Walker et al., 2001), Phospholamban (Lalli et al., 1999, Koller et al., 2003)) in Glattmuskelzellen identifiziert werden, die ebenfalls einen Einfluss auf die Glattmuskelrelaxation haben können (Schlossmann et al., 2009). Eine Übersicht über den zentralen cGKI-Mechanismus in der glatten Muskelzelle ist in Abb. A.3. dargestellt.

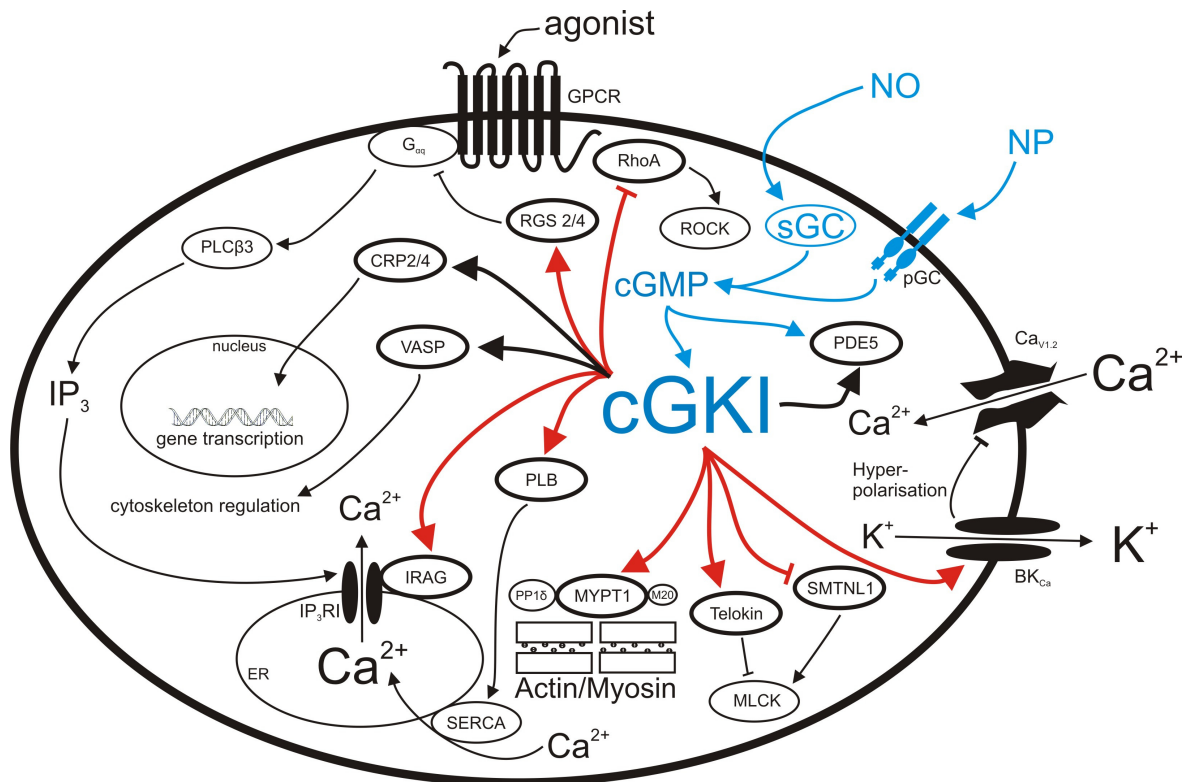


Abb. A.3. Signalkaskade im glatten Muskel. Der zentrale Aktivierungsmechanismus der cGKI ist in blau dargestellt. Die roten Aktivierungs- bzw. Inhibierungspfeile weisen auf Substrate, die (vermutlich) direkt in die Glattmuskelrelaxation involviert sind. Schwarze Pfeile weisen auf gentranskriptionische, Zellskelett-regulatorische oder cGMP-regulatorische Substrate. wichtige Abkürzungen (bei Substraten mit zugehöriger Literaturangabe): ROCK: Rho-Kinase; RGS: regulator of G-protein signaling (Tang et al., 2003, Sun et al., 2005); CRP: cystein-rich-protein (Chang et al., 2007, Zhang et al., 2007); VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (Butt et al., 1994, Hauser et al., 1999); PLB: Phospholamban (Koller et al., 2003, Lalli et al., 1999); IRAG: IP $_3$ -Rezeptor-assoziiertes cGKI-Substrat (Geiselhöringer et al., 2004, Schlossmann et al., 2000); SMTNL1: Smoothelin 1 (Wooldridge et al., 2008); PDE: Phosphodiesterase (Rybalkin et al., 2003); SERCA: Sarko-endoplasmatisches Retikulum Ca $^{2+}$ -ATPase; MLCK: Myosin-Leichte Kette-Kinase; BK $_{Ca}$: Calcium-aktivierter Kaliumkanal (Sausbier et al., 2000); Ca $_{V1.2}$: ein spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal (Yang et al., 2007); ER: Endoplasmatisches Retikulum; IP $_3$ RI: Inositol-Triphosphat-Rezeptor I; PLC β_3 : Phospholipase C β_3 .

A.5. Das IP₃RI- assoziierte cGKI-Substrat (IRAG)

Im Jahr 2000 wurde das ca. 125 kDa schwere Protein IRAG zum ersten Mal durch Isolation aus mikrosomalen bovinen Tracheamembranen mittels Affinitätschromatographie identifiziert. Dabei konnte durch Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass das Protein einen stabilen trimeren Komplex mit IP₃RI und der cGKI β im glatten Muskel bildet (Schlossmann et al., 2000). Mittels Zwei-Hybrid-System konnte eine zusätzliche Interaktion mit cGKI α und cGKI γ ausgeschlossen werden (Ammendola et al., 2001). Andere Arbeitsgruppen konnten dies ebenfalls einige Jahre später unabhängig davon zeigen (Casteel et al., 2005).

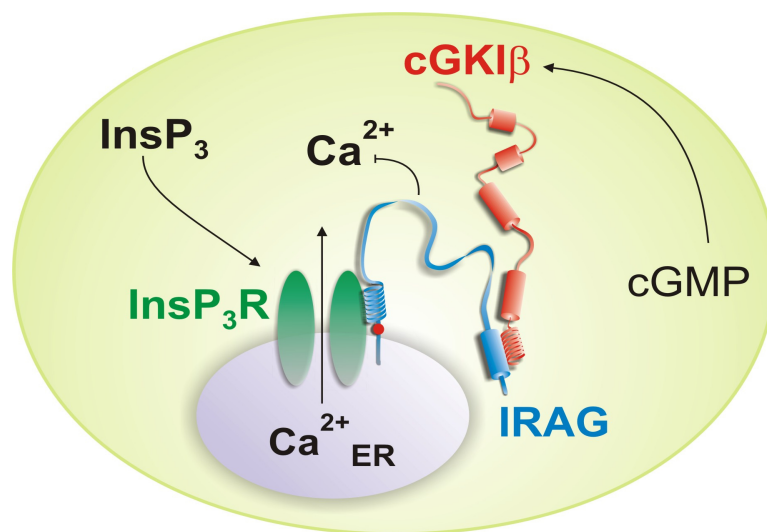


Abb. A.4. Trimerer Komplex. Schematische Darstellung des trimeren Komplexes aus cGKI β , IRAG und IP₃RI. cGMP aktiviert die cGKI β -Isoform. Diese interagiert mit ihrem N-Terminus mit IRAG, welches C-terminal im ER verankert ist und über die coiled-coil-Domäne mit dem IP₃RI assoziiert ist. Eine Aktivierung des Komplexes reduziert den Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER ins Zytosol. Einzelheiten sind im Text angegeben. ER: endoplasmatisches Retikulum.

IRAG weist C-terminal eine Transmembrandomäne auf, die das Protein im ER verankert. Zentral gelegen ist die coiled-coil-Domäne, die mit dem IP₃RI interagiert. Weiter C-terminal gelegen befindet sich die Interaktionsstelle für cGKI β .

Bovines IRAG zeigt *in vitro* fünf putative Phosphorylierungsstellen, von denen zwei *in vivo* in humanen Thrombozyten bestätigt werden konnten (Ser-664 und Ser-677).

Mittels funktioneller Studien an COS-7-Zellen, in denen IRAG und cGKI β heterolog exprimiert wurden, konnte die Hemmung des Calciumausstroms aus dem ER nachgewiesen werden. Induzierte man in diesen COS-7-Zellen mit Bradykinin eine intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung, so konnte diese durch Aktivierung der cGKI β mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP unterdrückt werden. Dieser Mechanismus ist ebenso in kultivierten, vaskulären glatten Muskelzellen von IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} (Geiselhöringer et al., 2004) und IRAG^{-/-}-Gewebe (Desch et al., 2010) gezeigt worden. Bei der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Mutante ist

die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP_3RI zerstört. Dies wurde durch Anwendung des Cre/LoxP-Systems zur Deletion von Exon 12 erreicht.

Eine besonders wichtige Funktion spielt IRAG in der NO vermittelten Thrombozyten-aggregationshemmung, was kürzlich gezeigt werden konnte (Antl et al., 2007). IRAG wird in zahlreichen Geweben exprimiert, überwiegend jedoch in glatten Muskeln und in Thrombozyten (Geiselhöringer et al., 2004).

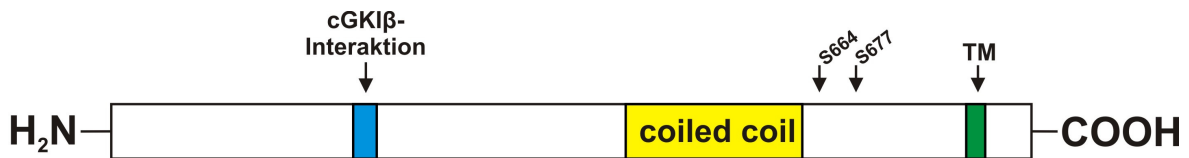


Abb. A.5. Schema von IRAG. Vereinfachtes Schema von IRAG mit den wichtigsten Domänen. In blau dargestellt ist die Interaktionsstelle mit cGKI β , die gelbe Domäne (coiled-coil) ist für die Interaktion mit dem IP_3RI verantwortlich, grün markiert ist die C-terminale Transmembrandomäne (TM), die das Protein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. S-664 und S-677 sind die *in vivo* Phosphorylierungsstellen (siehe auch Text).

Casteel et al., 2008 konnten durch heterologe Expression in „baby hamster kidney“ (BHK)-Zellen zeigen, dass IRAG auch für die Translokation von cGKI β in den Zellkern verantwortlich ist. Bei Abwesenheit, bzw. Mutation der Interaktionsstelle für cGKI β translozierte die Kinase nach Stimulation mit cGMP-Analoga in den Zellkern. IRAG war für die Regulation der Translokation von cGKI α in den Zellkern nicht relevant. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Regulation auch für COS-7 Zellen zutrifft und bei einer Koexpression von IRAG ΔInt (Interaktionsstelle mit cGKI β deletiert) mit cGKI β eine Translokation der Kinase in den Nukleus nach cGMP-Stimulation nicht verhindert werden konnte. Interessanterweise war bei kultivierten vaskulären IRAG $^{-/-}$ Glattmuskelzellen eine Translokation von cGKI β in den Zellkern auch nach Stimulation mit cGMP-Analoga nicht zu detektieren (Desch et al., 2010).

A.6. Sepsis und die NO/cGMP-Signalkaskade

Bei einer Sepsis, im Volksmund auch „Blutvergiftung“ genannt, lösen Bakterien, bzw. Bakterienbestandteile (meist gramnegativer Keime (Hauber et al., 2009)) eine systemisch-inflammatorische Reaktion aus, welche durch starke Stimulation des Immunsystems zur Aktivierung und Freisetzung zahlreicher humoraler und zellulärer Mediatoren führt.

Pro Jahr erkranken alleine in Deutschland mehr als 75000 Einwohner an einer schweren Sepsis oder an septischem Schock; mehr als 79000 werden mit einer Sepsis auf Intensivstationen behandelt. Die Mortalität liegt nach wie vor bei über 50 %. Die Sepsis stellt somit die dritthäufigste Todesursache in Deutschland nach kardiovaskulären Erkrankungen (Herzinfarkt, Apoplex) und Tumorerkrankungen dar (Engel et al., 2007).

Die komplexe Pathophysiologie einer Sepsis ist trotz intensiver Forschungen bisher nur teilweise verstanden. Einerseits werden Thrombozytopenien und Aktivierung der Gerinnungskaskade festgestellt, was zu Störungen der Mikrozirkulation und zu Thromben führt (Vincent et al., 2002, Schouten et al., 2008). Andererseits sind, abhängig vom Schweregrad der Sepsis, auch Endothelveränderungen beschrieben worden, was mit vasomotorischer Dysregulation einhergeht.

Während einer Sepsis werden proinflammatorische Mediatoren gebildet, die die Transkription von iNOS (NOS2) induzieren. Dies resultiert in exzessiver NO-Synthese (siehe A.2. und Abb. A.6.) mit starkem Blutdruckabfall durch Erweiterung des arteriellen Systems (Cobb, 2001, Vincent et al., 2000). Einen septischen Schock zeichnet neben Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) auch noch ein Multiorganversagen aus (Landry et al., 2001, Russell, 2006). Das therapeutische Ziel zur Blutdruckstabilisierung ist daher eine Volumensubstitution, sowie Noradrenalin- und Glucocorticoidapplikation (Russell, 2006). Die überschießende NO-Generierung scheint ein Grund für das Minderansprechen von Noradrenalin, Angiotensin II oder Vasopressin während eines septischen Schocks zu sein (Hollenberg et al., 1997, Hauser et al., 2005, Kirkeboen et al., 1999). Tierexperimentelle Daten konnten belegen, dass sich eine Hemmung der NO-Synthese durch Blockade der sGC mit Methylenblau positiv auf den Blutdruck während einer Sepsis auswirkt und den systemischen Widerstand steigert (Kilbourn et al., 1990, Thiernemann et al., 1990, Hickey et al., 1997). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass eine spätere Blockade von sGC während Sepsis die Mortalität bei Ratten senken konnte, wohingegen eine frühzeitige Hemmung nutzlos war (Fernandes et al., 2009). Eine unselektive Blockade der NO-Synthase führte jedoch bei Patienten mit Sepsis zu erhöhter Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lopez et al., 2004). Dies könnte jedoch auf unselektive NOS-Hemmung und daraus resultierender Toxizität zurückzuführen sein. Trotzdem scheint eine Modulation der NO-Synthese wichtig zu sein, da eine Verbesserung der Hämodynamik erzielt und das Ansprechen der Gefäße auf Vasokonstriktoren verstärkt werden konnte.

In iNOS^{-/-}-Mäusen konnte bei einer *E.coli* Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Sepsis eine exzessive NO-Synthese verhindert werden, was sich in einer weniger gravierenden endothelialen Dysfunktion im Vergleich zu Wildtyp-Nagern widerspiegelte (Chauhan et al., 2003).

Inwieweit der cGMP- Signalweg in der weiteren Signalkaskade auf cGKI-Substratebene eine entscheidende Rolle für die Blutdruckregulation während einer Sepsis spielt, wurde bislang nicht untersucht. Speziell der pathophysiologische Aspekt des cGKIβ-Substrats IRAG in Kombination mit verschiedenen Sepsismodellen bedarf daher weiterer Aufklärung.

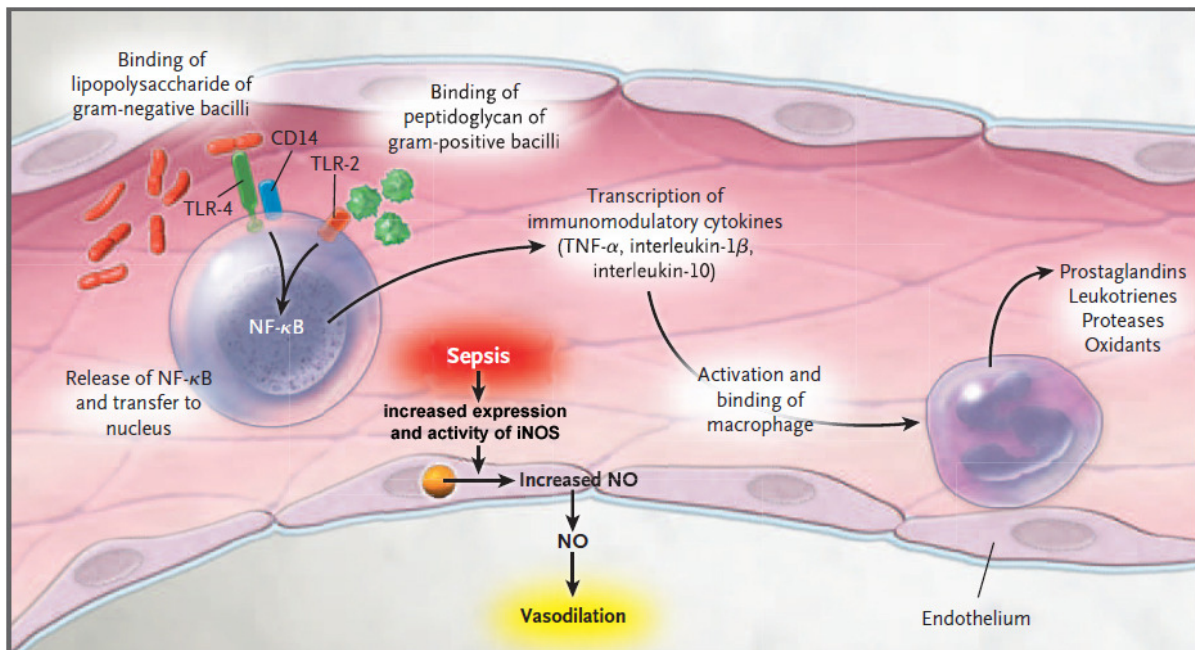


Abb. A.6. Zentrale Aktivierungskaskade einer Sepsis, modifiziert nach Russell, 2006. Lipopolysaccharide von gram-negativen Keimen binden an den Toll-Like Rezeptor (TLR) 4/CD14-Komplex und Peptidoglykane gram-positiver Keime an TLR 2. Dadurch wird NFκB aktiviert, der in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von Zytokinen wie TNFα, IL-1β und IL-10 initiiert. Hierdurch kommt es überwiegend zu proinflammatorischen Prozessen und weiteren Transkriptionssteigerungen, wie zum Beispiel zur Induktion von iNOS und daraus resultierender massiver NO-Synthese, die Gefäß-dilatierend wirkt. Der weitere Mechanismus der NO-Kaskade ist im Text erläutert. Der Weg der Immunzellaktivierung ist in Russell, 2006 dargestellt.

A.7. Zyklische Nukleotide als „second messenger“

Das „second messenger“ System der purinergen zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP ist seit Jahren in vielen physiologischen und pathophysiologischen Gebieten wissenschaftlich belegt und etabliert (Taylor et al., 2008, Kots et al., 2009, Hofmann et al., 2006). In den vorangegangenen einleitenden Kapiteln wurde darauf in manchen Bereichen detailliert eingegangen. Grundlegend gibt es im Säugerorganismus diverse Zyklasten (AC-Familie, sGC, pGC), die nach Stimulation aus ATP oder GTP die korrespondierenden zyklischen Nukleotide synthetisieren, welche verschiedene Zielstrukturen wie Kinasen, Kanäle, Transporter oder Phosphodiesterasen (PDEs) ansteuern. Daraus resultieren diverse physiologische Effekte. PDEs bauen zyklische Nukleotide ab und regulieren somit deren intrazelluläre Konzentrationen. Einerseits ist dies über PDEs möglich, die für bestimmte zyklische Nukleotide spezifisch sind (z.B. PDE 5 für cGMP), andererseits können sich die Wege von cAMP und cGMP auch gegenseitig beeinflussen, entweder durch unspezifische PDEs oder durch Hemmung einer PDE durch das eine zyklische Nukleotid, wodurch eine Anreicherung des anderen zyklischen Nukleotids erreicht wird, und umgekehrt (Francis et al., 2009, Bender and Beavo, 2006). Bisher wurden 11 PDE-Familien beschrieben, von denen einige verschiedene Isoformen enthalten (Bender and Beavo, 2006).

Geht man von den in einem Organismus vorliegenden Nukleotiden ATP, GTP, CTP, TTP oder UTP aus, könnte man durchaus auf weitere zyklische Nukleotide schließen, für die sich ebenfalls ein „second messenger“ System postulieren ließe.

In der Tat wurde bereits in sehr frühen Jahren cCMP in Gewebe von Säugern beschrieben (Cech et al., 1977). Ebenso konnte in zahlreichen späteren Arbeiten Cytidylylzyklase-Aktivitäten in Geweben festgestellt werden (Muto et al., 1993, Newton et al., 1984 und Newton et al., 1990), wobei die Identifizierung des cCMP-generierenden Systems bis heute nicht erfolgte. In den 1980er Jahren konnten diverse Arbeitsgruppen PDEs identifizieren, die cCMP hydrolysieren (Helfman et al., 1981, Helfman et al., 1982, Helfman et al., 1984, Worby et al., 1991). Diese PDEs konnten aber bis heute nicht identifiziert werden. Weiterhin beschrieben einige Arbeitsgruppen Effekte von cCMP auf Tumorzellwachstum (Bloch et al., 1974) oder eine Inhibierung der Spermienmotilität (Chan et al., 1990). Auf molekularer Ebene konnte eine Hemmung der DNA- (Chambers et al., 1974) und RNA-Synthese (Pisarev et al., 1977) nachgewiesen werden. Kürzlich wurden Proteine massenspektrometrisch analysiert, die spezifisch durch cCMP-Stimulation im Maus-Gesamthirnlisat phosphoryliert wurden (Ding et al., 2008).

Bislang fehlen jedoch einschlägige Studien über die physiologische Rolle von cCMP, wie sie von cAMP und cGMP bekannt sind.

A.8. Ziele dieser Arbeit

NO/cGMP-Zielstrukturen werden heute bereits durch zahlreiche Arzneistoffe moduliert, wodurch verschiedener Erkrankungen, wie Angina Pectoris, erektile Dysfunktion oder pulmonale arterielle Hypertonie therapiert werden können. Einer der zentralen Effektoren für cGMP, die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cG-Kinasen) sind für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Effekte verantwortlich. Da cG-Kinasen nahezu ubiquitär exprimiert werden, bieten diese einen potentiellen Angriffspunkt zur Behandlung von weiteren Erkrankungen. Daher lag es nahe, dieses System weiterführend zu analysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion des cGKI Substrates IRAG anhand der IRAG-defizienten Maus genauer charakterisiert werden. Da IRAG überwiegend in glatten Muskelzellen des kardiovaskulären und gastrointestinalen Systems exprimiert wird, wurden myographische Experimente mit glattem Muskelgewebe durchgeführt. Hierfür wurde das Verhalten von vorkontrahiertem Gewebe auf Substanzen getestet, die direkt oder indirekt cGKI aktivieren. Darüber hinaus erfolgte eine Expressionsanalyse diverser cGKI-Substrate per Immunoblot.

Weiterhin sollte mittels invasiver, radiotelemetrischer Blutdruckanalyse die Rolle von IRAG in der Blutdruckregulation *in vivo* getestet werden. Dies wurde unter

physiologischen und pathophysiologischen (LPS-induzierter, septischer Zustand) Gesichtspunkten durchgeführt.

cAMP und cGMP sind seit langem etablierte „second messenger“, die zahlreiche (patho)physiologische Funktionen vermitteln. Vor einigen Jahren wurde auch die Existenz von cCMP beschrieben, die kürzlich durch erheblich sensitivere Methoden erneut bestätigt werden konnte. Für cCMP sollte deshalb ein Effektor und somit eine potentielle „second messenger“ Funktion anhand heterolog in Sf9-Zellen exprimierter und aufgereinigter cG-Kinasen sowie mit verschiedenen Mauslinien untersucht werden.

B. Material und Methoden

B.1. Materialien

B.1.1. Geräte

Tab. B.1.: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung / Hersteller
Absaugvorrichtung	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, D
Autoklaven	2540MK, Tuttnauer, Jerusalem, IL Varioklav H+P, Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
β-Zähler	Tri Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyser, Perkin Elmer, Rodgau, D
Blotting-Apparatur	Semi-Dry-Elektroblotter, VWR International, Darmstadt, D
Chirurgische Instrumente	FST, Bad Oeynhausen, D
Dounce-Homogenisator	10 ml, 20 ml, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, D
Elektrophorese-kammern	Compact XS/S und M, Biometra GmbH, Göttingen, D Mini Protean Tetracell, Biorad, München, D
Elektroporator	GenePulser™ XCell / Puls Controller, Biorad, München, D
Geltrockner	Gel Dryer GD4534, Scie-Plas Ltd., Cambridge, UK
HPLC-System	Pumpe: LC 10 AS, Shimadzu, Duisburg, D Autosampler: SIL-10A, Shimadzu, Duisburg, D Steuer-/Integrationssoftware: ClassLC10, Shimadzu, Duisburg, D Säulenofen: ERC 125, ERC, Riemerling, D Detektor: Shimadzu SPD 10A, 260 nm, Shimadzu, Duisburg, D
Inkubatoren	C24KC, New Brunswick, Eppendorf, Wesseling, D Excella E24, New Brunswick, Eppendorf, Wesseling, D Innova® 43, New Brunswick, Eppendorf, Wesseling, D
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3, Dragerwerk AG, Lübeck, D / FMI, Seeheim, D
Kaltlichtquellen	KL 1500 LCD, Zeiss, Jena, D
Kreisschüttler	IK®KS 260 Basic, IKA Werke, Staufen, D Rotamax 120, Heidolph Instruments, Schwabach, D
Light-Cycler 2.0	Roche, Mannheim, D
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments, Schwabach, D
Mikrowelle	Micromaxx, Medion, Essen, D

Myograph	Multi Wire Myograph System Model 610M, DMT, Aarhus, DK 8/30 Powerlab (D/A-Wandler), AD Instruments, Spechbach, D
PCR-Gerät	Biometra T1 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, D
Peristaltikpumpe	ISM843C, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim, D
pH-Meter	pH 526, WTW, Weilheim, D
Photoentwickler	Cawomat 2000 IR, Cawo, Schrobenuhausen, D
Photometer	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, D Nova Spa LKB, Biochrom, Berlin, D Tecan Sunrise Plattenleser, Tecan, Crailsheim, D
Pipettierhilfen	Swifpet, Abimed GmbH, Langenfeld, D
Reagenzglas-Rotator	Sarstedt M 2000, Sarstedt, Nümbrecht, D
Sequenzierautomat	ABI Prism™ Sequence Analyser, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Stereo-Mikroskope	Olympus CK2, Olympus, Hamburg, D (Zellkultur) Stemi 2000-C, Zeiss, Jena, D (Gewebe-Präparationen) Stemi DV-4 Spot, Zeiss, Jena, D (chirurgische Eingriffe)
Sterilbank	S@felow 1.2, BioAir, Nunc GmbH, Langenselbold, D
Stromquellen	Power Pac 200, Biorad, München, D PS305T, Biometra GmbH, Göttingen, D
Telemetrie-System	Data Sciences International (DSI), St. Paul, US
Thermomixer	Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, D
Ultra-Turrax	IKA Werke, Staufen, D
UV-Beleuchtungen	TI1 BDA Digital, Biometra GmbH, Göttingen, D Transilluminator, Ultra Violet Products, Cambridge, UK
Vortexer	VWR International, Darmstadt, D
Waagen	Sartorius BP211 D (Analysenwaage), Sartorius, Göttingen, D Sartorius Extend (Feinwaage), Sartorius, Göttingen, D
Wärmeschränke	T6P, Haereus, Langenselbold, D IPP200, Memmert, Schwabach, D
Wärmesysteme für chirurgische Eingriffe	T/Pump, Gaymar Industries Inc., New York, US TP22G T / PAD®, Gaymar Industries Inc., New York, US
Wasserbad	VWR Mod 1112A, VWR International, Darmstadt, D
Zählkammer für Zellen	Neubauer Zählkammer, Superior, Marienfeld, D
Zentrifugen	Haereus Multifuge 1L-R und 3L-R, Osteode, D Jouan G24i Centrifuge, Thermo Scientific, Karlsruhe, D Tischzentrifuge Centrifuge & Vortex, Neolab, Heidelberg, D

Zentrifugen (Fortsetzung)	Tischzentrifuge, Sarstedt, Nümbrecht, D Centrifuge 5418 und 5417R, Eppendorf, Hamburg, D Sorvall Super T21, Thermo Scientific, Karlsruhe, D
------------------------------	---

B.1.2. Verbrauchsmaterialien und Kits

Tab. B.2.: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Kits

Produkt	Bezeichnung / Hersteller
BD Baculo Gold TM Transfection Kit	BD, Heidelberg, D
Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Einmalhandschuhe, Latex	Semperit Technische Produkte, Wien, AUT
Falcon-Gefäße	15 ml, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterpapier	GB001 Gel Blotting Papier, Whatman, Düssel, D
Kanülen	0.4 x 19 mm, BD, Heidelberg, D 0.7 x 30 mm, BD, Heidelberg, D 0.9 x 40 mm, BD, Heidelberg, D
Kryo-Gefäße	Nunc GmbH, Langenselbold, D
Küvetten, Polystyrol Küvetten für Elektroporation	Sarstedt, Nümbrecht, D Peqlab, Erlangen, D
Nahtmaterial	Permahand Seide 7/0 G-6 (steril) Ethicon, J&J, Neuss, D Resorba Seide 7/0, 0.5 metric, Resorba, Nürnberg, D
Nistmaterial	Nestlets, Emsicon, Forstinning, D
OP-Masken	Sentinex Ultra, Lohmann + Rauscher, Neuwied, D
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH, Wertheim, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Phosphocellulosepapier	P81, Whatman, Düssel, D
Photofilme	Amersham Hyperfilm TM ECL, GE Healthcare, München, D
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, D
Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden, D
Plasmid Miniprep Kit	Peqlab, Erlangen, D
PVDF-Membran	Immobilon, Millipore GmbH, Schwalbach, D
QuiaQuick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, D
Reagiergefäße	1.5 ml, 2.0 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
RNeasy mini Kit	Quiagen, Hilden, D

Serologische Pipetten	10 ml, 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpelle	Feather, Nr. 11, Feather Safety Razor, Osaka, JP
Spritzen	1, 2 und 5 ml, BD Plastipak, BD, Heidelberg, D
Tupfer, steril	Medtronic Merocel [®] , Technomed, Beasweiler, D
Ultrafiltrationsgefäße	Vivaspin 20, MWCO 30000, Sartorius, Göttingen, D
Zellkultur-Flaschen	Tissue Culture Flask 25, 75 cm ² , Sarstedt, Nümbrecht, D

B.1.3. Chemikalien und Arzneistoffe

Produkt	Hersteller
8-Br-cGMP	Biolog Life Science, Bremen, D
Acrylamid / Bisacrylamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Agar	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Saekem LE, Biozym, Oldendorf, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
ANP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
APS	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bepanthen Augensalbe	Bayer Healthcare, Leverkusen, D
Brilliant Blue R (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bt ₂ -cAMP	Biolog Life Science, Bremen, D
Bt ₂ -cCMP	Biolog Life Science, Bremen, D
Bt ₂ -cGMP	Biolog Life Science, Bremen, D
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Carbachol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Carbogen (95 % O ₂ / 5 % CO ₂)	Linde AG, München, D
Cremophor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DEA-NO	Axxora GmbH, Lörrach, D
DETA-NO	Axxora GmbH, Lörrach, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DNA Loading Dye, 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
EGTA	Merck, Darmstadt, D
Entwickler / Fixierer	Ernst Christian GmbH, Planegg, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D

Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
GeneRuler™, 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
GeneRuler™, 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Gentamicinsulfat	Bio Whittaker®, Lonza, Köln, D
Glucose, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycerol, 87 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Natrium, 25.000	Ratiopharm, Ulm, D
HEPES	Merck, Darmstadt, D
IBMX	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Insect XPress Medium	Lonza, Wuppertal, D
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Kodan Spray	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
LB	Fisher Biotech, New Jersey, US
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
L-NAME	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
MES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
MgSO ₄	Merck, Darmstadt, D
MnCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
MOPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na-Butyrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NaCl	VWR International, Darmstadt, D
NaCl, 0.9 %	Braun, Melsungen, D
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, D
NaN ₃	Merck, Darmstadt, D
Nifedipin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

O ₂ , 100 %	Linde AG, München, D
ODQ	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein Ladder (SM0669 / 0671)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
RbCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
SNP	Merck, Darmstadt, D
Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint®)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tributyrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris	USB Corporation, Cleveland, US
Trypton	BD, New Jersey, US
Tween-20	Merck, Darmstadt, D
YC-1	Axxora GmbH, Lörrach, D
Yeast Extract	BD, New Jersey, US
Zaprinast	A.G. Scientific, San Diego, US
ε-Aminohexansäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

B.2. Versuchstiere

Alle verwendeten Tiere stammten aus dem Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) der Universität Regensburg, beziehungsweise aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München und wurden selbst gezüchtet. Maximal 5 adulte Tiere wurden in Makrolon Typ II Käfigen, maximal 12 adulte Tiere oder 2 Weibchen mit Würfen in Typ III Käfigen gehalten. Als Einstreu dienten autoklavierte Späne, die bei Bedarf noch mit Nistmaterial („Nestlets“) ergänzt wurden. Die Wasserversorgung und Fütterung erfolgte ad libitum. Zur Zucht wurden jeweils zwei mindestens 12 Wochen alte Weibchen mit einem zuchtfähigen Männchen (ab 8 Wochen) verpaart. Durch Heterozygoten-Verpaarung erhielt man genetisch veränderte Versuchstiere und entsprechende Kontrolltiere (Wildtyp-Mäuse), die für die Versuchszwecke in der Regel ein Alter von 12 bis 25 Wochen hatten. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte mittels PCR aus Schwanzbiopsien; vier Wochen nach Geburt wurden die jungen Tiere abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Für jedes Experiment wurden Geschwister oder altersgleiche Tiere beiderlei Geschlechts verwendet. Für telemetrische Blutdruckmessungen wurde jeweils nur ein Geschlecht verwendet. Im Detail wurden folgende Mauslinien für die Experimente eingesetzt:

- IRAG^{Δ12/Δ12}-Mutante (die Deletion von Exon 12, das für 47 Aminosäuren der Coiled-coil Domäne codiert, resultiert im Interaktionsverlust von IRAG mit dem IP₃ Rezeptor Typ I und damit in einem ca. 5 kDa verkürzten Protein).
- IRAG^{-/-}-Linie (IRAG-Gen komplett ausgeschaltet).
- cGKI^{-/-}-Linie (ubiquitäres Fehlen von cGKIα und cGKIβ).
- SMIα-rescue-Linie (cGKI^{-/-} mit glattemuskelspezifischer (SM22α-Promotor) cGKIα-Überexpression (= „rescue“)).
- IRAG^{-/-}/SMIβ-tg-Linie (IRAG^{-/-}/cGKI^{+/+} mit glattemuskelspezifischer (SM22α Promotor) cGKIβ-Überexpression (= „tg“)).

Sämtliche Linien sind auf dem genetischen Hintergrund 129/Sv gezüchtet. Alle Tierversuche wurden entsprechend den deutschen Tierschutzbestimmungen/FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) durchgeführt.

B.3. Erstellung einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Um für die IRAG^{-/-}-Tiere die mittlere Überlebensrate zu bestimmen, wurde eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier erstellt. Dazu wurden jeweils 24 Wildtyp und IRAG^{-/-}-Tiere ab Geburt über einen Zeitraum von 50 Wochen beobachtet und gegebenenfalls das Datum des natürlichen Exitus festgestellt. Unter Verwendung von Graph Pad Prism 5 wurde daraus eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellt.

B.4. Kraftmessung am glatten Muskel

Zur Kraftmessung von thorakalen Aortenringen oder Stücken aus Colon und Jejunum wurde ein isometrischer Kraftabnehmer (Myograph601, Danish Myograph Systems) mit Organbad und ein digitales Datenerfassungssystem (Labchart 6.5, ADInstruments GmbH, Spechbach) verwendet. Aufgrund des isometrischen Aufbaus der Apparatur können sich die Gewebestücke im Durchmesser beziehungsweise in der Länge nicht verändern, so dass bei entsprechender Stimulation Kraftänderungen detektiert werden können.

B.4.1. Isolierung von thorakaler Aorta, Colon und Jejunum

Die Versuchstiere wurden durch transzervikale Dislokation euthanasiert und der Thorax beziehungsweise das Abdomen unmittelbar eröffnet. Das distale Colon wurde herausgenommen, in eine mit Tyrode (B.4.3.) gefüllten Petrischale überführt und von enthaltenen Faecesresten durch Spülen mit Tyrodepuffer (2 ml Spritze, aufgesetzte 200 µl

Pipettenspitze) befreit. Anhaftendes Binde- und Fettgewebe wurde mit einer Augenschere entfernt. Das präparierte Colonstück wurde in vier gleichgroße Teile (ca. 8 mm) geschnitten, an beiden Enden mit Bindfaden fixiert und mittels geknoteter Schlingen in das mit 5 ml Tyrode befüllte Organbad montiert (37°C, mit Carbogen begast (95 % O₂/5 % CO₂). Die Präparation von Jejunum (Mittelstück) erfolgte analog der des Colons.

Thorakale Aorta wurde vorsichtig unter Zugvermeidung herauspräpariert und geronnenes Blut in einer mit Tyrode gefüllten Petrischale herausgespült (2 ml Spritze, 0.4 x 19mm Kanüle). Unter dem Mikroskop wurde anhaftendes Binde- und Fettgewebe mit einer Augenschere vorsichtig entfernt und je nach Versuchsanordnung das Endothel intakt gelassen oder zerstört (Durchblasen von Luft mittels Kanüle und Spritze und Aufziehen und Reiben des Gefäßes auf einer 0.4 x 19 mm Kanüle). Im Anschluss wurde das Aortenstück in vier gleich lange Segmente (ca. 3 mm) geteilt und in das Organbad montiert (5 ml Tyrode, 37°C, Carbogen-begast). Die durch Hormone (bzw. Hormon-ähnliche Substanzen) hervorgerufene Kontraktionskraft ist von der Vorspannung abhängig. Die Glattmuskelstücke wurden deshalb entsprechend vorgedehnt (und bei Bedarf nachreguliert; 8 mN bei Colon und Jejunum; 2 mN bei Aorta) und äquilibriert.

B.4.2. Versuchsdurchführung mit Colon / Jejunum

Die äquilibrierten Colon-/Jejunumstücke wurden mit dem Parasympathomimetikum Carbachol (10 µM) kontrahiert und nach Einstellung eines gleich bleibenden Tonus („Steady State“, entspricht 100 %) mit dem membranpermeablen cGMP Analogon 8-Br-cGMP (300 µM) beziehungsweise mit DEA-NO (30 µM, kurzwirksamer NO-Donor, HWZ (37°C): ca. 2 min) relaxiert, bis sich wieder ein stabiler Tonus eingestellt hat. Zur Totalrelaxation und zur Bestimmung des Nullpunktes wurde der unspezifische Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (100 µM) zugegeben. Am Ende des Versuchs wurden die Gewebestücke herausgenommen, die Bindfäden entfernt und das Feuchtgewicht in mg bestimmt. Dadurch war eine Berechnung der Kraftänderung bezogen auf die Masse des Gewebes möglich.

B.4.3. Versuchsdurchführung mit *Aorta thoracalis*

Nach der Äquilibrierungsphase (ca. 90 min) wurden die Aortenringe mit dem α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (3 µM beziehungsweise 1 µM) oder durch 85 mM extrazelluläres Kalium (K85) kontrahiert. Nach Einstellung eines konstanten Tonus (entspricht 100 %) wurde je nach Versuchsanordnung mit 8-Br-cGMP (300 µM), Acetylcholin (1 µM), DEA-NO (100 nM), ANP (500 pM), Bt₂-cCMP (300 µM), Bt₂-cGMP

(300 μM) oder $\text{Bt}_2\text{-cAMP}$ (300 μM) relaxiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von IBMX (100 μM) zur Totalrelaxation und zur Bestimmung des Nullpunktes. Nach Versuchsende wurden die Aortenringe entnommen und deren Länge bestimmt. In Folge dessen konnte die Kraftänderung bezogen auf die Gewebelänge bestimmt werden. Die Versuchsmodifikationen zur Bestimmung des Effekts von cCMP im glatten Muskel sind aufgrund der Komplexität und Übersichtlichkeit jeweils bei den entsprechenden Versuchen angegeben.

Puffer:

CO₂-Tyrode,	pH 7.4 (in mM)	Kalium-Tyrode,	pH 7.4 (in mM)
NaCl	137.00	NaCl	57.00
KCl	5.40	KCl	85.00
CaCl ₂ x H ₂ O	1.80	CaCl ₂ x H ₂ O	1.80
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1.00	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1.00
NaHCO ₃	12.00	NaHCO ₃	12.00
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0.42	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0.42
D-(+)-Glucose	5.60	D-(+)-Glucose	5.60

Tab. B.3.: Verwendete Aktivatoren und Inhibitoren (Myographie)

Substanz	Konzentration Stammlösung	gelöst in	Lagerung °C	Funktion
ANP	1 und 10 μM	H ₂ O	- 20	pGC-Aktivator
8-Br-cGMP	100 mM	H ₂ O	- 20	cGK-Aktivator
$\text{Bt}_2\text{-cAMP}$	100 mM	H ₂ O	- 20	cAK-Aktivator
$\text{Bt}_2\text{-cCMP}$	10 mM	H ₂ O	- 20	cNK-Aktivator
$\text{Bt}_2\text{-cGMP}$	100 mM	H ₂ O	- 20	cGK-Aktivator
Carbachol	10 mM	H ₂ O	+ 4	Parasympathomimetikum
DEA-NO	10 mM	NaOH (10 mM)	- 20	NO-Donor
IBMX	100 mM	DMSO	- 20	unspez. PDE-Inhibitor
L-NAME	100 mM	H ₂ O	- 20	eNOS-Inhibitor
Na-Butyrat	100 mM	H ₂ O	- 20	Butyrat-Donor
Nifedipin	10 mM	DMSO	- 20	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal-Inhibitor
ODQ	25 mM	DMSO	- 20	sGC-Inhibitor
Phenylephrin	1 mM	H ₂ O	+ 4	Sympathomimetikum
Tributyrin	500 mM	DMSO	- 20	lipophiler Butyrat-Donor
Zaprinast	5 mM	DMSO	- 20	PDE5-Inhibitor

B.4.4. Versuchsauswertung

Die Versuchsaufzeichnungen und Graphen wurden mit Origin 8.1 ausgewertet und erstellt, die Statistiken und Balkendiagramme mit Graph Pad Prism 5 konstruiert. Bei den Aortenringen wurde auf Kraft pro Längeneinheit [N/m] und bei den Colonstücken auf Kraft pro Masseinheit [N/g] umgerechnet.

B.5. Invasive, radiotelemetrische Blutdruckbestimmung

Um die physiologischen Funktionen des IRAG-Proteins zu untersuchen, wurden invasive, radiotelemetrische Blutdruckbestimmungen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils vier männliche Wildtyp- und IRAG^{-/-}-Tiere gleichen Alters (10-15 Wochen) verwendet. Die Tiere wurden auf einer desinfizierten, auf 37°C beheizten Unterlage mit einem Gemisch aus 1.75 bis 2.00 Vol. % Isofluran und 100 % O₂ narkotisiert und fixiert. Um eine Austrocknung der Augen während des operativen Eingriffs zu vermeiden, wurden diese mit Bepanthen® Augen und Nasensalbe abgedeckt. Nach Rasur mit Skalpell (No.11) und Desinfektion der Haut wurde die *Arteria carotis communis sinistra* (zwischen *Musculus sternohyoideus* und *M. sternomastoideus*) durch vorsichtiges Teilen der beiden Hälften der *Glandula mandibularis* stumpf frei präpariert, wobei der *Nervus vagus* so weit wie möglich geschont wurde.

Die *C. communis* wurde kaudal zur Bifurkation irreversibel mit 7/0 Seide ligiert, ca. 0.75 bis 1.00 cm proximal zur ersten Ligation erfolgte eine zweite, reversible Ligation unter Verwendung von 7/0 Seide und einer Bulldog-Klemme. Mittels einer sterilen, an der Spitze um 90° gewinkelten 0.4 x 19 mm Kanüle wurde der vom Blutstrom abgetrennte Gefäßabschnitt geöffnet und der Katheter des Transmitters (DataSciences Int., Frankfurt, Modell TA11PA-C10) eingeführt und mit 7/0 Seide dreimal am Gefäß fixiert. Der Transmitter wurde in einer seitlich geschaffenen Tasche (gefüllt mit 1 ml steriler, isotoner NaCl-Lösung zur Reibungsverminderung und Volumensubstitution) subkutan platziert, die *G. mandibularis* an ihre ursprüngliche Position gebracht, die Operationswunde mit 7/0 Seide vernäht und mit steriler, isotoner NaCl-Lösung gereinigt. Im Anschluss wurden die Tiere aufgeweckt und im wachen Zustand einzeln in Käfige mit autoklaviertem Einstreu gesetzt. Eine postoperative Analgesie war nicht erforderlich und erfolgte daher nicht. Nach einer Regenerationsphase von sieben Tagen wurden die implantierten Transmitter mittels Magnetinduktion eingeschaltet und die Nager im Käfig auf eine Empfängerplatte gestellt. Der mittlere arterielle Blutdruck, die Aktivität, der Pulsdruck und die Herzfrequenz konnten so am lebenden, sich frei bewegenden Tier kontinuierlich in der Tag- und Nachtphase (jeweils 12 Stunden) aufgezeichnet werden. Die Lichtphase dauerte von 7 Uhr bis 19 Uhr und die Dunkelphase von 19 Uhr bis 7 Uhr. Die Daten wurden mittels

Dataquest ART 4.1 (DataSciences Int.) aufgezeichnet und mit Origin 7.1 und Graph Pad Prism 5 ausgewertet.

Hydrophile Substanzen wurden in steriler, isotoner NaCl-Lösung, lipophile Substanzen unter Zusatz von 10 Vol. % Cremophor® zu steriler, isotoner NaCl-Lösung gelöst und als Bolus abhängig vom Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Als NO-Donoren wurden das kurzwirksame SNP und das länger wirksame DETA-NO verwendet. Zur (von NO unabhängigen) direkten Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase wurde YC-1 verwendet. Zur Induktion einer schweren Sepsis (septischer Schock) wurden *E.coli* Lipopolysaccharide injiziert.

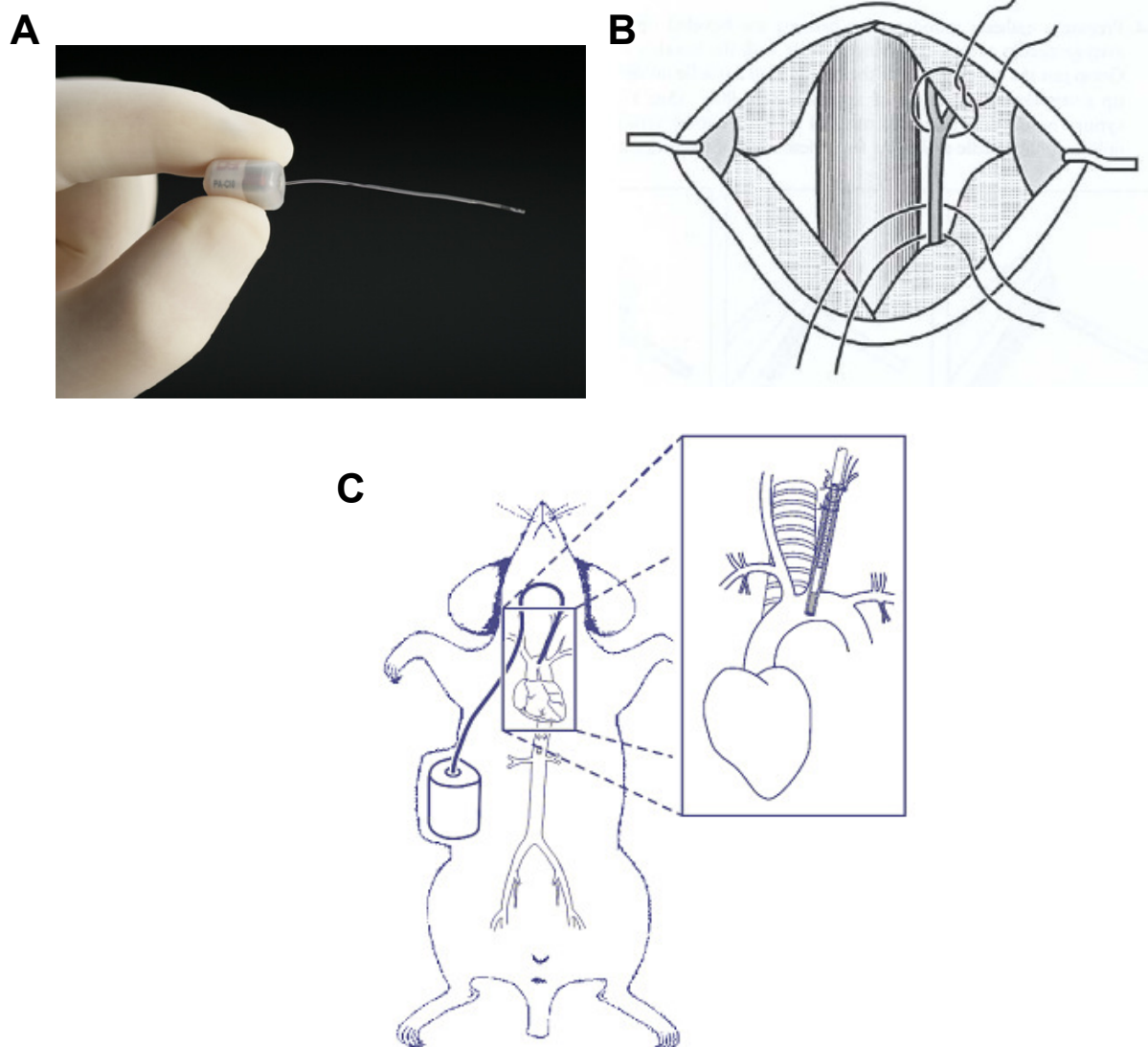


Abb. B.1. Implantation eines Radiotransmitters. (A) Transmitter TA11PA-C10 (DSI) mit einem 5 cm Katheter. **(B)** schematische Darstellung der Ligationsstellen der *A. carotis communis sinistra*. **(C)** schematische Gesamtübersicht über die subkutane Lage des Transmitters nach der Operation und vergrößert dargestellt die Lage der fixierten Katheterspitze im Aortenbogen (nach DSI, St. Paul, US).

Verwendete Substanzen und Dosierungen zur i.p. Applikation:

SNP	2 mg/kg KG
DETA-NO	60 mg/kg KG
YC-1	10 mg/kg KG
<i>E.coli</i> LPS	10 mg/kg KG

B.6. Retrograde Perfusion von narkotisierten Tieren

Um verschieden Organe für eine RNA-Isolierung zu entnehmen und dabei eine Kontamination mit Blutzellen und anderen Bestandteilen zu vermeiden, wurden die Tiere retrograd perfundiert. Nach Inhalationsanästhesie mit 2.5 Vol. % Isofluran und 100 % Sauerstoff wurde das Abdomen der Versuchstiere eröffnet und die Bauchaorta freigelegt. Kaudal zu den Abgängen der *Arteriae renales* erfolgte eine reversible Ligation mit einer Klemme. Distal zur Klemme wurde ein Perfusionskatheter retrograd eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Um ein Abfließen des Perfusats zu ermöglichen, wurde die *Vena cava inferior* mit einem Schnitt geöffnet. Die rostral gelegene Aortenklammer wurde entfernt und über den Katheter 25 ml Spüllösung (isotone NaCl-Lösung mit 10 I.E./ml Heparin) infundiert. Die Perfusion erfolgte mit einer Flussrate von 15 ml/min unter Verwendung einer Peristaltikpumpe. Die Organe wurden unmittelbar danach entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung (B.9.1. und B.10.1.) aufbewahrt.

B.7. Organismen und Plasmide

In den nachfolgenden Tabellen sind sämtliche verwendete Organismen und Plasmide mit allen relevanten Eigenschaften und ihrer Herkunft verzeichnet. Die Abkürzungen für Genotyp und Phänotyp entsprechend der Nomenklatur von Bachmann et al., 1980.

Tab. B.4.: Verwendete Organismen

Organismus	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP10	<i>F'mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ΦlacZ ΔM15X74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Stratagene
Sf9 <i>Spodoptera Frugiperda</i>	siehe B.8.2. und B.9.11.	Geschenk von Prof. Dr. Seifert

Tab. B.5.: Verwendete Plasmide / Virus-DNA

Plasmid	Eigenschaften	Verwendung	Selektionsmarker	Referenz
pBS II KS+	PBluescript mit T3/T7pro-MCS	Vorlage cDNA cGKI α und cGKI β , Klonierungsvektor	Amp ^R	Stratagene
pcDNA3.1(-)	pcDNA3.1(-)-backbone	Umklonierung für potentielle COS-7-Zelltransfektion	Amp ^R	Invitrogen
pVL-1393	cDNA-Transfervektor für	Hilfsvektor für Baculovirus-Generierung	Amp ^R	Orbigene
pCR Blunt	linearisierter Vektor mit „Blunt“-Enden	Subklonierung von PCR-Produkten	Kan ^R	Invitrogen
BD Baculo Gold™ DNA	linearisierte Baculovirus-DNA mit letaler Deletion	Generierung eines intakten Virus mit pVL-1393 Plasmid	---	BD Biosciences

B.8. Anzucht und Stammhaltung

B.8.1. Escherichia coli

B.8.1.1. Nährmedium

Um *E.coli* auf Agarplatten oder in Suspensionskultur zu halten, wurde steriles (20 min, 121°C, 1 bar) Lysogeny Broth (LB)-Vollmedium verwendet. Temperaturempfindliche Zusätze wurden steril filtriert und nach Abkühlen des Mediums auf 50°C (Festmedium) oder vor Inokulation (Flüssigmedium) zugesetzt.

Um Festmedium herzustellen, wurden 16 g Agar pro Liter LB-Medium zugesetzt, autoklaviert und in Petrischalen ausgegossen.

LB-Medium, pH 7.4:

Trypton	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
NaCl	10.0 g
H ₂ O _{dest}	ad 1.0 l

SOB-Medium, pH 7.0¹

Trypton	20.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
NaCl	0.5 g
KCl	2.5 mM
H ₂ O	ad 990 ml

¹ Vor Gebrauch: Zugabe von 10 ml einer sterilen Mg²⁺-Lösung (1 M MgCl₂ + 1 M MgSO₄).

SOC Medium, pH 7.0: SOB-Medium (Super Optimal Broth) + 20 mM Glucose

B.8.1.2. Antibiotika (als Nährmediumzusatz)

Tab. B.6.: Antibiotika als Nährmediumzusätze

Hemmstoff	Abkürzung	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Amp	100 mg/ml in EtOH (50 %)	100 µg/ml
Kanamycin	Kan	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	50 µg/ml

B.8.1.3. Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in LB-Medium. Flüssigkulturen wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen oder Erlenmeyerkolben angezogen, die bei 37°C und 200 - 250 rpm inkubiert wurden. Zum Überimpfen dienten Einzelkolonien, die von den entsprechenden Agarplatten mit Impfösen abgenommen wurden. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen ca. 1:1000 beimpft. Auf Agarplatten können *E.coli* Stämme ca. 4 Wochen bei 4°C unter Selektionsdruck gehalten werden. Dazu wurden Einzelkolonien ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C aufbewahrt. Ausgehend von diesen Kulturen wurden 50 %ige Glycerolkulturen angelegt, die bei -80°C über mehrere Jahre stabil gelagert werden können.

B.8.1.4. Transformation von *E.coli*

Eine Einschleusung von (Fremd)-Plasmid-DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Dazu ist es nötig, kompetente Zellen zu verwenden, die in der Lage sind, exogene DNA aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Transformations-techniken angewandt:

Zum einen die Elektroporation, bei der durch einen kurzen Hochspannungsimpuls eine lokale Perforation der Zellhülle erreicht wird, die eine Transformation von Plasmid-DNA in die Zelle ermöglicht.

Zum anderen die chemische (Hitzeschock) Transformation, bei der mit CaCl₂ oder RbCl vorbehandelte Zellen (vermindert die Abstoßung von negativ geladener DNA und negativ geladener Zellmembran) einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt werden. Durch die resultierende Porenbildung kann ebenfalls Plasmid-DNA in die Zellen eingeschleust werden.

B.8.1.5. Herstellung von elektrokompetenten Zellen (Hanahan, 1983)

Alle notwendigen Lösungen und Puffer wurden autoklaviert. LB-Medium wurde mit einer *E.coli* Übernachtskultur (XL1-Blue) 1:1000 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.7

(logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und anschließend mit eiskalter, 10 %iger Glycerollösung gewaschen. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen 1:1 in 10 % Glycerol resuspendiert und zu 60 µl Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden jeweils 10 min mit 4000 x g bei 4°C zentrifugiert.

B.8.1.6. Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen (Hanahan, 1983)

Alle notwendigen Lösungen und Puffer wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. SOB-Medium wurde mit einer *E.coli* Übernachtskultur (TOP 10) 1:1000 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.7 inkubiert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt und 15 min bei 4°C, 4000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Mediums wurde das Pellet in Rf1-Puffer suspendiert, 1 h auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Abschließend erfolgte eine Aufnahme des Pellets in Rf2-Puffer. 0.1 ml Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

Rf1-Puffer, pH 5.8 (mit Essigsäure eingestellt):

1 M K ⁺ -acetat (pH 7.5)	30 ml
CaCl ₂	1.5 g
MnCl ₂	9.9 g
RbCl	12.0 g
Glycerol	15 % (w/v)
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

Rf2-Puffer, pH 6.8 (mit Essigsäure eingestellt):

0.5 M MOPS (pH 6.8)	20 ml
CaCl ₂	11.0 g
RbCl	1.2 g
Glycerol	15 % (w/v)
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

B.8.1.7. Durchführung der Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und entweder direkt mit dem Ligationsansatz (B.9.6.3.) oder mit ca. 10 ng Plasmid DNS (aus Miniprep oder Maxiprep (B.9.2.)) mit einer Pipette vorsichtig gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine gekühlten Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser™ XCell und Puls Controller von BioRad mit folgenden Parametern:

Spannung 2.5 kV; Kapazität 25 μ F; Widerstand 200 Ω ; durchschnittliche Zeitkonstante 4.5 ms. Nach der Transformation wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und zur phänotypischen Expression für 60 min bei 37°C ohne Selektionsdruck geschüttelt. Anschließend wurden ca. 100 μ l der Bakteriensuspension auf selektive LB-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidisolierung und entsprechender Restriktionsanalyse (B.9.6.1.) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

B.8.1.8. Durchführung der Hitzeschock-Transformation

Die kompetenten TOP 10 Zellen wurden in der Hand angetaut, auf Eis gestellt und nach ca. 10 min mit 2-10 ng Plasmid versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Zellen für 1 min auf 42°C erhitzt und sofort wieder für 3 min auf Eis gestellt, anschließend mit 900 μ l SOC-Medium versetzt. Zur phänotypischen Expression wurde 1 h bei 37°C ohne Selektionsdruck inkubiert (150 rpm) und ein Aliquot auf eine selektive LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B.8.2. Sf9-Zellen

Zur Expression von rekombinanten Enzymen (cG-Kinasen) wurde die *Lepidopteren*-Zelllinie Sf9 (ATCC-Nr: CRL 1711) verwendet. Die Sf9-Zelllinie ist ein Subklon der Linie IPLB-SF-21AE, die aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda* Larven (eine Nachtfalter-Art) isoliert wurde (Vaughn et al., 1977).

Die Zelllinie ist relativ einfach in Suspension oder als Monolayer zu ziehen und hat eine Verdopplungszeit von ca. 20 bis 35 h. Nach Infektion mit Baculoviren (B.9.11. und B.10.8.) exprimieren die Zellen in großen Mengen rekombinantes Protein.

B.8.2.1. Nährmedium und Mediumzusätze

Zur Expression und Kultivierung wurde serumfreies Insect Xpress™ Medium verwendet. Vor Gebrauch wurde 10 % fötales Kälberserum (FCS) und Gentamicin-Sulfat (finale Konzentration 100 μ g/ml) zugegeben und auf 28°C im Wasserbad vorgewärmt.

B.8.2.2. Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung der Insektenzellen erfolgte in Plastik- oder Glas-Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln (28°C, 150 rpm) ohne CO₂-Begasung. Alle 48 h wurden die Zellen gezählt (B.8.2.3.) und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und unter der Sterilbank in frischem Medium zu gewünschter Konzentration resuspendiert. Zur Generierung von

rekombinanten Baculoviren wurden die Zellen anfangs als Monolayer in Flaschen (25 cm²) gezogen.

B.8.2.3. Zählen von Insektenzellen

Zum Zählen der Insektenzellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden 50 µl Zellsuspension 1:10 mit PBS verdünnt, ein Aliquot in die Zählkammer gegeben und alle vier Quadrate ausgezählt. Ein Quadrat entspricht einem Volumen von 0.1 µl.

Die tatsächliche Zellkonzentration wurde wie folgt berechnet:

gezählte Zellen / 4 (Mittelwert) x 10 (Verdünnungsfaktor) x 10000 = Zellzahl/ml

B.9. Molekularbiologische Methoden

B.9.1. Isolierung von Total-RNA aus Mausgeweben

Die Gewinnung von Total-RNA erfolgte mit dem RNeasy mini kit von Quiagen nach Angaben des Herstellers. Alle benötigten Lysepuffer und Reagenzien sind in dem Kit enthalten. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die tiefgefrorenen Organe (B.6.) wurden mit dem Ultra-Turrax zerkleinert, Gewebszellen lysiert und vorhandenen RNAsen denaturiert. Das Lysat wurde anschließend mit Ethanol versetzt und durch eine auf Kieselgel basierende Säule zentrifugiert, wobei RNA an der Säulenmatrix adsorbiert. Nach Waschen und Verdau von DNA-Verunreinigungen unter Verwendung von DNase I wurde die RNA mit nukleasefreiem Wasser eluiert. Bei sämtlichen Vorgängen wurden Latexhandschuhe getragen, um eine Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden. Die Konzentration der RNA wurde nach B.9.5. bestimmt; eine kurz- oder langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C.

B.9.2. Gewinnung von Plasmid-DNA

Um qualitativ hochwertige und hochkonzentrierte Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen und anschließenden DNA-Aufreinigung durch Säulenchromatographie angewendet (Birnboim et al., 1979). Hierfür wurden die kommerziell erhältlichen Plasmid-Isolierungskits „Plasmid Miniprep Kit“ und „Plasmid Maxi Kit“ eingesetzt. Die dafür benötigten Puffer, Lösungen und Säulen waren in den jeweiligen Kits gebrauchsfertig enthalten. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Daraus gewonnene Plasmide konnten für präparative Zwecke wie Klonierung und Sequenzierung verwendet werden.

B.9.3. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Aufgrund des negativ geladenen „Backbones“ aus Zucker und Phosphat migrieren Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode, abhängig von Masse und Konformation (superhelikal, offenzirkulär und linear), und können daher aufgetrennt werden. Je größer ein Fragment ist, desto langsamer wandert es. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können nach der Auftrennung die im Gel enthaltenen Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als scharfe Banden sichtbar gemacht werden. Als Größenvergleich dienten verschiedene DNA-Standards (1 kb und 100 bp Ladder). Die DNA-haltigen Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x Ladepuffer versetzt. Dieser enthält zur Kontrolle der Auftrennung Bromphenolblau (läuft bei ca. 100 bp) und Xylencyanol (bei ca. 5 kb). Die Agarosegele wurden mit Agaroseanteilen von 1.0-2.0 % (w/v) in 1x TAE gegossen. Je nach benötigter Größe und Konzentration des Gels wurde entsprechend Agarose eingewogen, zusammen mit 1x TAE in einer Mikrowelle geschmolzen und kurz vor dem Ausgießen (ca. 60°C) in die Form Ethidiumbromid (finale Konzentration von ca. 300 - 500 ng/ml) zugegeben. Nach dem Erkalten und Auftragen der Proben konnten damit Fragmente von 0.1 bis 15 kb mittels horizontaler Elektrophorese (100 – 150 V, 1x TAE als Laufpuffer) aufgetrennt werden. Gewünschte Banden wurden danach mit einem sauberen Skalpell unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und in ein Eppendorf Reagenzgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mit den QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gelstück extrahiert (B.9.4.).

Verwendete Substanzen und Puffer:

50x TAE

Tris	242 g
Eisessig	57.1 ml
EDTA-Lösung (0.5 M)	100 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

Elektrophoresepuffer:

1x TAE (1 Teil 50x TAE + 49 Teile H₂O_{dest.})

Auftragspuffer: 6x Loading dye

Ethidiumbromidstammlösung: 10 mg/ml, wässrig

B.9.4. Aufreinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung, Abtrennung oder Umpufferung von DNA-haltigen Proben nach enzymatischer Modifikation und Mutation und die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelstücken (B.9.3.) erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Speziell entwickelte Säulenmatrix bindet DNA und adhärente Nukleinsäuren ließen sich mit Elutionspuffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluieren. Alle benötigten Puffer und Lösungen sowie die gepackten Säulen sind im Kit enthalten. Die Aufreinigung und Konzentrierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

B.9.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde ein Biophotometer von Eppendorf genutzt. Nach Verdünnung der Proben von 5 Teilen DNA-haltiger Probe mit 95 Teilen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurde bei 260 nm vermessen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1.0:

- 50 µg/ml DNA (doppelsträngig)
- 40 µg/ml RNA (einzelssträngig)
- 33 µg/ml Oligonukleotid (einzelssträngig)

Die Reinheit von DNA und RNA konnte im Verhältnis von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ abgeschätzt werden. Der Quotient sollte über 1.7 liegen. Sämtliche Parameter wurden am Biophotometer programmiert und nach Eingabe des Verdünnungsfaktors konnte die Konzentration abgelesen werden.

B.9.6. Enzymatische Modifikation von DNA

B.9.6.1. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Bakterien können so genannte Restriktionsendonukleasen (auch Restriktionsenzyme genannt) exprimieren. Diese Klasse von Enzymen kann an doppelsträngiger Eigen- und Fremd-DNA bestimmte Basenfolgen (in der Regel sechs Basen) erkennen und spezifisch spalten. Diese Erkennungssequenz ist meist palindromisch angeordnet und die Spaltung erfolgt entweder neben oder innerhalb dieser Sequenz. Dabei entstehen Fragmente, die entweder glatte Enden („blunt ends“) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky ends“) haben. An den Enden ist jeweils ein 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe gebunden, was eine nachfolgende Ligation ermöglicht. Die in

dieser Arbeit verwendeten Typ-II-Restriktionsenzyme wurden heterolog exprimiert und teilweise mutiert, um die Effektivität des „Verdaus“ zu erhöhen. Alle benötigten Enzyme (siehe Tab. G.2.) wurden von der Firma NEB inklusive der dazugehörigen Puffer bezogen. Die idealen Reaktionstemperaturen, optimalen Restriktionspuffer (insbesondere bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen) und Erkennungssequenzen wurden den Produktbeschreibungen des Herstellers entnommen. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 0.1 bis 0.5 µg DNA mit 1 µl Restriktionsenzym (entspricht ca. 3-5 U), für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten (für Klonierungen) wurden 1 bis 3 µg DNA mit 1 bis 2 µl (entspricht ca. 5-10 U) Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 15 bis 50 µl für 2 h im Inkubator (gleichmäßige Temperatur um das gesamte Reaktionsgefäß) inkubiert. Nach dem Verdau wurde der Reaktionsansatz gelelektrophoretisch (B.9.3.) untersucht.

B.9.6.2. Dephosphorylierung linearer DNA durch Alkalische Phosphatase

Durch Restriktionsenzyme linearisierte Vektoren haben endständige 5'-Phosphatgruppen. Bei einem nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektor kommt es daher bei der Ligation oft zu einem intramolekularen Ringschluss („Religation“) ohne den gewünschten Einbau von Fremd-DNA. Um die Klonierungseffizienz für Fremd-DNA zu erhöhen, wurden gereinigte, linearisierte Vektoren vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP = shrimps alkaline phosphatase) behandelt. Die Phosphatase dephosphoryliert am 5'-Ende und verhindert dadurch eine Religation. Zu ca. 5 pmol linearisiertem Vektor wurden 5 U SAP (Roche) und entsprechender Reaktionspuffer gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der Phosphatase (65°C, 20 min) konnte die dephosphorylierte Vektor-DNA direkt für Ligationen eingesetzt werden.

B.9.6.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Unter ATP-Verbrauch katalysiert T4-DNA-Ligase (NEB) die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden von doppelsträngiger DNA oder RNA. Bei diesem Prozess können überhängende oder glatte Enden ligiert werden. PCR-Produkte oder modifizierte Fremd-DNA-Fragmente mit komplementären Enden wurden so in verschiedene Vektoren zu rekombinanter Plasmid-DNA kloniert. Im Reaktionsansatz betrug das molare Insert zu linearisiertem Vektor-Verhältnis meist 3-10:1. Unter Zusatz von Ligase und Ligationspuffer wurde über Nacht bei 16°C inkubiert, anschließend bei 65°C für 10 min hitzeinaktiviert. Der Ansatz mit dem rekombinanten Plasmid konnte danach für *E. coli* Transformationen verwendet werden (B.8.1.4.).

B.9.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) dient zur enzymatischen *in vitro*-Amplifikation von durch Primern definierten DNA-Segmenten. In einem zyklisch verlaufenden Prozess werden aus einer DNA-Vorlage („Template“) durch ein Nukleinsäurengemisch, zwei gegenläufiger Oligonukleotid-Primer und einer hitzestabilen Polymerase exponentiell DNA-Abschnitte vervielfältigt. Durch Modifikationen in den Primern können so gezielt Mutationen in die Amplifikate eingefügt werden. Anwendungen hierfür sind zum Beispiel der Austausch von durch Basentriplets codierte Aminosäuren und das Einfügen oder Zerstören von Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme.

In dieser Arbeit wurde die PCR zum Einfügen eines für einen C-terminalen Hexahistidin-Tag codierenden Abschnittes in die cDNA von cGKI und zum Umschreiben von isolierter RNA in cDNA verwendet.

B.9.7.1. PCR-Primer

Für die vorliegende Arbeit wurden Primer bei MWG-Biotech, München, und Entelechon, Regensburg synthetisiert. Eine Aufstellung der verwendeten Primer inklusive Sequenzen und Restriktionsschnittstellen ist im Anhang (Tab. G.3.) zu finden. Die lyophilisierten Primer wurden in soviel Volumen H_2O_{bidest} gelöst, dass die Konzentration 100 pmol/μl betrug. Ausgehend davon wurden Arbeitslösungen von 25 pmol/μl und 0.8 pmol/μl hergestellt.

B.9.7.2. Reagenzien und Polymerasen

Für die PCR in der vorliegenden Arbeit wurden folgende Polymerasen verwendet:

- Platinum® Pfx Polymerase (Invitrogen) zur Amplifikation von kürzeren Fragmenten.
- Pfu Ultra II™ Fusion (Stratagene) zur Amplifikation größerer Fragmente und kompletter Vektoren (z.B. „Quick Change Mutagenesis“).
- M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) zur Umschreibung von mRNA in cDNA

Die Arbeitslösungen der dNTPs (dATP, cCTP, dGTP, dTTP (Fermentas, NEB)) wurden auf 10 mM eingestellt, die Reaktionsansätze für die PCR wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet.

B.9.7.3. Standard-PCR (für DNA-Fragmente bis 1 kB)

initiale Denaturierung	94°C, 5 min	} 35x
Denaturierung	94°C, 15 sec	
Primeranlagerung (Annealing)	55°C, 30 sec	
Polymerisation (Elongation)	72°C, 30 sec	
finale Polymersiation (Elongation)	72°C, 5 min	

Das oben genannte Standardprogramm ist individuell optimierbar, abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Fragmente (Elongationszeit und -temperatur) und von der Beschaffenheit der Primer (GC-Gehalt, Annealingtemperatur). Die PCR-Reaktionen wurden im T1-Thermocycler durchgeführt. Um zu überprüfen, ob ein PCR-Produkt entstanden ist, wurden ca. 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und im UV-Licht betrachtet. Danach wurden die Amplifikate aufgereinigt (B.9.4.), entsprechend den gewünschten Schnittstellen mit Restriktionsenzymen verdaut und kloniert (B.9.6.) oder direkt subkloniert (B.9.7.4) und im Anschluss sequenziert (B.9.10.), um mögliche Fehler während der Polymerisation zu erkennen.

B.9.7.4. Subklonierung von PCR-Amplifikaten

Durch die vorherige Konstruktion der Primer werden in der Regel die gewünschten Schnittstellen in das 3'-Ende und 5'-Ende des Amplifikats eingefügt. Die meisten Restriktionsenzyme benötigen für korrektes Schneiden einen entsprechenden Überhang von einigen Basen (siehe Herstellerangaben NEB), um sich an das Konstrukt anlagern zu können. Bei sehr kurzen PCR-Fragmenten ist dies nicht immer gelungen. Da die Pfx-Polymerase blunt end-Fragmente generiert, konnten diese in pCR Blunt Vektoren (Kit von Invitrogen), unabhängig von Schnittstellen, subkloniert werden. Dadurch war ein anschließendes Schneiden mit Restriktionsenzymen möglich und eine Klonierung in gewünschte Vektoren erfolgreich. Die notwendigen Puffer, linearisierten Vektoren, Enzyme und kompetenten Zellen sind im Kit enthalten. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

B.9.8. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Diese synthetisiert komplementäre DNA (cDNA) als DNA-Kopien eines RNA-Moleküls. Die generierte cDNA diente als Template für eine nachfolgende quantitative PCR. Ein Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase wurde als Kontrolle mitgeführt. Ausgegangen wurde von 2 µg Gesamt-RNA, welche mit

Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 26 µl verdünnt wurde. Nach Zusatz von 2 µl Random Hexamer Primer (100 µM) wurde der Ansatz für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden zusätzlich 10 µl M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x), 2.5 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP), 2 µl RNase Inhibitor und 7.5 µl RNase freies Wasser zugegeben. 35 µl des Reaktionsansatzes (50 µl) wurden mit 1.3 µl M-MLV Reverse Transkriptase (100 U) versetzt (+RT Ansatz), die restlichen 15 µl wurden als Kontrolle ohne Zugabe von reverser Transkriptase unter den gleichen Bedingungen mitgeführt (-RT Ansatz). Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT erfolgte die cDNA-Synthese 50 min lang bei 50°C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend 15 min auf 70°C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde bis zur Verwendung für die quantitative PCR bei -20°C gelagert.

B.9.9. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real-time-PCR)

Bei der quantitativen Polymerase Kettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch vermessen. Dies ermöglicht, den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die quantitative Bestimmung des amplifizierten DNA-Produkts erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green. Dieser interkaliert mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA, wobei gebundenes SYBR® Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist.

Die PCR wurde mit dem SYBR® Green PCR Kit von Qiagen an einem Light-Cycler System 2.0 (Roche) durchgeführt. Der 20 µl - Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10 µl QuantiTect™ SYBR Green PCR Mastermix, je 1 µl sense und antisense Primer (10 µM), 6 µl RNase freies H₂O und 2 µl +RT Ansatz. Die Sequenz aller verwendeten Primer ist im Anhang (Tab. G.3.) gelistet. Beim Primerdesign wurde darauf geachtet, dass diese nach Möglichkeit genau auf einer Intron-Exon-Grenze lagen, was eine Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA verhinderte. Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde verwendet:

Nach anfänglicher Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase für 15 min bei 95°C folgten anschließend 40 Zyklen mit 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 20 s Annealingphase und 20 s Elongationsphase bei 72°C.

Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der synthetisierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0.1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Anhand der Schmelzkurven und durch

Analyse der PCR-Produkte auf einem 3 % Agarose-Gel wurde die Spezifität der Amplifikation untersucht.

Die erhaltenen Daten wurden auf die Expression von GAPDH normalisiert. Bei diesem sog. Housekeeping-Gen wird davon ausgegangen, dass es in gleichen Organen verschiedener Tiere in konstanter Menge exprimiert wird. Durch diese Normalisierung sollen somit Schwankungen in der Konzentration der eingesetzten cDNA-Menge ausgeglichen werden, die durch unterschiedliche Effizienzen der cDNA-Synthese entstehen können.

B.9.10. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte allgemein nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). In der modernen Version werden DNA-Fragmente mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert, wobei durch den Einbau verschiedener, fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) ein Kettenabbruch erfolgt. Die fluoreszenzmarkierten Fragmente können durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden und die Abfolge mittels Laser bestimmt werden. Computerunterstützte Software (Multiscan 100ES, Sony) generiert aus den Rohdaten die DNA-Sequenz. Sequenzierungen wurden am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg von der Firma Entelechon, Regensburg übernommen. Am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München war ein Sequenzierautomat (ABI Prism™ Sequence Analyser, Perkin Elmer Applied Biosystems) vorhanden, deshalb konnten Sequenzanalysen eigenhändig durchgeführt werden.

Durchführung des „Terminator Cycle Sequencing“:

Ansatz:	DNA (50-500 ng)	x µl
	Ready Reaction Mix ¹ (RRM)	4 µl
	Primer (0.8 pmol/µl)	4 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

¹enthält AmpliTaq DNA Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Perkin Elmer Applied Biosystems)

Synthese der DNA-Abbruchfragmente:

Denaturierung	95°C, 2 min	} 25x
Denaturierung	95°C, 30 sec	
Annealing	50°C, 40 sec	
Elongation	60°C, 4 min	

Unter Verwendung von „Centri Sep Spin Columns“ (Perkin Elmer Applied Biosystems) wurde das Sequenzierprodukt nach Herstellerangaben gereinigt. Die im Speed-Vac™ getrocknete DNA wurde in 20 µl „Template Suppression Reagent“ (Perkin Elmer Applied Biosystems) gelöst und vor der ü.N.-Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

B.9.11. Generierung von rekombinanten Baculoviren

Zur Generierung von rekombinanten, infektiösen Baculoviren wurde in dieser Arbeit das *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV oder Baculovirus) verwendet. Hierbei handelt es sich um den Prototyp der *Baculoviridae*, einer großen Gruppe insektenpathogener Viren. Die Virionen haben einen Durchmesser von ca. 50 nm und eine Länge von etwa 400 nm und sind von einer Hüllmembran umgeben. Im Inneren befindet sich das virale Genom (ca. 130 kb, ringförmig und doppelsträngig). In der freien Natur vermehrt sich das Wildtyp-Virus in den Darmzellen von Schmetterlingslarven. Dort kommt es zur Freisetzung und Replikation viraler DNA sowie zur Expression viraler Proteine. Ca. 12 h post infectionem werden neue Viruspartikel durch Knospung freigesetzt („budded virus“, BV). Am Ende dieses Reifungsprozesses kommt es schließlich zur Synthese von virusspezifischen Einschlußkörperchen, sog. „occlusion bodies“, die aus einer Vielzahl von Virionen bestehen. Hauptbestandteil dieser Matrix ist das Virus-kodierte Protein Polyhedrin (ca. 29 kDa). Nach etwa 3-4 Tagen kommt es zur Lyse der Insektenzellen (was den Tod der Larve zur Folge hat) und zur Freisetzung der gebildeten Einschlusskörper. Das Virus kann in dieser Form bis zu 20 Jahre im Boden persistieren. Wird es neu aufgenommen, zerfällt die Proteinmatrix im alkalischen Milieu des Darms und die Viren werden freigesetzt. Der beschriebene Infektionszyklus beginnt erneut.

Baculoviren nutzt man in der Zellkultur als Expressionsvektor für heterologe Proteine aus. Das Polyhedrin-Gen ist zwar für die Vermehrung des Virus in Kultur nicht erforderlich, wird aber dennoch sehr stark am Ende des Infektionszyklus exprimiert (bis zu 75 % des Gesamtproteins in Sf9-Zellen). Das Prinzip der Baculoviren beruht daher auf dem Austausch des Polyhedrin-Gens durch ein heterologes Gen, welches unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promoters steht. Diese Viren vermehren sich dann lediglich durch Knospung als BV's. Durch das Fehlen des Wildtyp-Gens kommt es nicht zur Bildung der typischen Einschlusskörper (Unterschied zum Wildtyp-Virus).

Da das Genom des Baculovirus zu groß ist (ca. 130 kb), um es direkt zu manipulieren, nutzt man die Methode der Kotransfektion mit viraler Wildtyp-DNA und einem Transferplasmid (pVL 1393, B.7.). Durch zweifache homologe Rekombination wird das

gewünschte Gen in das Genom des Virus integriert. Dieser Vorgang ist zufallsbedingt und die Wahrscheinlichkeit daher sehr gering.

Um die Effektivität zu erhöhen, wurde das BD BaculoGold™ Transfection Kit verwendet. Sämtliche Puffer zur Lipofektion und virale DNA sind in dem Kit enthalten. Das linearisierte Virus-Genom hat eine Deletion in einem für die Virusvermehrung notwendigen Gen, dem sog. ORF1629. Diese „letale“ Deletion kann durch Rekombination mit dem Transferplasmid pVL 1393 komplettiert werden, so dass in der Kultur nur infektiöse Viren entstehen können, die richtig rekombiniert haben und gleichzeitig das gewünschte Fremdgen integriert haben. Dadurch kommt es zu einer Ausbeute von nahezu 100 %.

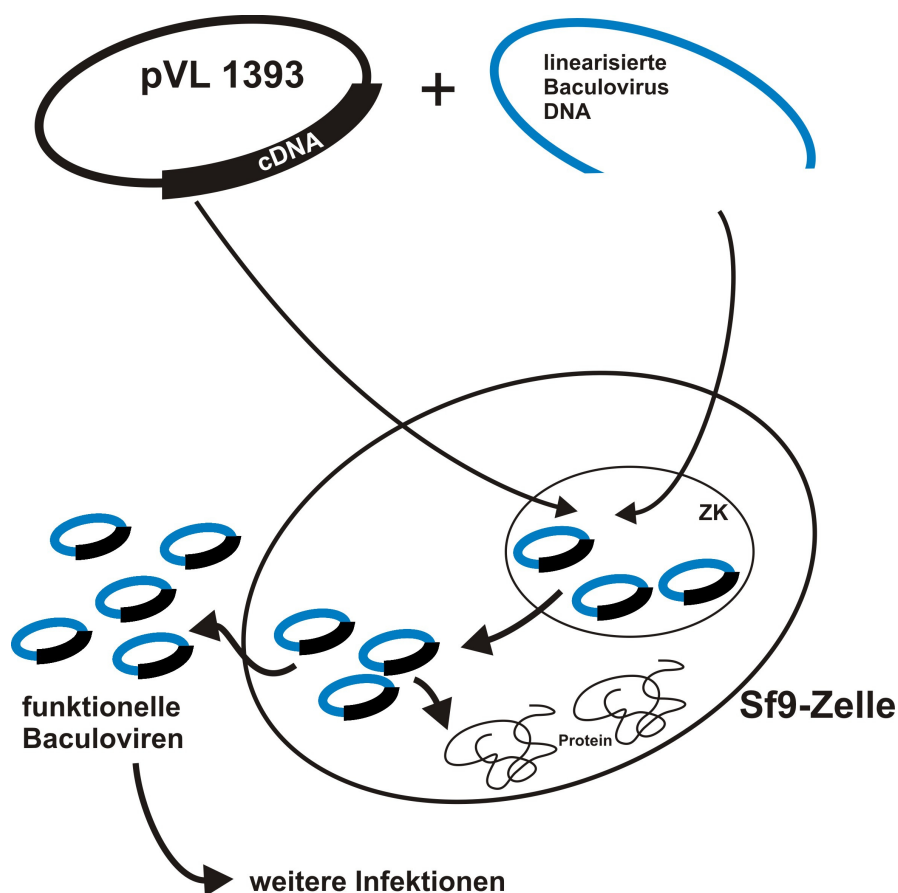


Abb. B.2. Zyklus von Baculoviren. Allgemeines schematisches Prinzip der Baculovirusgenerierung. Gewünschte cDNA wird mit Hilfe eines Transfervektors (pVL 1393) und defekter (Deletion im ORF1629) linearisierter Baculovirus-DNA zu kultivierten Sf9-Zellen gegeben. Im Zellkern kommt es zur homologen Rekombination und damit zur Generierung von funktionellen Baculoviren, die einerseits das unter dem Polyhedrin-Promotor stehende gewünschte Protein translatieren und andererseits als infektiöse Viren weitere Sf9-Zellen infizieren. Eine detaillierte Beschreibung ist im Text wiedergegeben. ZK = Zellkern.

Zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren wurde wie folgt vorgegangen:

Transfektion

- 4 Millionen Zellen/3 ml in einer 25 cm²-Flasche aussähen, 30 min adhären lassen.
- pVL-cDNA (5 µg) und 4.5 µl Baculovirus-DNA mischen und 5 min inkubieren.
- 1 ml Puffer B zu DNA Mix geben.
- Medium von den Zellen absaugen und 1x mit 3 ml Sf9-Medium waschen.
- 1 ml Puffer A zu den Zellen geben.
- DNA-Puffer B-Mix langsam zu den Zellen geben, 4 h bei 28°C inkubieren.
- Medium abnehmen, 1x mit 3 ml Sf9-Medium waschen, absaugen.
- 3 ml frisches Medium zugeben, 7 Tage (28°C, 150 rpm) inkubieren.

P1-Überstand

- nach 7 Tagen abzentrifugieren (3000 rpm, 15 min), Überstand (P1) abnehmen.

P2-Überstand

- 50 ml Kultur (2 Mio Zellen/ml) ansetzen, 1 ml des P1-Überstandes zugeben.
- 3 ml dieser Kultur zur Beobachtung in 25 cm²-Flasche geben.
- Nach 1 Woche sollten alle Zellen in der Flasche abgestorben sein.
- Überstand (P2) abzentrifugieren (3000 rpm, 15 min).

P3-Überstand

- 5 ml des P2-Überstands zu 100 ml Kultur (3 Mio/ml) geben, 48 h inkubieren.
- Überstand (P3) abzentrifugieren (3000 rpm, 15 min).

P3 wurde auf rekombinante Viren auf Proteinebene kontrolliert (B.10.7.). War die Rekombination korrekt, konnte die Virussuspension lichtgeschützt und bei 4°C über mehrere Jahre aufbewahrt werden.

B.10. Proteinbiochemische Methoden

B.10.1. Proteingewinnung aus Mausgeweben

Wildtyp- oder gentechnisch veränderte Tiere wurden durch transzervikale Dislokation euthanasiert, fixiert und eröffnet. Die gewünschten Organe wurden entnommen, in eiskaltem PBS auf Eis von umliegenden Binde- und Fettgewebe befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss erfolgte der Gewebeaufschluss mit Mörser und

Pistill (vorher in flüssigem Stickstoff gekühlt). Das zerkleinerte Gewebe wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und mit 2 % SDS, 50 mM Tris, pH 7.5 (ca. 100 µl pro 10 mg Gewebe) versetzt. Dieser Ansatz wurde auf Eis mit einem für Eppendorf-Gefäße passgenauen Mikropistill homogenisiert und anschließend für 2 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und Proteaseinhibitor-Mix (Complete Mini, Roche) nach Angaben des Herstellers zugegeben. Nach abschließendem Aliquotieren wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

B.10.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem von Lowry et al., 1951 entwickelten Verfahren in einer Modifikation nach Peterson, 1977. Das Prinzip beruht auf einer Biuret-Reaktion (Bildung eines im alkalischen blau-violetten Cu^{2+} -Protein-Komplexes) und einer Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) . Cu(I) reagiert mit Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz (Molybdän-(VI) und Wolfram-(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Die intensivierte Blaufärbung kann anschließend photometrisch bei 500-800 nm unter Bezug auf eine mit BSA erstellte Kalibrierkurve quantitativ vermessen werden (Biophotometer, Eppendorf). Für die Probenaufarbeitung wurde das Sigma Diagnostics-Protein-Assay Kit (P 5656) verwendet. Alle Reagenzien wurden nach Anleitung hergestellt. Zur Entfernung von störenden Faktoren aus dem Lysepuffer (Tris) wurden die Proteinproben vorher ebenfalls nach Herstellerangaben mit Deoxycholat/Trichloressigsäure gefällt. Die Methode nach Lowry wurde hauptsächlich zu Proteinbestimmung von Gewebslysaten verwendet.

B.10.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung von in saurer Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffes Coomassie Blau (braune Leukoform) an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen (Bradford, 1976). Dadurch kommt es wieder zur Bildung des ursprünglich blauen Farbstoffs und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Durch Messung der Extinktion bei 595 nm (Biophotometer, Eppendorf) lässt sich über eine mit BSA erstellte Kalibriergerade die Proteinkonzentration einer Probe ermitteln.

Zur Messung wurden 100 µl Proteinlösung (sollte 3-7 µg Protein enthalten), Standardlösung (1-10 µg BSA/100 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Referenz) mit 1 ml Bradford-Reagenz (Bio Rad) versetzt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt.

Die Methode nach Bradford wurde hauptsächlich zur Proteinbestimmung von aufgereinigten Enzymen verwendet.

B.10.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung und Charakterisierung von Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld (Laemmli et al. 1970). Durch Änderung des Vernetzungsgrades von Acrylamid (AA) mit Bis-Acrylamid (BA) lassen sich die Trenneigenschaften der Gele variieren. Zur Herstellung und zur anschließenden Elektrophorese der SDS-Polyacrylamidgele dienen Gießvorrichtungen und Kammern der Firma Bio Rad (Mini Protean Tetracell). Dazu wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unter den oberen Rand der Apparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 1 h) wurde die Isopropanolschicht entfernt, darauf das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Taschenherzeugung eingesetzt. Die Proteinproben (ca. 50 bis 100 µg aus Gewebslysaten, ca. 1 bis 100 ng aufgereinigte Enzyme) wurden vor dem Beladen mit Laemmli-Puffer (Endkonzentration 1x) versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammern eingesetzt, die Proben aufgetragen (inklusive vorgefärbtem Proteinstandard) und bei 150 V vertikal in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt (B.10.5.) oder auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert (B.10.6.).

Verwendete Substanzen und Puffer:

10x SDS-Laufpuffer

Tris-HCl, pH 8.3	250 mM
Glycin	1.92 M
SDS	1 % (w/v)

4x Laemmli-Puffer

Tris-HCl, pH 6.8	240 mM
DTT	200 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerol	40 % (w/v)
Bromphenolblau	0.004 % (w/v)

11.5 % Trenngel

1.8 M Tris-HCl, pH 8.8	1.8 ml
SDS 10%	83.5 µl
AA 30 %/BA 0.2 %	3.25 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O _{bidest}	3.25 ml

5 % Sammelgel

0.6 M Tris-HCl, pH 6.8	0.5 ml
SDS 10%	50 µl
AA 30 %/BA 0.2 %	0.83 ml
APS 10 %	50 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O _{bidest}	3.6 ml

B.10.5. Coomassie-Färbung

Um die per SDS-PAGE (B.10.4.) aufgetrennten Proteine anzufärben, wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung für ca. 30 min auf dem Kreisschüttler geschwenkt. Die Hintergrundfärbung wurde durch den Entfärber, der ca. alle 20 min gewechselt wurde, entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele entweder in Folie eingeschweißt oder auf Filterpapier 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

Coomassie Blau Lösung

Coomassie Blau R 250	1.5 g
Methanol	455 ml
Essigsäure	90 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

Entfärber

Essigsäure	100 ml
Methanol	300 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

B.10.6. Westernblot

Ein Westernblot ermöglicht die qualitative (und bedingt quantitative) Analyse von verschiedenen Proteinen aus Zell- und Gewebslysaten (nativ) oder von (heterolog) überexprimierten Proteinen. Das Prinzip ist eine Auftrennung eines Proteingemisches einer Probe mittels SDS-PAGE (B.10.4.) und einem anschließendem Transfer der Proteine mit beibehaltenem Auftrennungsmuster auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore). Die Inkubation der Membran mit spezifischen Primärantikörpern und die nachfolgende Behandlung mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern ermöglicht eine photochemische Detektion („Banden“) von Proteinen. Die Bandenintensität kann, abhängig von Belichtungszeiten und Vergleichstandards zu quantitativen Aussagen herangezogen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den Angaben des Herstellers, Spenderorganismus und entsprechender Verdünnung im Anhang G.1. zu finden.

Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren:

Für den Transfer der mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel wurden Filterpapiere (GB001 Gel Blotting Papier, Schleicher & Schüll) und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, mit entsprechenden Puffern getränkt und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei von unten (Anode) nach oben (Kathode) zwischen zwei Graphitplatten aufgebaut:

- 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 1
- 2 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 2
- PVDF-Membran
- SDS-Gel
- 5 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

Der Transfer erfolgte durch Blotten mit konstanter Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 für 1 h.

Immundetektion:

Die Membran wurde anschließend mit Magermilchpulver (MP, 5 %) in 1x TBST ü.N. bei 4°C geschwenkt, um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach Waschen der Membran mit 1x TBST (3x, je 5 min) wurde mit entsprechend verdünntem primären Antikörper (in 1x TBST + 3 % BSA + 0.05 % NaN_3) für 2 h inkubiert, danach mit 1x TBST/1 % MP (3x, je 5 min) gewaschen und mit sekundärem Antikörper (abhängig vom Spenderorganismus des primären Antikörpers) für eine 1 h geschwenkt. Es folgten zwei Waschschrte mit 1x TBST/1 % MP und ein Waschschrte mit 1x TBST.

Um die gekoppelte Meerrettich-Peroxidase nachzuweisen wurde eine Chemolumineszenz-Reaktion genutzt. Dazu wurde Luminol-beinhaltendes ECL (enhanced chemoluminescence)-System (Amersham) verwendet. Die im Kit enthaltenen Lösungen wurden 1:1 gemischt (je ca. $750 \mu\text{l}$ pro Membran) und für ein bis zwei Minuten mit der Membran inkubiert. In Gegenwart von H_2O_2 oxidiert die Peroxidase das Luminol, wobei Chemolumineszenz entsteht, die mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) und abschließender Entwicklung in einer Entwicklermaschine detektiert werden konnte.

B.10.7. Identifizierung rekombinanter Viren auf Proteinebene

Um festzustellen, ob bestimmte Viruspräparationen generell die Expression von rekombinanten cG-Kinasen bewirken können, wurden Monolayer-Kulturen von Sf9-Zellen (15 Mio Zellen, 1 Mio/ml , 75 cm^2 -Flasche) mit dem entsprechenden Virusüberstand P3 1:100 infiziert. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet (nach B.10.8.). Die Anwesenheit von cG-Kinase in löslichem Zellextrakt der Sf9-Zellen wurde immunologisch (B.10.6.) und funktionell (B.10.11.) nachgewiesen.

B.10.8. Expression von cG-Kinasen in Sf9-Zellen

Für die Gewinnung großer Mengen an cG-Kinasen wurden in der Regel 100-500 Million Zellen (1 Mio/ml , Kleinmaßstab) oder 1-1.5 Milliarden Zellen ($1.5 - 3 \text{ Mio/ml}$, Groß-

maßstab) 1:100 mit funktionalem Baculovirus infiziert. Es wurde immer eine Expressionskontrolle mit einem Aliquot der Kultur durchgeführt. Für Ernte, Aufarbeitung und Expressionskontrolle wurde bei Suspensionskulturen und Monolayern ähnlich vorgegangen.

B.10.8.1. Ernte und Aufarbeitung von Sf9-Zellkulturen

Verwendete autoklavierte Puffer:

PBS, pH 7.4	(in g)	TN, pH 8.0 (bei 4°C)	(in mM)
NaCl	7.89	Tris	20
KCl	0.22	NaCl	100
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2.87	H ₂ O _{bidest}	ad 1 l
KH ₂ PO ₄	0.27		
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l		
		LEW, pH 8.0 (4°C)	(in mM)
		NaH ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O	50
		NaCl	300
		H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

Tab. B.7.: Verwendete Proteaseinhibitoren

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration	
		25x Cocktail	1x Cocktail
DTT	100 mM ^{1,4}	2.5 mM	0.1 mM
EDTA	500 mM ^{1,3}	2.5 mM	0.1 mM
Benzamidin	200 mM ^{1,3}	2.5 mM	0.1 mM
PMSF	100 mM ^{2,4}	2.5 mM	0.1 mM
Leupeptin	1 mg/ml ^{2,4}	1 µg/ml	0.1 µg/ml

¹in H₂O; ²in Isopropanol; ³Lagerung bei 4°C; ⁴Lagerung bei -20°C

- Infizierte Zellen nach 60 h bis 70 h post infectionem (p.i.) abschaben und durch Zentrifugation (1000x g, 10 min, 4°C) ernten.
- Zellen zweimal mit 0.5 Kulturvolumen PBS + 1x Cocktail (4°C) waschen.
- Zellen in wenig TN Puffer⁵ + 25x Cocktail (4°C) suspendieren (5 ml pro 500 ml Suspensionskultur bzw. 20-50 µl pro ml bei Monolayer-Kulturen).
- wenn Suspensionskultur: Aliquot der Zellsuspension 1:5 im gleichen Puffer verdünnen (50 µl Zellen + 200 µl Puffer) zur Kontrolle der Expression.
- Zellsuspension sofort bei -80°C einfrieren und bis zum Aufschluss (frühestens nach 1 h) lagern.

⁵wenn im Anschluss eine Aufreinigung mit Ni²⁺-TED-Säulen erfolgen sollte (B.10.9.1.), wurde LEW Puffer + 25x Cocktail verwendet.

B.10.8.2. Schnelldachweis von löslichen cG-Kinasen

Mit dieser Methode wurden einerseits Baculoviren auf Funktionalität (Monolayer aus B.10.7.), andererseits Aliquots aus Großansätzen (Suspensionskulturen aus B.10.8.1.) auf Expression löslicher cG-Kinasen getestet:

- Eingefrorene Zellsuspension (Monolayer oder Aliquot aus Suspensionskultur) bei RT auftauen und auf Eis stellen.
- Suspension mindestens 10x mit einer 1 ml Spritze durch Kanüle (0.4 x 19 mm) pressen und homogenisieren.
- Zellhomogenat zentrifugieren (15000x g, 15 min, 4°C).
- Löslichen Überstand (= Zellextrakt) durch Immunoblot (B.10.6.) und funktionellen Test (B.10.11.) auf Anwesenheit von cG-Kinase testen.

B.10.8.3. Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Proteins

- Gefrorene Zellsuspension bei RT auftauen und auf Eis stellen.
- In einem auf Eis gekühlten Glas-Teflon-Homogenisator mit mindestens 25 Hüben homogenisieren (Lyse bei Bedarf mikroskopisch kontrollieren).
- Zellhomogenat bei 18000 rpm, 4°C, 30 min (Sorvall) zentrifugieren.
- Der Überstand (Zellextrakt) enthält die löslichen cG-Kinasen. 20 % Glycerol und frischen 25x Cocktail (B.10.8.1.) zugeben.
- Falls der Zellextrakt stark viskos ist, kann entsprechend verdünnt werden oder kurz mit Ultraschall unter Kühlung behandelt werden.

Der gewonnene Zellextrakt wurde direkt im Anschluss einer Aufreinigungsprozedur (B.10.9.) unterzogen.

B.10.9. Aufreinigung von löslichen cG-Kinasen

B.10.9.1. Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Proteine, die einen so genannten Hexahistidin-Tag (His)₆ aufweisen, können in der Regel sehr einfach durch Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Das Prinzip beruht dabei auf der Komplexbildung von stationären Ni²⁺-Ionen (auf Säulen oder als „Beads“) durch die Seitenketten von Histidin. Nach Waschen der Matrix kann mit Imidazol-haltigem Puffer das immobilisierte Protein verdrängt und eluiert werden.

Zur Aufreinigung von (His)₆-Tag mutierten cG-Kinasen wurden Protino® Ni-TED 2000 Kits (ca. 5 mg Bindungskapazität, Macherey-Nagel) verwendet. Darin waren alle notwendigen Puffer und mit Ni²⁺-TED-Resin (Tris-Carboxymethyl-Ethylen-Diamin) beladene Säulen enthalten. Ni²⁺-TED Resin zeichnet sich durch eine monovalente Bindung zum Protein aus. Dadurch wird einerseits die Spezifität für (His)₆-Tag-Proteine erhöht, andererseits kann gebundenes Protein leicht und hochrein unter Schwerkraft-Bedingungen eluiert werden:

- Äquilibrierung der Säule mit 4 ml 1x LEW + 1x Cocktail (B.10.8.1.).
- Bindung von Protein durch Zugabe des Zellextrakts.
- Mit 8-fachem Säulenvolumen mit 1x LEW + 1x Cocktail waschen.
- 3x Elution mit je 3 ml Elutionspuffer (1x LEW + 250 mM Imidazol, pH 8.0 + 1x Cocktail).

Der Durchlauf, die Waschfraktionen und die Elutionsfraktionen wurden nach Zugabe von 20 % Glycerol durch Westernblot (B.10.6.) und Coomassie-Färbung (B.10.5.) auf Gehalt und Reinheit an cG-Kinasen analysiert. Elutionsfraktionen, die Kinasen enthielten, wurden gepoolt und ü.N. bei 4°C gelagert, um sie Tags darauf durch Ultrafiltration aufzukonzentrieren (B.10.10.).

B.10.9.2. Affinitätschromatographie mit 8-AEA-cAMP-Agarose

Diese Technik beruht auf der biospezifischen Interaktion zwischen dem zu reinigenden Protein und dessen Liganden, wobei der Ligand an der Säulenmatrix immobilisiert ist. Die Affinitätschromatographie hat demnach von allen chromatographischen Methoden die höchste Selektivität.

Zur Reinigung der cG-Kinasen wurde eine cAMP-Agarosesäule verwendet und das gebundene Enzym durch Zugabe von cGMP eluiert. Die Affinität der cG-Kinase zu cAMP ist ungefähr 100x geringer als zu cGMP (Landgraf et al., 1986). Die Verwendung von cAMP als immobilisierten Liganden gewährleistet einerseits eine noch ausreichende Bindung der cG-Kinasen an die Säule und erlaubt andererseits eine spezifische Elution des Proteins durch sehr geringe Konzentrationen von freiem cGMP. Letzteres ist besonders wichtig, da eine hohe cGMP-Konzentration im Eluat spätere Untersuchungen des gereinigten Enzyms stören würde.

Für die Aufreinigung von cG-Kinasen wurde 8-(2-Aminoethyl) Aminoadenosin-3', 5'-zyklisches Monophosphat Agarose (8-AEA-cAMP-Agarose, Biolog Life Science Institute), gepackt in 6 ml Säulen, verwendet. Die Grundzusammensetzung der Aufreinigungspuffer

entsprach dem gleichen Tris/NaCl/Glycerol-Puffersystem, die für die Herstellung des Zellextraktes verwendet wurde. Lediglich die Konzentration des Cocktails wurde von 25-fach auf 1-fach reduziert. Auftrag und Elution erfolgten bei Raumtemperatur, da sich die Trennzeit bei 4°C wegen der hohen Viskosität des Glycerols um ein Vielfaches verlängert hätte.

Die Aufreinigung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 6 ml Säule¹ auf Macherey-Nagel-Absaugapparatur (+ Wasserstrahlpumpe) mit 100 ml Puffer A äquilibrieren (Flußrate: 2 ml/min).
- 1-5 g Zellextrakt (aus B.10.8.3) auf die Säule geben, mit 2 ml/min durchsaugen.
- Mit 10-fachem Säulenvolumen (= 60 ml) mit Puffer A waschen (2 ml/min).
- Elution mit Puffer B, Elutionsfraktionen (5 ml) nach Totvolumen von 6 ml separat sammeln (ca. 10 Fraktionen, auf Eis)².
- Regeneration der Säule mit 100 ml Puffer C.
- Lagerung der Säule in Puffer A + 0.05 % NaN₃ (verhindert Verkeimung), 4°C.
- Reinigung der Säule mit 8 M Harnstoff (bei Bedarf).

¹für jedes cGKI-Isoenzym wurde eine separate Säule verwendet.

²Kinasen eluieren mit der cGMP-Front, sind also überwiegend in den ersten Fraktionen.

Verwendete Puffer:

Puffer A: TN-Puffer (B.10.8.1) + 20 % Glycerol + 1x Cocktail (B.10.8.1)

Puffer B: Puffer A + 20 µM cGMP

Puffer C: Puffer A + 1 M NaCl

Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf Gehalt und Reinheit an cG-Kinasen überprüft. Alle cG-Kinase-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und durch Ultrafiltration (B.10.10) umgepuffert und aufkonzentriert.

B.10.10. Konzentration von Proteinen durch Ultrafiltration

Das Prinzip der Ultrafiltration ist die Konzentration von Proteinlösungen durch Membranfiltration des Lösemittels und membranpermeabler Substanzen, wobei größere Moleküle wie Proteine zurückgehalten werden. Die treibende Kraft wird durch Zentrifugation erzeugt. Durch mehrmaliges Konzentrieren und Verdünnen der Probe (mit Puffer anderer Zusammensetzung) wird diese entsalzt bzw. umgepuffert.

Für die Ultrafiltration wurden 20 ml Konzentratoren mit einer Trenngrenze von 30 kDa verwendet (molecular weight cut off, MWCO 30.000 Vivaspin 20, Sartorius). Die Ultrafiltration erfolgte für 2 h bei 4°C und 5000x g, wobei eine 20-50 fache Konzentration der Ausgangslösung erreicht werden konnte.

Die gepoolten Elutionsfraktionen wurden entsprechend eingengt und mit LEW-Puffer oder Puffer A (B.10.9.1. oder B.10.9.2., jedoch ohne cGMP und ohne Leupeptin (verfälscht Proteinbestimmung)) wieder auf das Ausgangsvolumen verdünnt und erneut eingengt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und zum Endkonzentrat soviel Glycerol gegeben, sodass eine Proteinlösung mit 50 % Glycerol-Anteil erhalten wurde.

Die Endpräparation an cG-Kinase (x mg/ml) lag damit in folgenden Puffersystemen vor:

IMAC-gereinigt:

50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0 (4°C), 300 mM NaCl, 50 % Glycerol, je 0.1 mM DTT, EDTA, Benzamidin und PMSF.

Affinitäts-gereinigt:

20 mM Tris, pH 8.0 (4°C), 100 mM NaCl, 50 % Glycerol, je 0.1 mM DTT, EDTA, Benzamidin und PMSF.

B.10.11. Phosphotransferase-Assay

Biologisch aktive cG-Kinasen katalysieren den Transfer von endständigen (γ)-Phosphatgruppen von ATP auf Serin- oder Threonin-Hydroxylgruppen geeigneter Substratproteine, die in der Regel im Bereich der spezifischen Erkennungssequenz von K/R K/R X **S/T** liegen. Die Phosphotransferasefunktion wird jedoch erst durch die Bindung von cGMP an das cG-Kinasedimer aktiviert. Gibt man in einen Reaktionsansatz (γ-³²P)-ATP, so werden umgesetzte basische Substratpeptide radioaktiv markiert. Im sauren Milieu binden die positiv geladenen Substratpeptide an Phosphocellulose-Papier und können so von der freien Radioaktivität abgetrennt werden (Roskoski, 1983). Mit Hilfe dieses radioaktiven Tests konnte die Anwesenheit von funktioneller cG-Kinase (im Zellextrakt von Sf9-Zellen und von aufgereinigter Kinase) sehr empfindlich nachgewiesen und die katalytische Aktivität in Abhängigkeit von der cGMP-Konzentration verfolgt werden. Weiterhin konnte mit diesem Testsystem die Wirkung von anderen zyklischen Nukleotiden auf cG-Kinasen und auch andere Kinasen (cA-Kinase) getestet werden. Eine Modifikation der Methode bot auch die Möglichkeit, spezifisch die Aktivität von endogenen cG-Kinasen in Aortenlysaten zu bestimmen (B.10.11.3.). Alle Messungen wurden bei 30°C durchgeführt.

B.10.11.1. Standard-Test zum Nachweis von cG-Kinase

Allgemeiner Ansatz:

20 µl	5x MES (MES 250 mM, EGTA 2 mM, Mg(OAc) ₂ 5 mM, NaCl 50 mM)
10 µl	100 mM DTT
10 µl	10 mg/ml (= 1 %) BSA
10 µl	10 µM cAK-Inhibitorpeptid ¹ (AS 5-24, PKA, nur bei Zellextrakt)
10 µl	400 µM cGKI Substratpeptid VASPtide ² (ca. 0.4 mg/ml)
10 µl	1 mM (γ- ³² P)-ATP (ca. 50-100 cpm/pmol, Perkin Elmer) ³
10 µl	H ₂ O _{bidest} (falls kein cAK-Inhibitorpeptid verwendet wird)
70 µl	Reaktionsgemisch
+ 10 µl	H ₂ O _{bidest} (-cGMP) bzw. 100 µM cGMP (+cGMP) (oder cNMP)
+ 20 µl	gereinigtes Enzym (ca. 20 ng) oder Zellextrakt (ca. 100 ng)
100 µl	
5 min	bei 30°C inkubieren.
50 µl	des Ansatzes (entspricht 10 ng Enzym oder 50 ng Zellextrakt) auf Filter geben und Reaktion in 75 mM H ₃ PO ₄ abstoppen.

¹Hemmt die Aktivität von cA-Kinase (Glass et al., 1989);

Sequenz: TTYADFIASGRTGRRNAIHD

²Durch Festphasensynthese von der Firma Coring hergestellt; Sequenz: RRKVSKQE

³Durch Zugabe von (γ-³²P)-ATP zu kaltem ATP. Berechnung der Aktivität am Versuchstag nach dem Zerfallsgesetz ($A_t = A_0 / e^{0,05 \cdot t}$), abhängig von der Probenzahl.

Vorbereitung und Durchführung:

Für jede Proteinprobe wurde die Kinaseaktivität einmal in Abwesenheit von cGMP bzw. cNMP (-NMP, entspricht Basalaktivität) und einmal in Anwesenheit von 10 µM cGMP bzw. cNMP (+cNMP) bestimmt (jeweils als Doppelwert, also 4 Ansätze pro Probe).

- Proteinproben in Verdünnungspuffer (1x MES, 1 mM DTT, 0.1 % BSA) auf folgende Konzentrationen einstellen (20 µl pro Ansatz) und auf Eis stellen:

Zellextrakt: 5.0 ng/µl

gereinigtes Enzym: 1.0 ng/µl

- Zur Korrektur der unspezifischen Aktivität entsprechende Leerwerte bestimmen (Leer-Zellextrakt bzw. Verdünnungspuffer). Als Positivkontrolle gereinigte cG-Kinase verwenden, von der die Aktivität bereits bekannt ist.
- Reaktionsgemisch (70 µl/Ansatz, s.o.) für alle Ansätze gemeinsam vorbereiten.

- Entsprechende Anzahl an Eppendorf-Reaktionsgefäßen und ebenso viele Phosphocellulose-Filter (P-81, 2.1 cm Rundfilter, Whatman) vorbereiten. Filter zusammenklappen und mit Bleistift nummerieren.
- Je 10 µl H₂O bzw. 100 µM cGMP (cNMP) (Stammlösung, ist im Ansatz 1:10 verdünnt) in Eppendorf-Reaktionsgefäß vorlegen. Zu jedem Ansatz 70 µl Reaktions-Gemisch geben.
- Reaktion durch Zugabe von 20 µl Protein-Probe starten (Zeitlich versetzt alle 30 s). Ansatz kurz rütteln und exakt 5 min bei 30°C inkubieren.
- 50 µl aus jedem Ansatz auf Phosphocellulose-Filter geben und diese aus jedem Ansatz zum Abstoppen der Reaktion sofort in eine Schale mit ca. 100 ml 75 mM Phosphorsäure überführen.
- Filter 4x 2 min mit 75 mM H₃PO₄ und 1x mit Aceton waschen. Danach auf Heizplatte (SciePlas Gel Dryer™) bei 42°C 15 min trocknen.
- Trockene Filter in Szintillationsgefäße (Sarstedt) mit 6 ml Szintillationslösung (Rotiszint®, Carl Roth) überführen.
- 10 µl des Reaktionsgemisches (enthält 1430 pmol ATP) zusammen mit einem Filter ebenfalls in ein Szintillationsgefäß geben zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des ATP (sA_{ATP}; Dreifachwert). Diese sollte etwa 50-100 cpm/pmol ATP betragen.
- Zählrate (cpm) der Proben im β-Zähler (Tri Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer™, Perkin Elmer) messen, Mittelwerte berechnen und entsprechende Leerwerte abziehen (= cpm_{korrr}).

Auswertung:

Gehalt an cG-Kinase in unbekannter Probe:

$$\text{Gehalt (\%)} = \frac{\text{cpm}_{\text{korrr}} \div \mu\text{g}_{\text{Probe}}}{\text{cpm}_{\text{korrr}} \div \mu\text{g}_{\text{ger.Kinase}}} \quad (\text{cpm-Werte aus Ansätzen +cGMP})$$

$$\text{Faktor für maximale cGMP (cNMP)-Stimulation: } \frac{\text{cpm}_{\text{korrr}}(+\text{cGMP (cNMP)})}{\text{cpm}_{\text{korrr}}(-\text{cGMP (cNMP)})}$$

$$\text{Maximale Umsatzrate: } v_{\text{max}} (\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}) = \frac{\text{cpm}_{\text{korrr}} \div \text{sA}_{\text{ATP}}(\text{cpm/pmol})}{\text{ng Protein (auf Filter)} \times 5 \text{ min}}$$

B.10.11.2. Bestimmung der Aktivierungskonstanten für cNMP (K_a -Wert)

Der Test wird generell wie die Standardbestimmung (B.10.11.1.) durchgeführt, allerdings in Gegenwart von unterschiedlichen cGMP (cNMP)-Konzentrationen.

- Anstelle von H_2O bzw. $100 \mu M$ cGMP (cNMP) jeweils $10 \mu l$ folgender cGMP (cNMP)-Verdünnungen vorlegen (Endkonzentration ist im Test dann jeweils 1/10):

1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} .

- Reaktion standardmäßig durchführen und Umsatzrate (v) bei jeder cGMP (cNMP)-Konzentration berechnen (B.10.11.1.).
- Nach Auftragen von v (Ordinate) gegen $\log [cGMP (cNMP)]$ (Abszisse) die cGMP (cNMP)-Konzentration bei halbmaximaler Umsatzrate ermitteln. Dies entspricht dem K_a -Wert.

B.10.11.3. Aktivitätsbestimmung endogener cG-Kinasen (Aortenlysat)

Um die Aktivität von endogen in Maus-Aortenlysaten vorkommenden cG-Kinasen zu bestimmen, wurde prinzipiell der radioaktive Phosphotransferase-Assay nach B.10.11. mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

- Euthanasie der Tiere durch transzervikale Dislokation.
- Entnahme der Aorta, Entfernen von Blut und Bindegewebe in eiskaltem PBS.
- Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, Homogenisation in Eppendorf-Reaktionsgefäß in $500 \mu l$ TN-Puffer ($20 mM$ Tris, $pH 8.0$, $100 mM$ NaCl) + 1/7 Complete Mini Proteaseinhibitor Stocklösung (Roche).
- Zentrifugieren bei $2000 \times g$, $4^\circ C$, 2 min, Überstand abnehmen.
- weiteres Vorgehen nach B.10.11.1., jeweils $20 \mu l$ Aortenlysat-Überstand zu $80 \mu l$ Reaktionsansatz.

B.11. Bestimmung von cGMP in thorakaler Aorta

Zur Bestimmung von cGMP in Gewebe (thorakale Aorta) wurde einerseits ein kommerziell erhältlicher Enzym-Immuno-Assay (EIA, Cayman cGMP EIA) und andererseits Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) genutzt. Die Vorteile der HPLC-Methode gegenüber des EIA sind zum einen der Zeitfaktor, die Kostenfrage und der größere Bereich der Linearität.

In der vorliegenden Arbeit wurde die cGMP-Konzentration in entnommener Aorta vor und nach *in vitro* Stimulation mit DEA-NO bestimmt. Hierfür wurden jeweils vier Tiere aus der IRAG^{-/-} und der IRAG^{Δ12/Δ12}-Linie verwendet. Als Kontrollen dienten jeweils altersgleiche Wildtyp-Mäuse.

Die Probenaufbereitung erfolgte für beide Methoden nach dem gleichen Schema:

- Euthanasie der Tiere durch transkraniale Dislokation.
- Entnahme der kompletten thorakalen Aorta.
- Halbierung der Aorta (systemimmanenter Kontrollwert).
- Bestimmung der Feuchtmasse (in mg).
- Gewebe für 30 min, 37°C in Puffer A (5 ml) äquilibrieren.
- Inkubation in 100 nM Norepinephrin (10 min) (c_{Stammlösung}: 100 µM).
- Inkubation mit 1 µM DEA-NO bzw. Vehikel (ctr) für 1 min (c_{Stammlösung}: 1 mM).
- Gewebe entnehmen, mit PBS waschen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren.
- Mit Mörser und Pistill homogenisieren (in flüssigem Stickstoff gekühlt), mit 5-10 Volumenteilen Trichloressigsäure (TCA, 5 %) zur Proteinfällung mischen, kurz inkubieren.
- 10 min bei 1500x g, 4°C zentrifugieren, Überstand abnehmen.
- Waschen mit H₂O-gesättigtem Diethylether (Entfernung von störendem TCA). 5 VT Ether zu 1 VT Überstand geben, für 10 s mischen, Phasen trennen lassen, obere Etherphase abnehmen und verwerfen. 2x wiederholen.
- Restlichen Ether durch Erhitzen der Probe auf 70°C, 5 min entfernen.

Puffer A, pH 7.4	(in mM)
NaCl	120.0
KCl	4.5
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1.2
MgSO ₄	1.0
CaCl ₂	1.6
EDTA	0.0625
Glucose	5.5
HEPES	5.0

B.11.1. EIA-Analyse von cGMP im Gewebehomogenat

Das Prinzip des Enzym-Immuno-Assays (EIA) beruht auf der Konkurrenz von cGMP (aus dem Lysat) und konstant zugesetztem cGMP-Acetylcholinesterase-Konjugat (cGMP tracer) um einen limitierten cGMP-spezifischen Antikörper. Der cGMP-Anti-Kaninchen-cGMP-Antikörper-Komplex bindet an einen in 96-Loch-Platten immobilisierten monoklonalen Anti-Kaninchen-Antikörper. Je mehr cGMP in den Lysaten vorhanden ist, desto weniger cGMP tracer kann an den cGMP-Antikörper binden. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Anteile und Zugabe eines Substrats für Acetylcholinesterase ändert sich dessen Farbe in Abhängigkeit von der Acetylcholinesterase-Konzentration. Dies kann photometrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve lässt sich die cGMP-Konzentration bestimmen.

Die Probenaufbereitung nach der Inkubation mit DEA-NO (B.11.) entsprach den Angaben des Herstellers des cGMP EIA. Alle notwendigen Puffer, Antikörper und Lösungen sind in dem Kit enthalten. Die Bestimmung der cGMP-Konzentration (Detektionslimit: 1 pmol/ml) erfolgte nach Herstellerprotokoll, die 96-Loch-Platten wurden bei 416 nm mit einem Tecan-Plattenleser (Tecan Sunrise RemoteTM, Magellan 5.0 Datenerfassungssoftware) vermessen.

B.11.2. HPLC-Analyse von cGMP im Gewebehomogenat

Die Proben, die per EIA analysiert wurden, wurden im Anschluss auch für die HPLC-Analyse verwendet. Dies sollte die EIA-Ergebnisse bestätigen und gleichzeitig auch der Entwicklung einer preisgünstigeren, schnelleren Methode dienen.

Verwendete Puffer, Materialien und Parameter:

- Apparatur: Pumpe LC 10 AS, Autosampler SIL-10A, Steuer-/Integrationssoftware Class-LC10 (Shimadzu), Säulenofen ERC 125 (ERC)
- Detektor: Shimadzu SPD 10A, 260 nm (Shimadzu)
- Säulentemperatur: 35°C
- Säule: Synergy Fusion 250x4.6 mm (Reverse Phase (RP), Fa. Phenomenex)
- Eluent: 1000 ml H₂O, 2.5 ml Essigsäure, 1.0 g Tetrabutylamin x HSO₄⁻, pH 3.5, 140 ml Acetonitril
- Fluß: 1.0 ml/min (ca. 110 bar)
- Retentionszeiten: cGMP 7-7.6 min, cAMP 8.6-9.9 min
- unteres Limit der Detektion. ca. 500 pg auf Säule
- Substanzen: cGMP, cAMP

- Reagenzien: Milli-Q-Wasser, Acetonitril, Acetonitril (HPLC-grade), alle anderen Reagenzien p.A.-Qualität
- Stammlösungen: cAMP/cGMP: je 100 µg/ml in H₂O, kurzfristig lagerbar bei 4°, langfristig in Aliquots zu 500 µl bei -20°C
- Validierung: Die Verdünnungsreihen (Working Solutions, WS) wurden hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Die Linearität der Verdünnungsreihe in Wasser wurde kontrolliert. Bei Bestätigung der Linearität musste die WS nicht jeden Tag neu hergestellt werden.
- Standards: cGMP und cAMP in Wasser, je 100 ng/ml.

Die Proben wurden jeweils mit zwei bis drei Volumina Wasser verdünnt und davon 50 µl in die Apparatur injiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Integrationssoftware (Class-LC10, Shimadzu).

B.12. Statistik

Alle vorliegenden Ergebnisse wurden als Mittelwerte inklusive Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des Student's unpaired t-test, bei Vergleich von drei oder mehreren Gruppen wurde eine ANOVA-Varianzanalyse durchgeführt. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als statistisch signifikant, < 0.01 als hoch signifikant und < 0.001 als extrem signifikant betrachtet und in den jeweiligen Graphen entsprechend mit einem Stern (*), zwei Sternen (**) oder drei Sternen (***) gekennzeichnet. Ein nicht signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) wurde mit n.s. (nicht signifikant) markiert.

Bei multipler Testung wurde die Korrektur nach Bonferroni angewandt, um eine Alphafehler-Kumulierung zu vermeiden.

C. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde schwerpunktmäßig die Funktion von IRAG-defizientem Glattmuskelgewebe (vaskuläre Aorta und gastrointestinales Colon und Jejunum) bzw. von Glattmuskelgewebe mit mutiertem IRAG-Protein („IRAG- Δ 12-Mutante“) auf verschiedene Stimuli untersucht. Hierbei wurden zunächst Kontraktionen durch Phenylephrin bzw. Carbachol induziert, die dann durch verschiedene cG-Kinase aktivierende Substanzen relaxiert wurden. Die physiologische Bedeutung von IRAG und - abweichend von den bisher etablierten „second messengers“ cAMP und cGMP - nämlich cCMP, sollte *in vivo* und *in vitro* anhand von verschiedenen Mausmodellen untersucht werden.

C.1. Phänotyp von IRAG defizienten Mäusen

Die Generierung von IRAG-KO Mäusen erfolgte ausschließlich durch Heterozygoten-Verpaarung (+/- x +/-). Nach den Mendel'schen Vererbungsregeln erhielt man dadurch statistisch 25 % Kontrolltiere (Wildtyp-Mäuse), 25 % IRAG-KO Mäuse und 50 % heterozygote Tiere, die für die weitere Zucht geeignet waren. Die Fertilität von IRAG^{-/-} Tieren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

IRAG-defiziente Mäuse entwickelten im Erwachsenenalter ab der ca. 12 Woche nach der Geburt einen stark dilatierten Gastrointestinaltrakt (Abb. C.1.). Dies war in erster Linie am geblähten Magen und am vergrößerten Caecum zu erkennen. Aufgrund des erweiterten Gastrointestinaltrakts war die Leber verstärkt im Thoraxraum lokalisiert. Weiterhin zeigten die Tiere einen dilatierten Ösophagus mit Reflux und eine ausgeprägte Splenomegalie. Für diese Arbeit wurde speziell das gastrointestinale Gewebe und die Funktion von größeren Gefäßen (Aorta) untersucht. Eine Aufklärung der Ursache für die Splenomegalie erfolgte nicht.

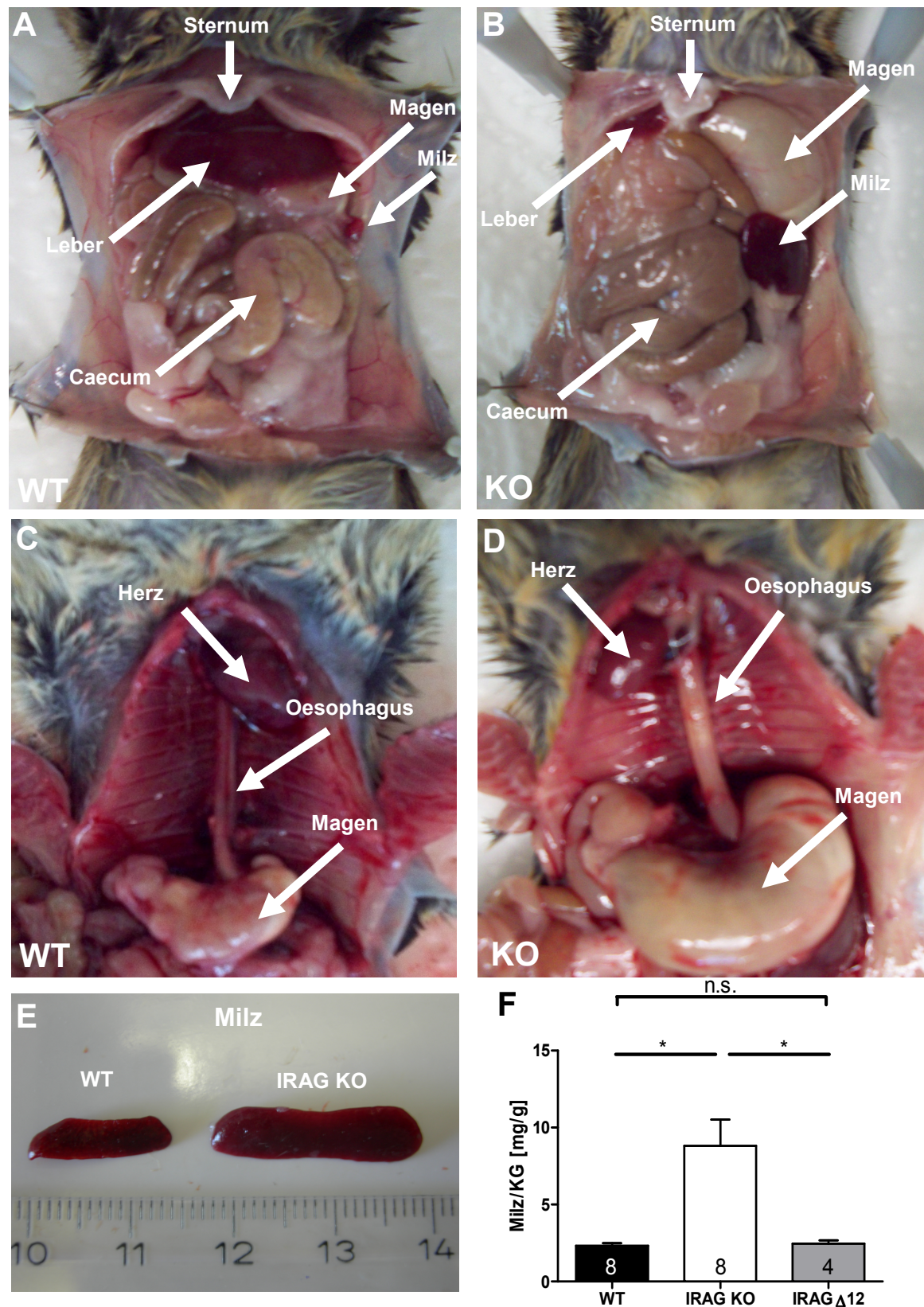


Abb. C.1. Phänotyp von IRAG-defizienten Mäusen. Eröffnetes Abdomen einer Wildtyp Maus (A) und einer IRAG-KO Maus (B). Der Magen des KO ist dilatiert, das Caecum vergrößert, um 45° verdreht und nach rechts verschoben. Die Leber ist weiter im Thorax lokalisiert, die vergrößerte Milz ist deutlich zu erkennen. Eröffneter Thorax einer Wildtyp Maus (C) und eines IRAG-KO Tiers (D). Gut zu erkennen sind wiederum der vergrößerte Magen und der dilatierte Oesophagus. Eine Durchtrennung zeigte starken Reflux (nicht gezeigt). (E) verdeutlicht den Größenunterschied der Milz. (F) zeigt die statistischen Unterschiede des Milzgewichts bezogen auf das Körpergewicht. Das Milzgewicht der IRAG $\Delta 12$ Linie ist ergänzend gezeigt. Hier ist kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp zu erkennen.

C.2. Medianes Überleben von IRAG-KO Mäusen

Eine Analyse der Überlebensrate der IRAG^{-/-}-Tiere (N=24 je Wildtyp-Kontrolle und IRAG-KO, beiderlei Geschlecht) über einen Zeitraum von 50 Wochen ergab ein mittleres Überleben von 29 Wochen. Die Ursache des Exitus konnte bisher nicht festgestellt werden.

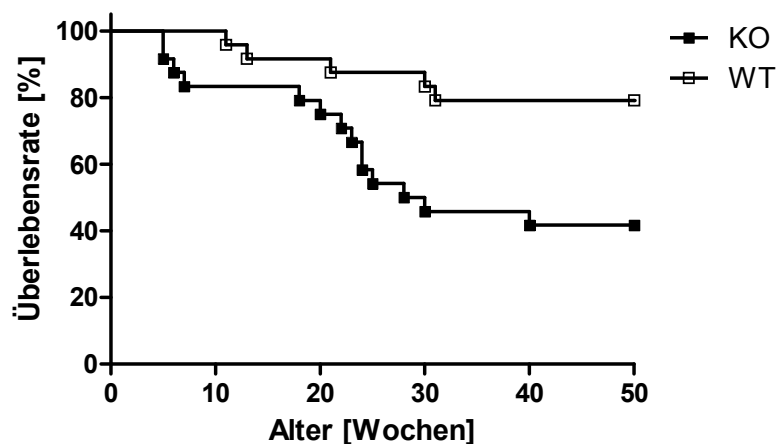


Abb. C.2. Kaplan-Meier-Überlebenskurve von Wildtyp- und IRAG^{-/-}-Mäusen (jeweils N=24, beiderlei Geschlecht). Das mediane Überleben der IRAG-KO Linie beträgt 29 Wochen.

C.3. Expressionsanalyse von Proteinen im Gewebe

Zur Expressionsanalyse von verschiedenen Proteinen der cGKI-Signalkaskade wurde die Methode des Westernblot (Immunoblot, B.10.6.) genutzt. Hierfür wurden verschiedene glattmuskuläre Gewebe aus gleichaltrigen Kontrolltieren (Wildtyp-Mäuse) und IRAG-KO Mäusen verwendet. Bei der Gewebepreparation wurde insbesondere darauf geachtet, die Proben nicht mit anhaftendem Binde- und Fettgewebe zu kontaminieren, da diese die Proteinbestimmungen verfälschen und dadurch möglicherweise eine Verdünnung des Gewebes suggerieren könnten. Die verschiedenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und das Expressionsniveau durch die Bandenintensität verglichen. Als Ladungskontrolle diente entweder β -Actin oder das „Housekeeping-Enzym“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

In den IRAG^{-/-}-Geweben aus Aorta und Colon konnte eine starke Expressionsreduktion von cGKI β beobachtet werden, IRAG war nicht mehr detektierbar (Abb. C.3.A). Die Expression von ausgewählten cGKI-Substraten unterschied sich nicht im Vergleich zum Wildtyp, jedoch konnte im Colon eine starke Überexpression von MYPT1 festgestellt werden, die in der Aorta nicht detektierbar war (Abb. C.3.B und C.3.C). Die verminderte Expression von cGKI β konnte durch Kreuzung von IRAG-KO Tieren mit transgenen Mäusen, die spezifisch in glatter Muskulatur cGKI β überexprimierten (freundlicherweise

von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann, TU München und Prof. Dr. Robert Feil, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt) kompensiert werden (Abb. C.3.D).

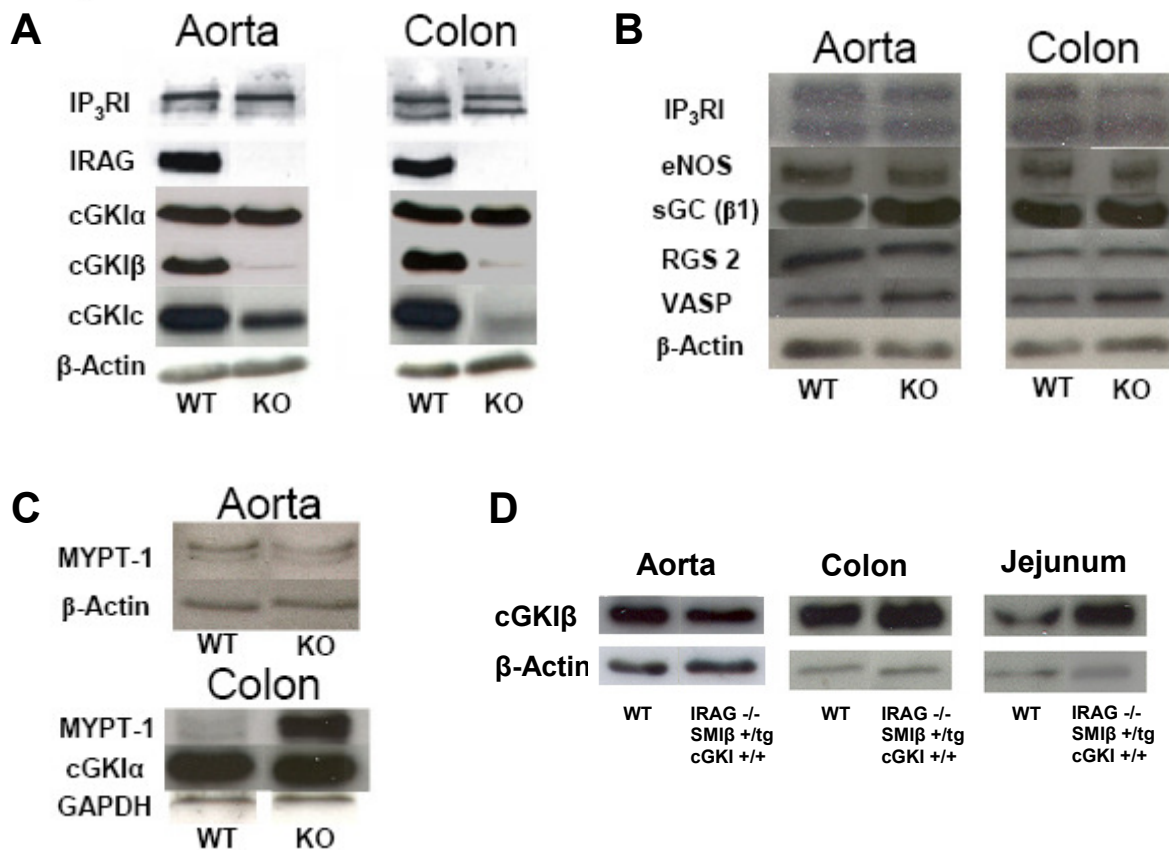


Abb. C.3. Westernblotanalyse diverser Proteine. (A) Expression von Proteinen, die im ternären Komplex mit IRAG enthalten sind. IRAG ist im KO nicht zu detektieren. cGKIβ ist sehr stark herunterreguliert. Der cGKIc-Antikörper bindet an ein C-terminales Epitop der cGKI und erkennt daher beide cGKI-Isoenzyme. **(B)** Expression von Proteinen, die in der cGKI-Signalkaskade mitwirken. Es konnte kein Expressionsunterschied festgestellt werden. **(C)** MYPT1 ist im Colon im Vergleich zum Wildtyp stark überexprimiert. In der Aorta tritt keine verstärkte Expression auf. **(D)** Durch die Kreuzung von IRAG KO Tieren mit cGKIβ überexprimierenden Tieren (SMIβ^{+/tg}) konnte die cGKIβ-Expression auf Wildtyp-Niveau normalisiert werden. Alle Blots wurden mindestens dreimal angefertigt.

C.4. Effekte von cGKI-Aktivatoren auf glatte Muskulatur

In der vorliegenden Arbeit wurden thorakale Aorta, distales Colon und medianes Jejunum von Wildtyp (Kontrolle) und verschiedenen transgenen Tieren (im Detail siehe weiter unten) myographisch untersucht. Allgemein erfolgte nach der Vorspannung und Äquilibrationsphase zunächst eine Vorkontraktion mit dem α_1 -Rezeptor-Agonisten Phenylephrin (3 μ M) bei Aorta oder mit dem M_3 -Rezeptor-Agonisten Carbachol (10 μ M) bei Colon und Jejunum.

C.4.1. Wirkung von 8-Br-cGMP auf die thorakale Aorta

8-Br-cGMP ist ein Membran-permeables und Phosphodiesterase-stabileres Analogon des endogen vorkommenden cGMPs. 8-Br-cGMP aktiviert die cGKI-Isoenzyme mit einem K_a (cGKI α) von 0.01 μ M und K_a (cGKI β) von 1 μ M (Pöhler et al., 1995). Aufgrund der Membran-permeierenden Eigenschaften wurde es für die Organbad-Versuche ausgewählt.

Wildtyp-Aortenringe mit zerstörtem Endothel zeigten nach der Vorkontraktionsphase und Erreichen eines stabilen Tonus bei Zugabe von 300 μ M 8-Br-cGMP eine Relaxation von 65.7 ± 2.7 % des Ausgangstonus. Die Relaxation von IRAG-KO Gewebe ist jedoch nach Zugabe von 300 μ M 8-Br-cGMP signifikant vermindert (16.7 ± 1.5 %). Im Immunoblot (C.3.) wurde gezeigt, dass die Expression von cGKI β im KO-Gewebe stark vermindert ist. Um auszuschließen, dass die verminderte Relaxation von gering exprimierter cGKI β resultierte, wurden IRAG-KO Mäuse mit cGKI β -überexprimierenden Mäusen (Genotyp: IRAG $^{+/+}$, cGKI $^{+/+}$, SMI $\beta^{+/tg}$) gekreuzt. Die Versuchstiere hatten einen IRAG-KO Hintergrund und exprimierten cGKI β glattmuskelspezifisch auf Normalniveau (Genotyp: IRAG $^{-/-}$, cGKI $^{+/+}$, SMI $\beta^{+/tg}$) (Abb. C.3.D). In der Myographie konnte gezeigt werden, dass dieses Gewebe trotz des rekonstituierten cGKI β -Expressionsniveaus gegenüber Wildtypgewebe einen signifikanten Defekt in der Relaxation (23.9 ± 1.7 %) aufweist.

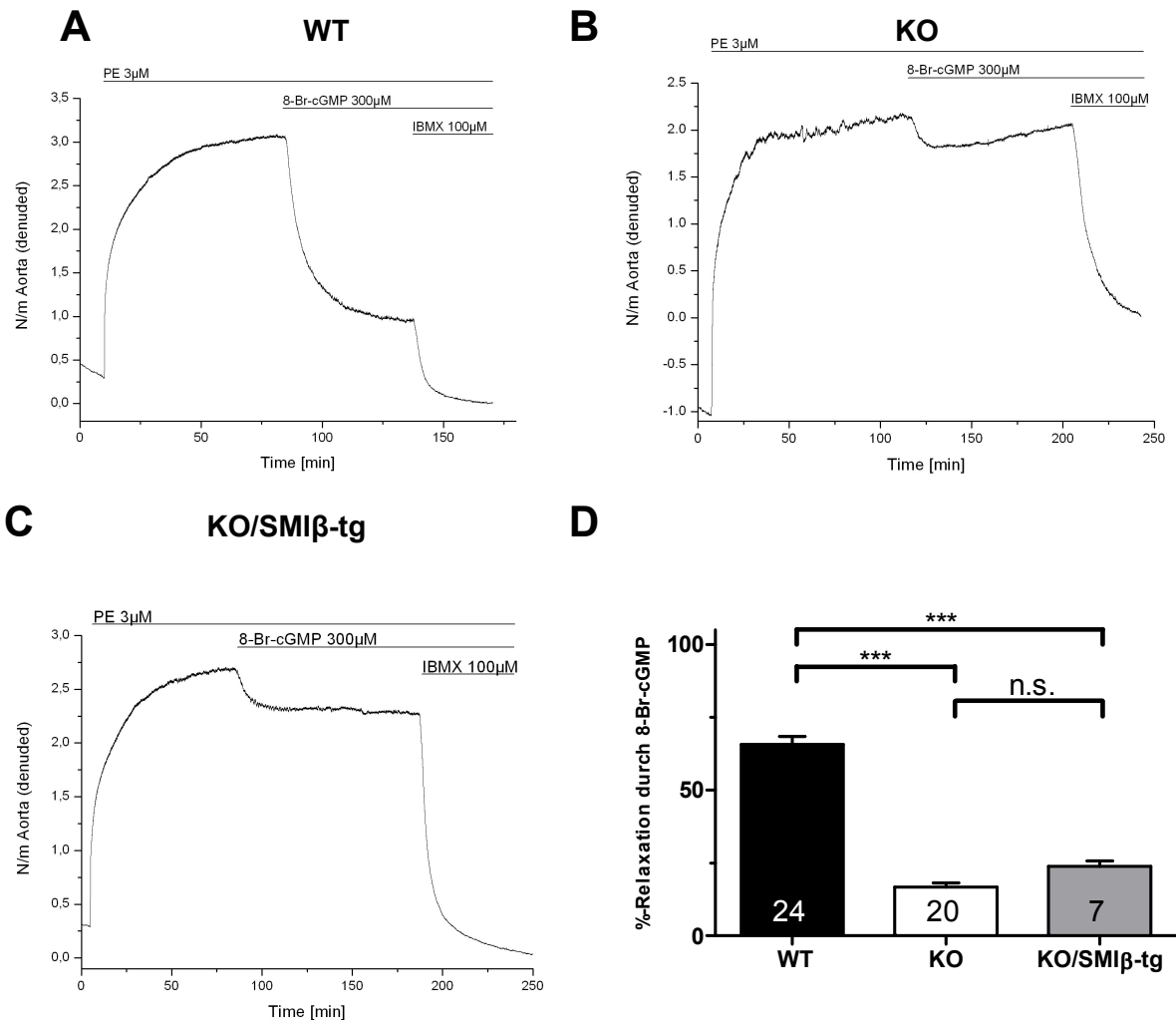


Abb. C.4. Relaxation von Aorta durch 8-Br-cGMP. Original-Aufzeichnungen von Wildtyp- (A), IRAG-KO- (B) und IRAG-KO/SMI β -tg- (C) Aortengewebe bei zerstörtem Endothel. (D) Statistische Unterschiede zwischen Wildtyp-, IRAG-KO- und IRAG KO/SMI β -tg- Aorten. Die Relaxation von IRAG-defizientem Gewebe und IRAG-KO/cGKI β überexprimierendem Gewebe ist im Vergleich zum Wildtypgewebe stark eingeschränkt. Die Anzahl der Versuche ist in den jeweiligen Säulen angegeben. Die exakten Zahlenwerte sind im Text zu finden.

C.4.2. Wirkung von 8-Br-cGMP auf Colon und Jejunum

Um zu überprüfen, ob auch anderes glattmuskuläres Gewebe von einem Defekt in der Relaxation betroffen ist, wurden die unter C.4.1. gezeigten Experimente auch mit Gewebestücken von distalem Colon und medianem Jejunum durchgeführt. IRAG-defizientes Colon zeigte im Vergleich zu Wildtyp keine veränderte Kraftentwicklung durch Stimulation mit 10 μ M Carbachol (WT: 0.63 ± 0.10 N/m; KO: 0.49 ± 0.12 N/m). Eine Applikation von 300 μ M 8-Br-cGMP relaxierte den Ausgangstonus von Wildtyp-Colon um 84.1 ± 1.2 %, wohingegen IRAG-KO Gewebe nur eine Relaxation von 41.8 ± 3.4 % zeigte. KO/SMI β -tg Gewebe reagierte trotz normaler cGKI β -Expression mit einer Relaxation von 56.9 ± 4.1 %. Beides war jeweils signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Wildtyp-Gewebe.

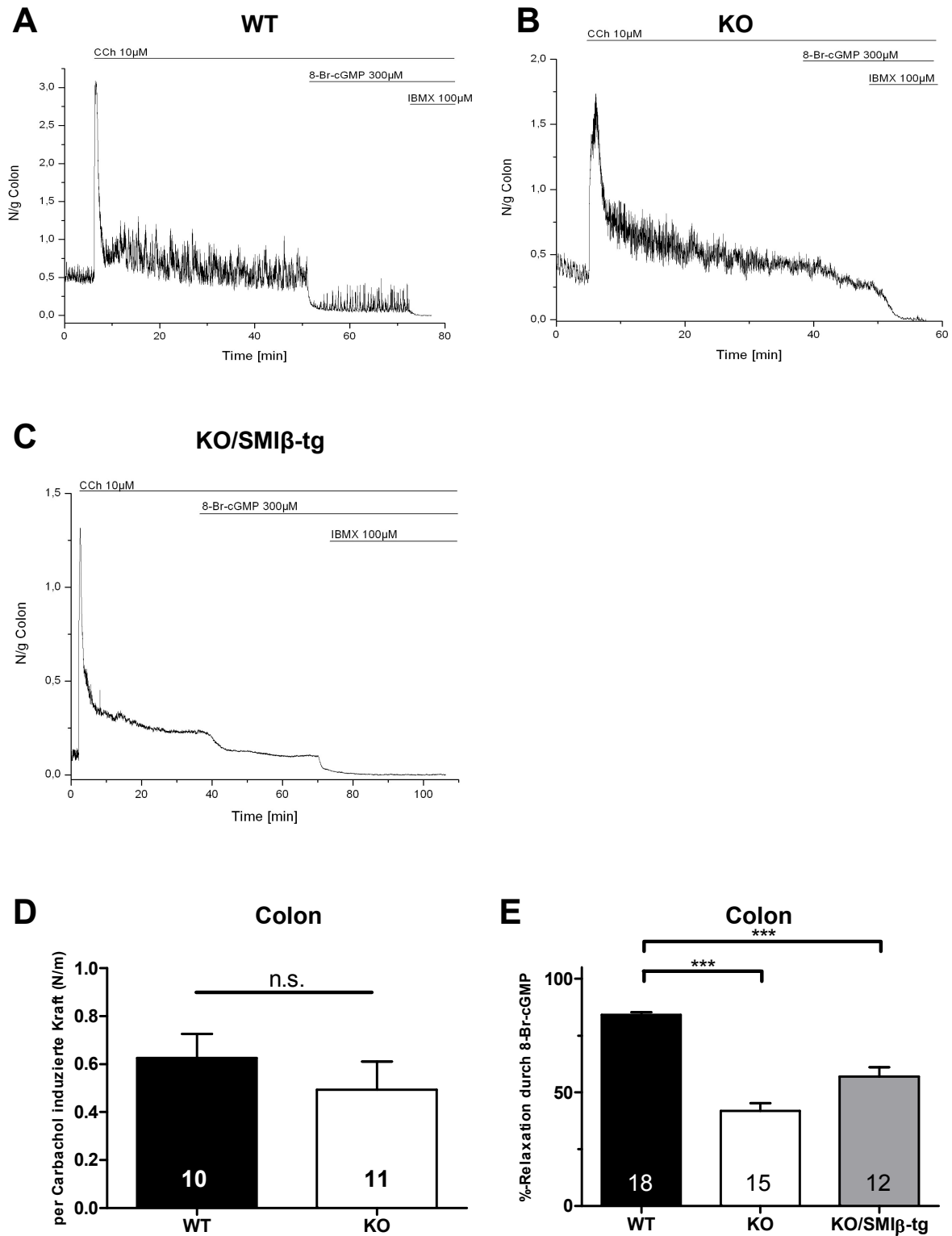


Abb. C.5. Relaxation von Colon durch 8-Br-cGMP. Original-Aufzeichnungen von Wildtyp- (A), IRAG-KO- (B) und IRAG-KO/SMI β -tg (C) Colon. (D) Kraftentwicklung durch Carbachol (10 μ M). (E) Statistische Unterschiede zwischen Wildtyp, IRAG-KO und IRAG KO/SMI β -tg Colongewebe. Die Relaxation von IRAG-defizientem Gewebe und IRAG^{-/-}/cGKI β überexprimierendem Gewebe durch 8-Br-cGMP (300 μ M) ist im Vergleich zum Wildtypgewebe stark eingeschränkt. Die N-Zahl ist jeweils in der Säule angegeben. Die exakten Zahlenwerte sind im Text wiedergegeben.

Gewebe aus medialem Jejunum zeigte ein ähnliches Verhalten. IRAG-KO Gewebe relaxierte um $53.8 \pm 1.9 \%$ im Gegensatz zu Wildtyp Jejunum mit $78.0 \pm 1.8 \%$. Eine Wiederherstellung des Expressionsniveaus von cGKI β auf Normalniveau zeigte auch hier weiterhin einen Defekt in der Senkung des Ausgangstonus um $63.1 \pm 2.8 \%$ durch Applikation von 8-Br-cGMP (300 μ M).

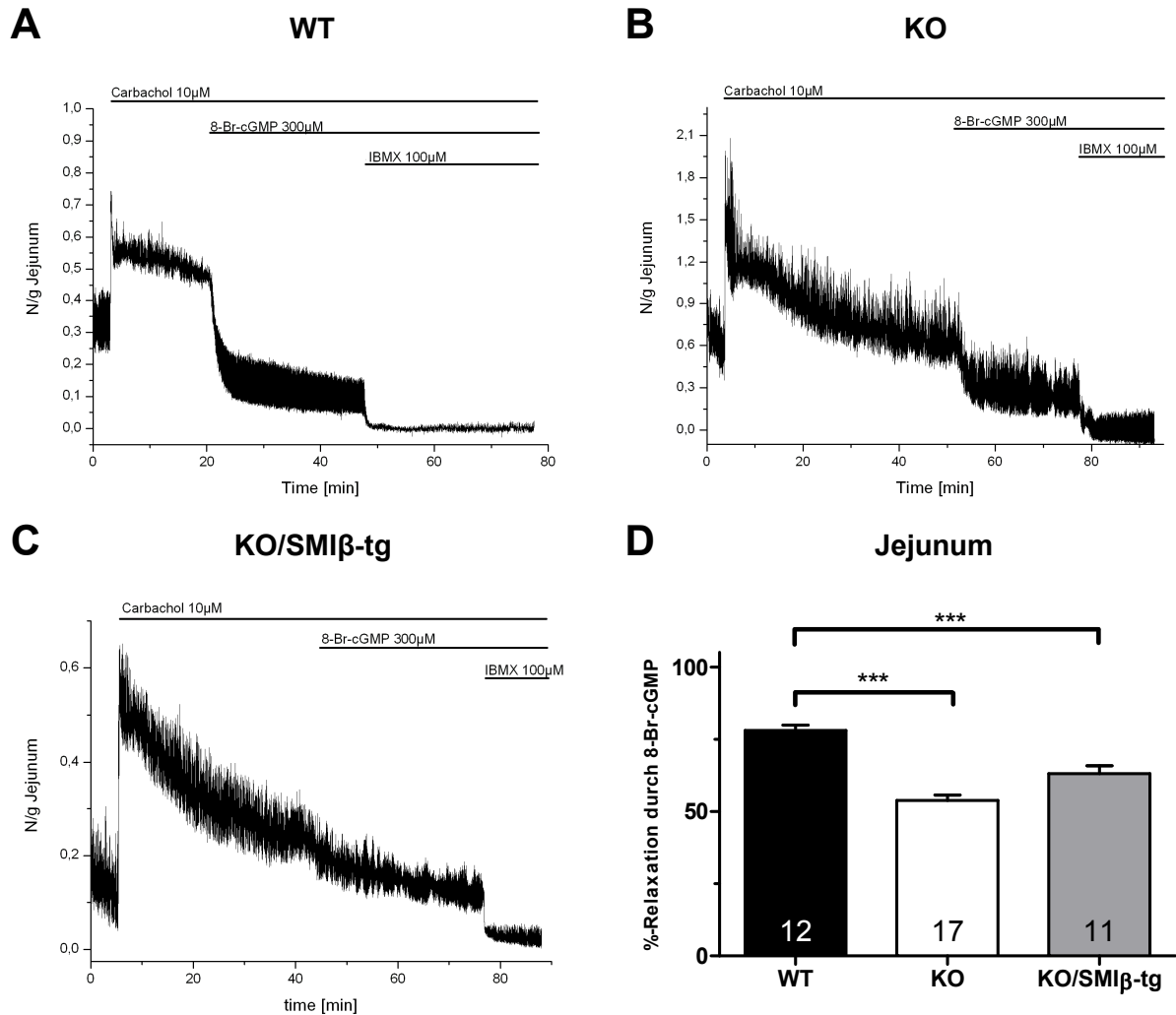


Abb. C.6. Relaxation von Jejunum durch 8-Br-cGMP. Original-Aufzeichnungen von Wildtyp- (A), IRAG-KO- (B) und IRAG-KO/SMI β -tg- (C) Jejunum. (D) stellt die statistischen Unterschiede dar. Die Relaxation von IRAG-defizientem- und IRAG^{-/-}/SMI β -tg- Gewebe durch 8-Br-cGMP (300 μ M) ist im Vergleich zum Wildtypgewebe eingeschränkt. Die N-Zahl ist in den Säulen gekennzeichnet. Die exakten Zahlenwerte sind im Text wiedergegeben.

C.4.3. Effekte von DEA-NO auf Aorta und Colon

Unter C.4.1. und C.4.2. wurden die Effekte von exogen appliziertem cGMP auf glattmuskuläres Gewebe von IRAG-KO und Wildtyp gezeigt. Für IRAG^{Δ12/Δ12} konnte ein Defekt in der Glattmuskelrelaxation mit 8-Br-cGMP bereits gezeigt werden (Geiselhöringer et al., 2004). Um zu überprüfen, ob eine defekte Relaxation auch in einem früheren Schritt der NO/cGMP-Kaskade vorhanden ist, wurde Stickstoffmonoxid in Form von DEA-NO exogen zugegeben. DEA-NO zerfällt bei 37°C mit einer Halbwertszeit von ca. 2 min und gibt dabei NO frei. Dieses diffundiert in das Gewebe und aktiviert in der glatten Muskelzelle die lösliche Guanylylzyklase. Die Effekte von DEA-NO bei einer Konzentration von 100 nM sind in Abb. C.7. gezeigt. Freigesetztes NO erniedrigte den Tonus von vorkontrahierter Wildtyp-Aorta um 77.7 ± 4.1 %, den von IRAG-KO-Gewebe um 60.9 ± 3.5 % und den von IRAG-Δ12 um 46.3 ± 1.5 %. Bei allen Geweben wurde vor dem Versuch das Endothel zerstört, um endogene Effekte von endothelialer NO-Synthase (zusätzlich Blockade durch L-NAME 100 μM) auszuschließen. Auch Colon transgener Tiere (IRAG^{-/-}, KO/SMIβ-tg und IRAG- Δ12) zeigte einen Defekt in der Relaxation (nicht abgebildet) durch 30 μM DEA-NO im Vergleich zum Wildtyp (WT: 74.4 ± 1.9 %; IRAG^{-/-}: 41.2 ± 3.8 %; KO/SMIβ-tg: 56.0 ± 5.3 %; IRAG-Δ12: 36.5 ± 3.7 %). Die Unterschiede waren insgesamt jeweils geringer als bei 8-Br-cGMP, jedoch ebenso signifikant.

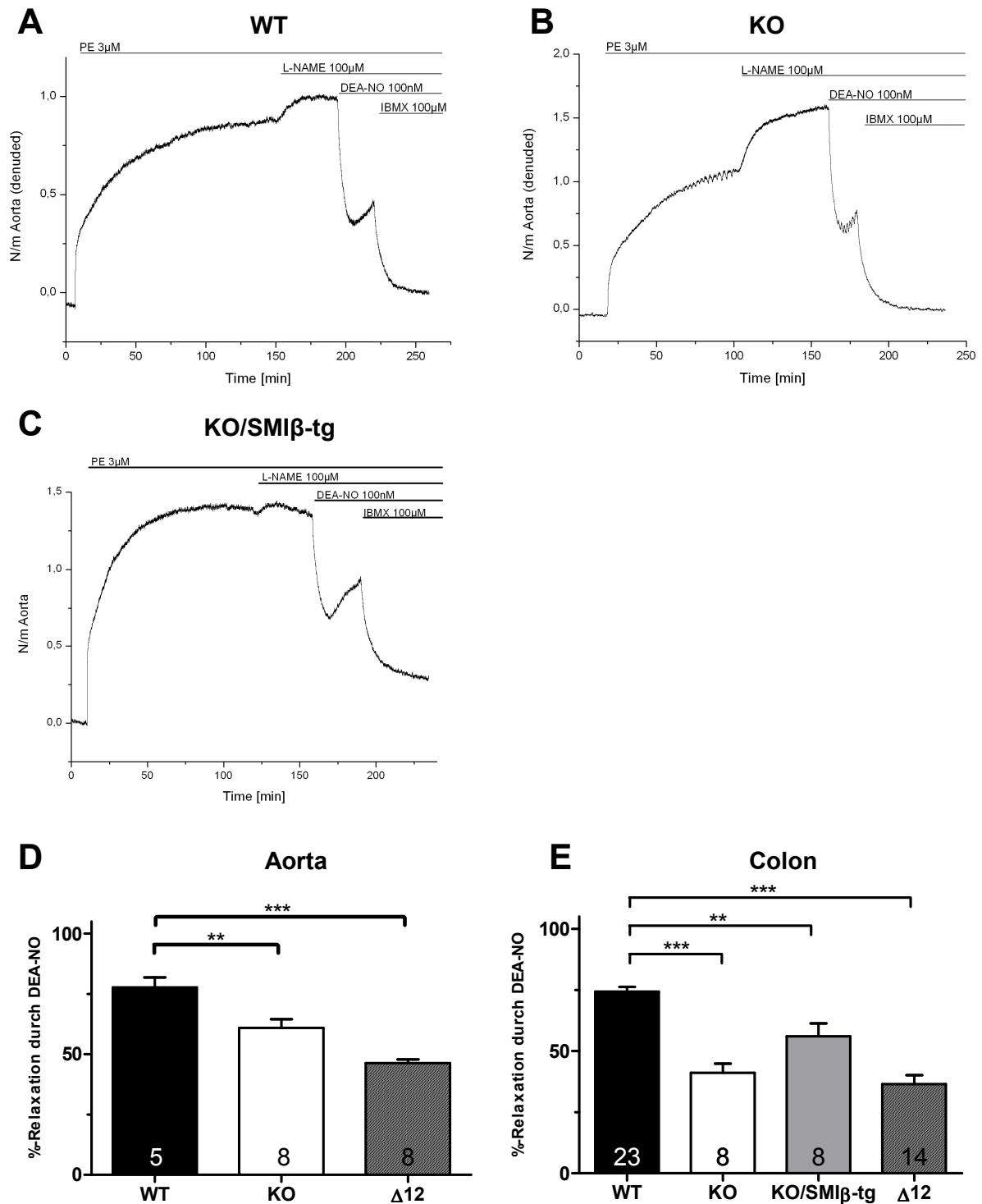


Abb. C.7. Tonuserniedrigung bei Aorta und Colon durch DEA-NO. Original-Aufzeichnungen von Wildtyp- (A), IRAG-KO- (B) und IRAG-Δ12- (C) Aorta bei zerstörtem Endothel. (D) Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Aorten der beiden IRAG-Linien und von Kontrollgeweben. Die Relaxation von IRAG-defizientem- und IRAG-Δ12- Gewebe durch DEA-NO (100 nM) ist im Vergleich zum Wildtypgewebe nur geringfügig unterschiedlich, jedoch weiterhin signifikant. (E) Statistische Auswertung von Colon-Gewebe bezüglich der Applikation von DEA-NO (30 μM). Zusätzlich dargestellt ist die Relaxation von SMIβ-tg/KO-Gewebe. Die Ziffern in den Säulen geben die Anzahl der Versuche wieder, die exakten Werte sind im Text angegeben.

C.4.4. Effekte von endogenem NO auf die thorakale Aorta

Physiologisch wird Stickstoffmonoxid im Endothel durch endotheliale NO-Synthase (eNOS) Calcium/Calmodulin-abhängig synthetisiert (Venema et al., 1996 und Hellermann et al., 1997). Die Aktivierung von eNOS erfolgt dabei einerseits durch Scherkräfte, überwiegend aber durch intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. Acetylcholin (über M_3 -Rezeptor) oder auch Bradykinin (über B_2 -Rezeptor) stimulieren $\text{G}_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren, wodurch es zur Synthese von IP_3 und folglich zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern kommt. Synthetisiertes NO diffundiert dann in die glatten Muskelzellen und führt dort zur Aktivierung von sGC und damit zur Glattmuskel-Relaxation.

Dieser Effekt lässt sich im Myographieexperiment durch Zugabe von Acetylcholin und damit über Aktivierung von muskarinergen M_3 -Rezeptoren am Endothel erreichen. Somit synthetisieren Aortenringe mit intaktem Endothel nach Applikation von Acetylcholin endogenes Stickstoffmonoxid (Jaiswal et al., 1991), welches eine Relaxation verursacht. Bei zerstörtem Endothel würde Acetylcholin über M_3 -Rezeptoren an den glatten Muskelzellen zu einer Kontraktion des Aortengewebes führen. Dieser kontrahierende Effekt wird aber bei Endothel-vermittelter NO-Synthese konterkariert.

Im nachfolgenden Experiment sollte untersucht werden, ob durch die endogene NO-Synthese und die darauf folgende cGKI-Aktivierung ebenso ein Defizit in der Relaxation von IRAG-KO oder IRAG-mutiertem Aortengewebe besteht.

Aortensegmente mit intaktem Endothel wurden nach Vorkontraktion durch Phenylephrin ($1 \mu\text{M}$) mit Acetylcholin ($1 \mu\text{M}$) relaxiert. Kontrollgewebe aus Wildtyp-Nagern reduzierte dabei den Phenylephrin-induzierten Tonus im Mittel um $61.0 \pm 2.6 \%$, wohingegen sich IRAG- $\Delta 12$ - und IRAG^{-/-}-Aortenringe nur um $21.6 \pm 1.8 \%$, beziehungsweise $13.4 \pm 1.5 \%$ entspannten.

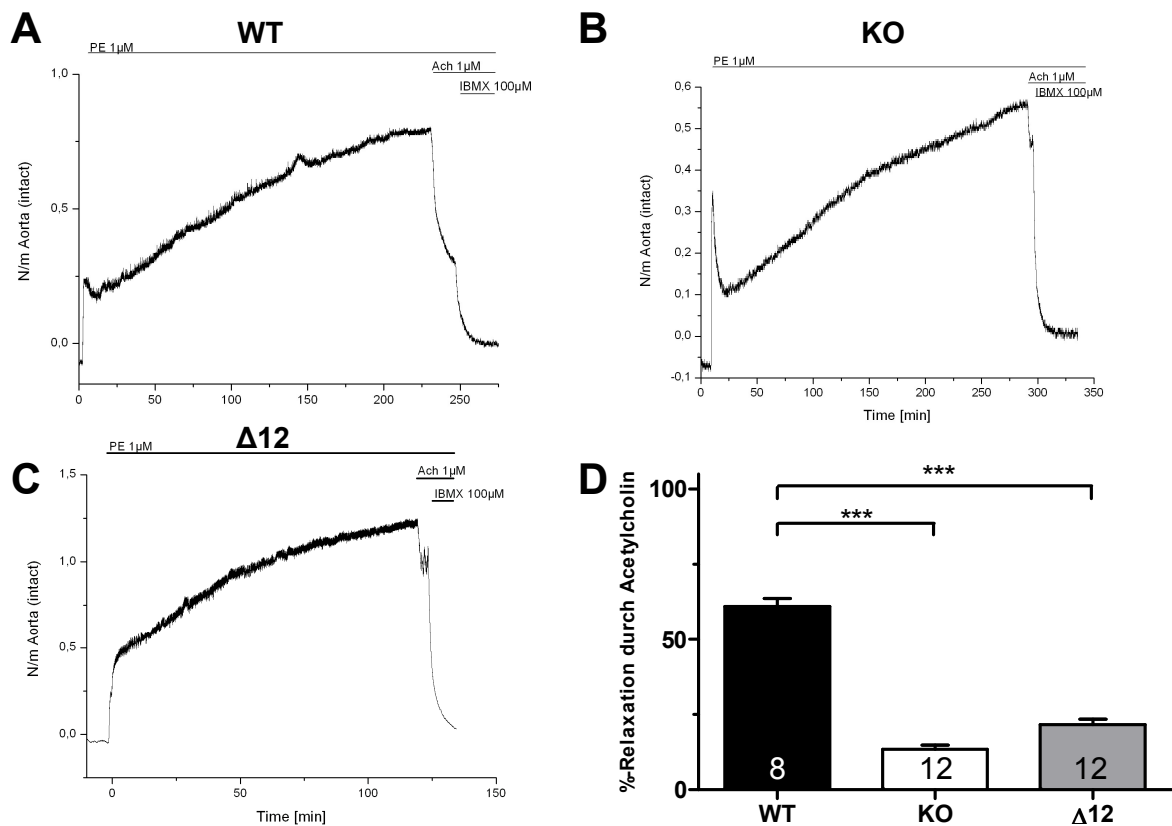


Abb. C.8. Acetylcholin relaxiert Aortengewebe. Original-Aufzeichnungen von Wildtyp- (A), IRAG-KO- (B) und IRAG- $\Delta 12$ - (C) Aorta bei intaktem Endothel. (D) Statistik über die Differenzen zwischen Aorten der beiden IRAG-Linien und von Kontrollgeweben. Die Relaxation des Phenylephrin-induzierten Tonus von IRAG-KO- und IRAG- $\Delta 12$ - Gewebe durch Acetylcholin (1 μ M) ist im Vergleich zum Wildtypgewebe signifikant vermindert. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Versuche an, die exakten Werte sind im Text wiedergegeben.

C.4.5. Aktivierung von pGC in der thorakalen Aorta

Neben der Synthese durch lösliche Guanylylzyklase im Zytosol entsteht cGMP auch durch Aktivierung von membranständiger Guanylylzyklase (partikulärer Guanylylzyklase, pGC) durch Natriuretische Peptide (NPs). Hierdurch bildet sich cGMP überwiegend in den Regionen der Zellmembran (Nausch et al., 2008). Es stellte sich die Frage, ob dieses cGMP ebenso über die cGKI-IRAG-Signalkaskade wirkt.

Bei Aortenringen mit zerstörtem Endothel wurde mit Phenylephrin eine Vorkontraktion eingeleitet (zusätzlich wurde endotheliale NO-Synthase durch L-NAME (100 μ M) blockiert). Nachdem der Tonus konstant blieb, wurde ANP in einer finalen Konzentration von 500 pM zugegeben. Dadurch kam es zu einem Tonusabfall, der im Wildtyp-Gewebe signifikant stärker war als bei IRAG-defizientem- oder IRAG-mutiertem ($\Delta 12$)- Gewebe (WT: 72.3 ± 6.3 %; IRAG-KO: 37.9 ± 3.1 %; IRAG- $\Delta 12$: 42.5 ± 3.5 %).

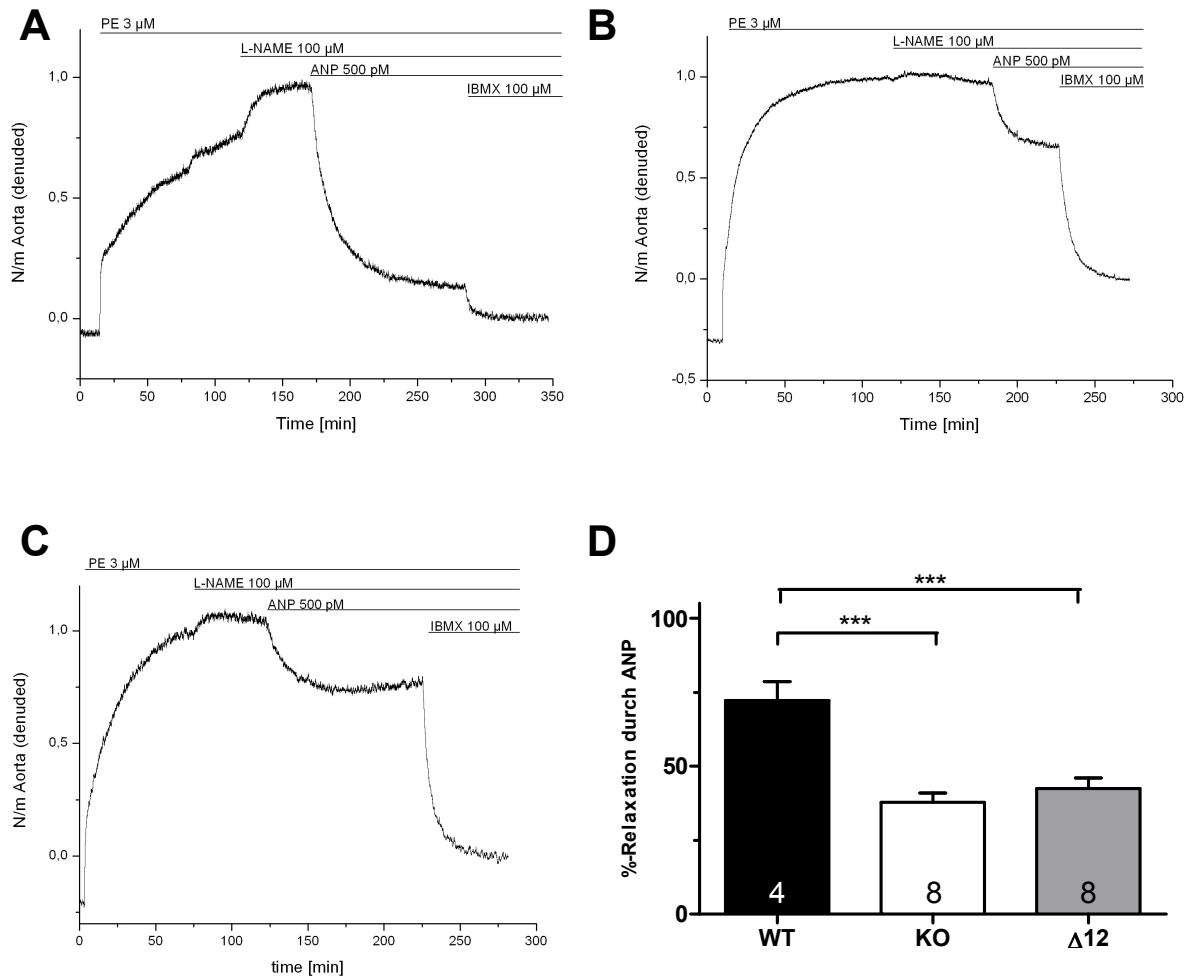


Abb. C.9. Aktivierung von pGC durch ANP. Original-Aufzeichnungen von Wildtyp- (A), IRAG-KO- (B) und IRAG- $\Delta 12$ - (C) Aorta bei zerstörtem Endothel und Relaxation durch ANP. (D) zeigt den signifikanten Unterschied in der Relaxation nach Zugabe von ANP (500 pM) zwischen den IRAG^{-/-}- und den IRAG ^{$\Delta 12/\Delta 12$} -Aorten und der Wildtyp-Kontrolle. Die prozentualen Relaxationen sind im Text angegeben, die Zahlen in der Säule verdeutlichen die Versuchsanzahl.

C.4.6. K85-Depolarisation von Aortengewebe

Neben einer hormonell bedingten Kontraktion über $G_{\alpha q/11}$ -gekoppelte 7-TM-Rezeptoren kann glattmuskuläres Gewebe auch über hohe Konzentrationen von extrazellulärem Kalium (K85, 85 mM K^+) durch Depolarisation kontrahiert werden. Der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom, der die Kontraktion verursacht, erfolgt dabei über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($Ca_v1.2$) (Moosmang et al., 2003, Wegener et al., 2004). Um zu analysieren, ob IRAG an der Tonusniedrigung von K85 depolarisiertem Gewebe beteiligt ist, wurden Aortenringe mit zerstörtem Endothel nach der Äquilibration durch Mediumwechsel (CO_2 -Tyrode durch K85-Tyrode ersetzt) kontrahiert. Parallel erfolgte eine Blockade restlicher intakter eNOS durch L-NAME (100 μM). Nach Erreichen eines stabilen Plateaus wurde mit 300 μM 8-Br-cGMP relaxiert. Wildtyp-Aortenringe entspannten dabei um 65.0 ± 2.0 %, IRAG^{-/-}-Gewebe um 69.2 ± 0.8 %, bezogen auf den durch Depolarisation induzierten Tonus.

Nifedipin, ein gebräuchlicher Calciumantagonist aus der Klasse der Dihydropyridine zur Behandlung der arteriellen Hypertonie, blockiert selektiv L-Typ-Calciumkanäle (Taira, 2006).

Kontrollversuche mit Nifedipin-Vorinkubation zeigten, dass der Ca^{2+} -Einstrom bei Depolarisation über $\text{Ca}_v1.2$ vermittelt wird. Eine Kontraktion konnte dadurch vollständig aufgehoben werden.

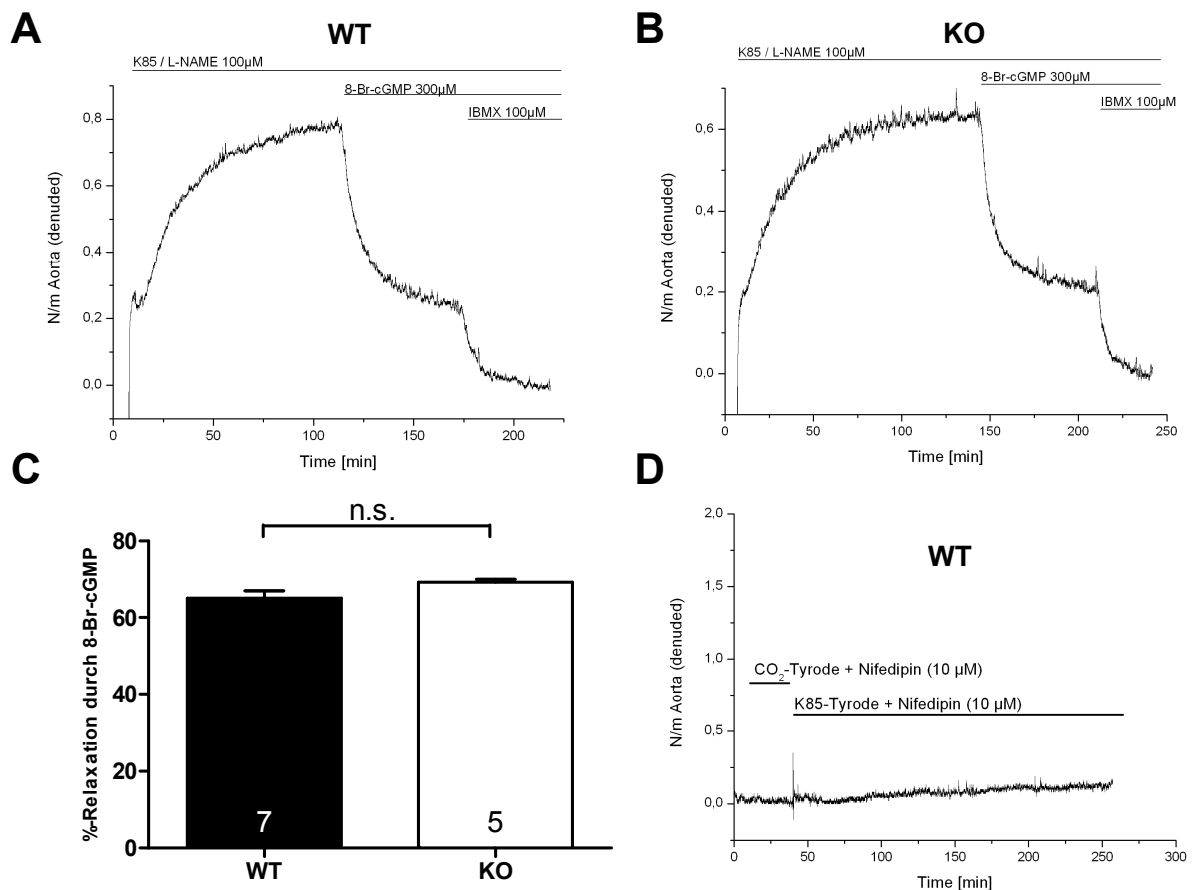


Abb. C.10. K85-Depolarisation von Aortengewebe. Aufzeichnungen von **(A)** Wildtyp- und **(B)** IRAG-defizienten Aortenringen nach K85-Depolarisation und anschließender Relaxation durch 8-Br-cGMP (300 μM). **(C)** Statistische Auswertung von Wildtyp und IRAG-KO-Geweben. Bezüglich der Tonussenkung konnte zwischen beiden Gewebearten kein Unterschied festgestellt werden. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Experimente wieder, statistische Zahlenwerte sind im Text beschrieben. **(D)** Originalaufzeichnung einer K85-Depolarisation bei gleichzeitiger Blockade von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen durch Nifedipin (10 μM).

C.5. Bestimmung von cGMP in der thorakalen Aorta

Eine verminderte cGMP-Synthese könnte ebenfalls zu einer beeinträchtigten Relaxation von glattmuskulären Geweben nach Aktivierung der cGKI-Signalkaskade führen. Eine Expressionsanalyse nach C.3. zeigte, dass in den bisher untersuchten Geweben (Aorta und Colon) kein Unterschied in der Expression von sGC β 1 festzustellen ist. Dennoch könnte die Aktivität der löslichen Guanylylzyklase in den Geweben der transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt sein. Daher wurde eine Konzentrationsbestimmung von synthetisiertem cGMP nach Stimulation mit DEA-NO durchgeführt. Alters- und geschlechtsgleichen Tieren wurden die Aorten entnommen und halbiert. Die eine Hälfte diente zur Bestimmung des systemimmanenten Kontrollwertes und wurde mit Vehikel (Stammlösung 10 mM NaOH, finale Konzentration 10 μ M), die andere Hälfte mit DEA-NO (1 min, 1 μ M) stimuliert. Anschließend wurde das Gewebe aufgeschlossen, aus dem Überstand wurde dann Protein durch Trichloressigsäure-Fällung entfernt. Die cGMP-Konzentration wurde am Schluss per Enzym-Immuno-Assay (B.11.1.) analysiert (Detektionslimit: 1 pmol/ml). Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde im Kit enthaltenes cGMP verwendet. Um ein genaues Ergebnis zu erhalten und Matrixeffekte auszuschließen, wurden die Proben in verschiedenen Verdünnungen in Triplets vermessen und jeweils der Mittelwert gebildet.

Die unstimulierten Gewebe wiesen eine nahezu nicht detektierbare cGMP-Basalmenge auf. Der Anstieg in der Wildtyp-Aorta war ca. 11-fach, der von IRAG^{-/-} 12-fach und der von IRAG- Δ 12-Aorten ca. 20-fach, ausgehend vom Basalwert. Die absolute Konzentration an cGMP unterschied sich jedoch nicht signifikant in den Aorten aller drei Mauslinien.

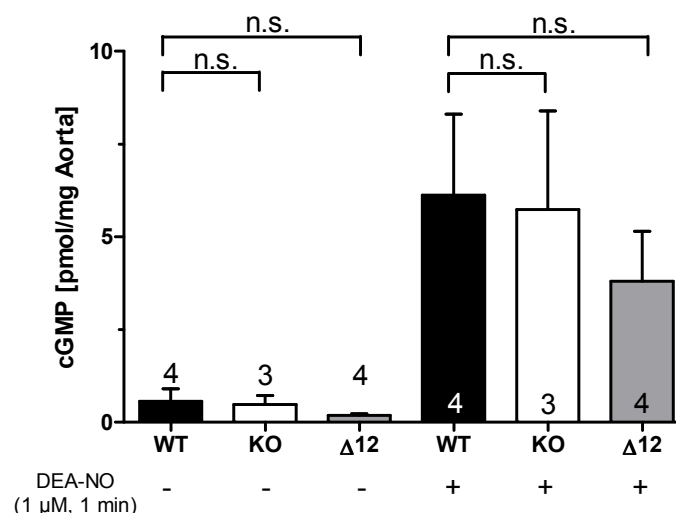


Abb. C.11. cGMP-Analyse mittels EIA. Statistische Auswertung von Wildtyp-, IRAG-KO- und IRAG- Δ 12 Aortengewebe mit und ohne Stimulation mit DEA-NO (1 μ M, 1 min). Die basale cGMP-Konzentration (ohne Stimulation) war nahezu nicht mehr detektierbar, der Anstieg von cGMP nach Stimulation mit dem NO-freisetzenden Agens unterschied sich nicht zwischen den drei Mauslinien. Die exakten Zahlenwerte sind im Text wiedergegeben, die Zahlen auf den Säulen, bzw. in den Säulen gibt die Anzahl der verwendeten Aorten an.

Die Proben von Wildtyp, IRAG^{-/-} und IRAG^{Δ12/Δ12}, die aus der Vorbereitung für die Detektion mit dem EIA gewonnen wurden, wurden parallel auch per HPLC (nochmals verdünnt, im Detail siehe B.11.2.) analysiert. Diese neu entwickelte Methode hatte den Vorteil, dass sie in einem größeren linearen Bereich anwendbar (aufgrund der Logarithmierung der Konzentration zeigen EIA eine schmalen linearen Bereich), erheblich kostengünstiger und viel schneller (innerhalb von einem Tag) als der EIA durchzuführen ist. Es muss aber beachtet werden, dass die zu bestimmenden zyklischen Nukleotide nicht unter der Nachweisgrenze (Detektionslimit: 500 pg oder 2 pmol auf der Säule, siehe B.11.2.) liegen und Matrixeffekte von Restproteinen keinen Einfluss haben.

Wildtyp-Aorten wiesen nach der Stimulation mit DEA-NO eine cGMP-Konzentration von 6.7 ± 2.1 pmol/mg Aorta, IRAG-KO ein cGMP-Level von 5.5 ± 2.7 pmol/mg Aorta und IRAG^{Δ12/Δ12} eine cGMP-Konzentration von 2.9 ± 0.8 pmol/mg Aorta auf. Diese Werte waren jeweils nicht signifikant unterschiedlich.

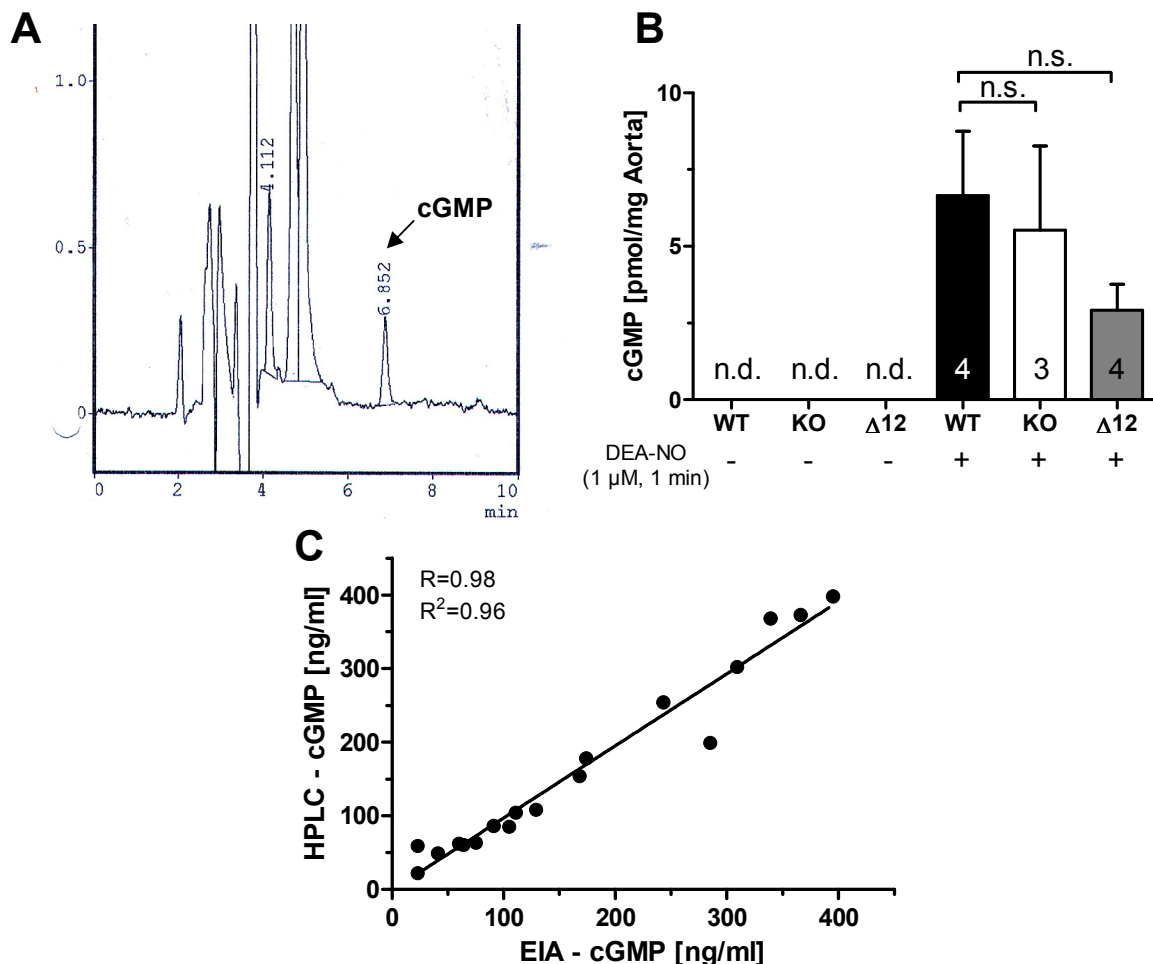


Abb. C.12. cGMP-Analyse mittels HPLC (A) Beispielchromatogramm einer HPLC-Analyse. Die Retentionszeit von cGMP ist mit einem Pfeil markiert und lag zwischen 6.5 und 7.5 min. **(B)** Vergleich von unstimulierten und mit DEA-NO stimulierten Aorten aus WT, IRAG-KO- und IRAG-Δ12-Aorten. Die Basallevel waren nicht detektierbar. Bei Stimulation ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den cGMP-Konzentrationen in den Geweben der einzelnen Mauslinien. **(C)** stellt die Methoden des EIA und der HPLC-Methode gegenüber. Eine hohe Korrelation wurde ermittelt, was einen Vergleich der Ergebnisse (hier in ng/ml Probe dargestellt) aus EIA und HPLC erlaubt.

C.6. Radiotelemetrische Blutdruckbestimmung

In C.4. wurde ein Defekt in der glatten Muskulatur von IRAG-KO Gewebe, schwerpunktmäßig in isolierten Gefäßen (Aorta), festgestellt. Um zu analysieren, ob dieser Gewebsdefekt Einflüsse auf den gesamten Organismus der IRAG^{-/-}-Maus hat, wurden radiotelemetrische Blutdruckmessungen durchgeführt. Dieses System hat gegenüber der „Tail-cuff-Plethysmographie“ den Vorteil, dass der Blutdruck in Echtzeit über eine längere Periode gemessen werden kann. Da eine Gewöhnung des Tiers an die Prozedur entfällt, können genauere Ergebnisse erzielt werden. Die „Tail-Cuff“-Methode erfordert ein Gewöhnen der Tiere an die Prozedur der Blutdruckbestimmung. Mäuse werden hierbei in eine beheizte Röhre gesetzt, um eine verstärkte Durchblutung der Schwanzarterie hervorzurufen. Die Blutdruckmessung erfolgt dann durch eine angelegte Druckmanschette mit computerunterstützter Aufzeichnung der Daten.

Bei der radiotelemetrischen Methode spielen somit Effekte von Narkosen oder versuchsbedingte Stresssituationen eine untergeordnete Rolle. Seit Einführung dieses Systems wird die klassische Tail-cuff-Plethysmographie nach und nach abgelöst (Van Vliet et al., 2000).

Frühestens fünf Tage nach der Implantation des Transmitters (B.5.) wurden die wachen, frei beweglichen Tiere einzeln in Typ II Käfigen (Wasser- und Futterzufuhr ad libitum) auf Empfängerplatten gestellt, die in Echtzeit kontinuierlich den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP, mean arterial blood pressure) aufzeichnen und per Computersystem speichern konnten. Der MAP berechnet sich näherungsweise aus der Summe des diastolischen Druck und dem Drittel der Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck. Genauer gesagt ist der MAP das Produkt aus Herzauswurfleistung und der Funktionalität (Widerstand, Dehnbarkeit) der Aorta, zu dem der zentrale Venendruck addiert wird. Zusätzlich konnten mittels Radiotelemetrie noch weitere Parameter wie Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Blutdruck, Pulsdruck (Differenz aus systolischem und diastolischem Druck) und Aktivität (Ereignisse pro Zeiteinheit) der Tiere bestimmt werden.

C.6.1. Basale Parameter von wachen und schlafenden Tieren

Zur Ermittlung der basalen Daten von erwachsenen (10-15 Wochen), männlichen Wildtyp- und IRAG-KO-Tieren wurde eine Messung über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt. Daraus wurden Daten über drei Licht- und drei Dunkelphasen (jeweils 12 h) gewonnen. Die Werte jeder Linie wurden pro Tag (24 h Periode) und pro Licht und Dunkelpphase ausgewertet und gemittelt.

Im Zeitraum von 24 h konnten keine Differenzen hinsichtlich mittlerem arteriellen Druck (MAP), Pulsdruck, Herzfrequenz (HF) und Aktivität gefunden werden (MAP WT: 109.1 ±

3.9 mmHg, KO: 103.9 ± 3.1 mmHg; Pulsdruck WT: 27.7 ± 7.8 mmHg, KO: 33.5 ± 4.5 mmHg; Herzfrequenz WT: 502.7 ± 9.8 Schläge/min, KO: 544.0 ± 12.7 Schläge/min; Aktivität WT: 2.82 ± 0.42 Ereignisse/min, KO: 2.38 ± 0.13 Ereignisse/min).

Betrachtete man die Licht- und Dunkelphasen getrennt, so konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Werte für die oben genannten Parameter sind in der Lichtphase (Schlafperiode der Tiere) gleichermaßen reduziert im Vergleich zur Dunkelphase (aktive Phase der Nager). IRAG scheint somit in der Regulation des basalen Blutdrucks keine wesentliche Rolle zu spielen.

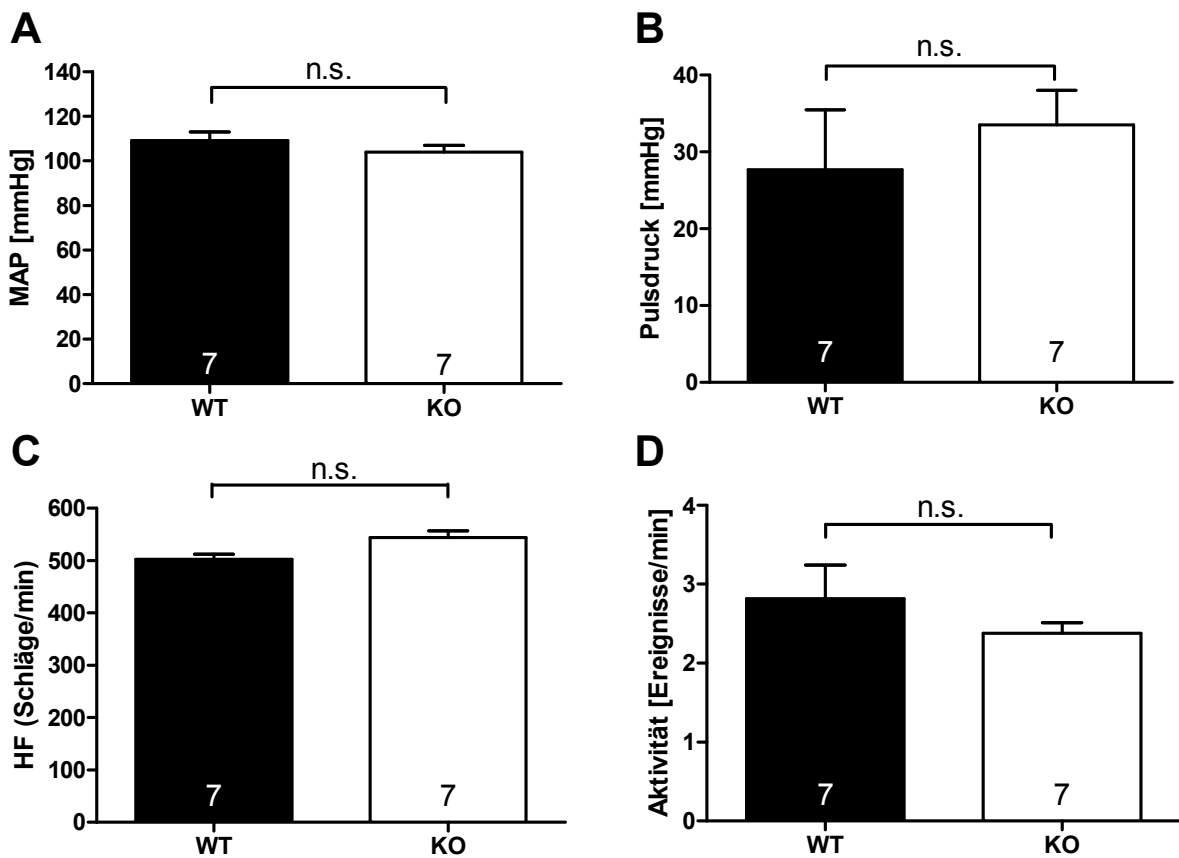


Abb. C.13. Basale Blutdruckdaten. Statistik im 24 h Zeitraum (über drei Tage gemittelt) über (A) mittleren arteriellen Druck (MAP), (B) Pulsdruck, (C) Herzfrequenz (HF) und (D) Aktivität von IRAG-WT- (Kontrolle) und IRAG-KO-Tieren. Bei allen Parametern sind keine signifikanten Unterschiede festgestellt worden. Eine Betrachtung der Licht- und Dunkelphasen (jeweils 12 h, nicht dargestellt) zeigte ebenfalls keine signifikanten Differenzen. Die Zahl in den Säulen gibt jeweils die Anzahl der Versuchstiere an.

C.6.2. Effekte von [cGMP]_i-erhöhenden Substanzen auf den MAP

Stickstoffmonoxid-freisetzende bzw. [cGMP]_i-erhöhende Pharmaka sind mittlerweile klinisch gut erprobt und werden deshalb auch routinemäßig zur Kupierung von Angina Pectoris Anfällen (Wimalawansa, 2008 und Kosmicki, 2009), zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (Eardley et al., 2010) oder der pulmonalen arteriellen Hypertonie (Archer et al., 2009) eingesetzt.

NO-generierende und damit [cGMP]_i-steigernde Pharmaka haben eine Blutdruck-senkende Wirkung. Die Effekte von Natriumnitroprussid (SNP) und DETA-NO (beides NO-freisetzende Pharmaka), und die von YC-1 (direkter, Stickstoffmonoxid unabhängiger Aktivator der löslichen Guanylylzyklase (Stasch and Hobbs, 2009)) auf den MAP wurde jeweils nach intraperitonealer Applikation (während der Lichtphase) an Mäusen mittels Telemetrie untersucht.

Die Versuchstiere wurden dabei wiederum mindestens 5 Tage nach der Operation in Typ II Käfige gesetzt und auf die Radioempfängerplatten gestellt. Nach einer Aufzeichnungsphase von mindestens einer halben Stunde wurden die Substanzen jeweils in folgenden Konzentrationen intraperitoneal appliziert:

SNP	2 mg/kg KG
DETA-NO	60 mg/kg KG
YC-1	10 mg/kg KG

Danach wurden die Tiere wieder in die Käfige gesetzt und die Daten für mindestens weitere zwei Stunden aufgezeichnet. Sowohl bei Wildtyp-Tieren als auch bei IRAG-defizienten Mäusen fiel der Blutdruck spontan ab. Bei allen Tieren war eine ausgeprägte Reflextachykardie zu beobachten. Die Intensitäten des Druckabfalls und der Herzfrequenzsteigerung waren jedoch bei YC-1 am geringsten.

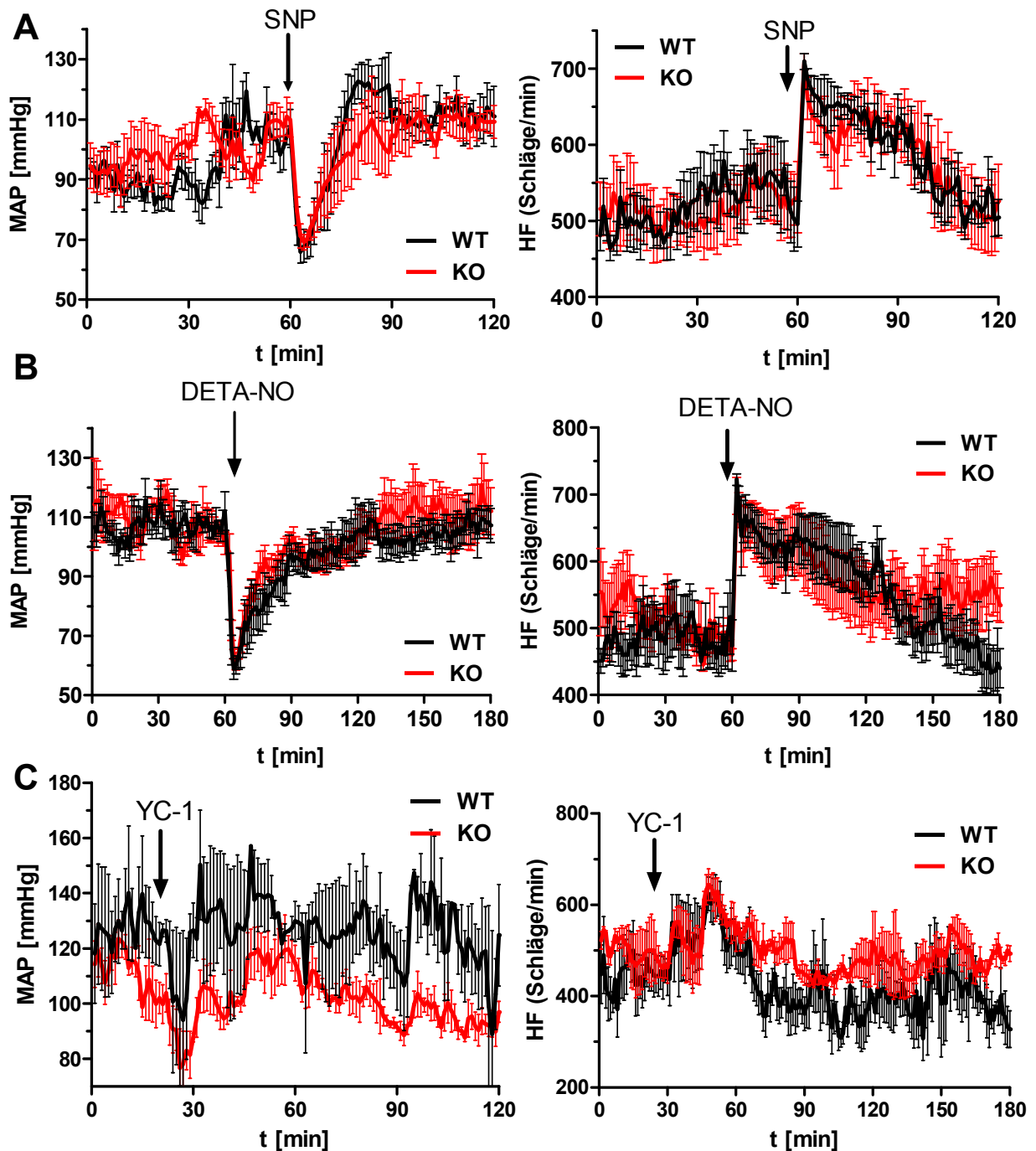


Abb. C.14. Effekte $[cGMP]_i$ -erhöhender Substanzen auf Blutdruck und Herzfrequenz. Originalaufzeichnungen des Blutdruckabfalls und der zeitlich entsprechend Verlauf der Herzfrequenzänderung bei wachen Tieren (Lichtphase) nach Applikation von **(A)** SNP (2 mg/kg KG, N jeweils 4) **(B)** DETA-NO (60 mg/kg KG, N jeweils 4) und **(C)** YC-1 (10 mg/kg KG, N jeweils 3). Bei allen Substanzen war initial ein ausgeprägter Abfall des MAP zu verzeichnen, der relativ schnell wieder auf Normalniveau anstieg, am schnellsten bei YC-1. Alle Substanzen bewirkten eine ausgeprägte Reflextachykardie, die bei YC-1 am wenigsten stark ausfiel.

Bei keiner der applizierten Substanzen trat hinsichtlich des Blutdruckabfalls oder bezüglich der Herzfrequenzänderung ein signifikanter Unterschied auf. Wildtyp-Tiere reagierten auf SNP-Applikation mit einer MAP-Reduktion von 38.7 ± 1.5 mmHg (IRAG-KO: 43.0 ± 4.9 mmHg), auf DETA-NO fiel der Druck um Mittel um 48.6 ± 4.4 mmHg (IRAG-KO: 39.7 ± 4.8 mmHg) und beim sGC-Aktivator YC-1 reduzierte sich der mittlere arterielle Druck beim Wildtyp um 36.0 ± 12.1 mmHg und bei IRAG-defizienten Tieren um 30.3 ± 3.4 mmHg (Abb. C.15.).

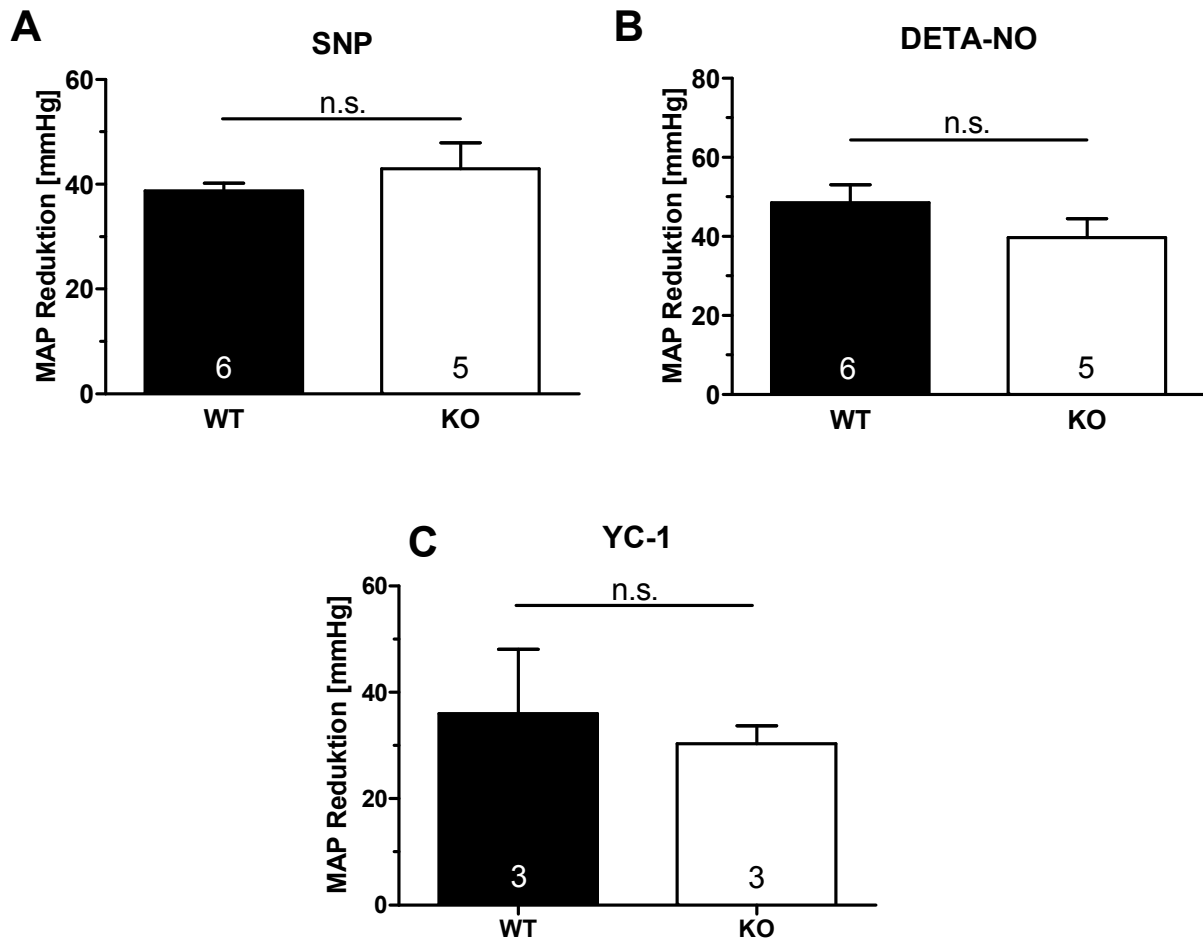


Abb. C.15. Statistische Auswertung des Blutdruckabfalles nach intraperitonealer Applikation von (A) SNP, (B) DETA-NO und (C) YC-1. Bei allen drei Substanzen war eine ausgeprägte Reduktion des Drucks mit Reflextachykardie (siehe Abb. C.14.) zu verzeichnen. Signifikante Unterschiede traten dabei nicht auf. Die exakten Zahlenwerte sind im Text wiedergegeben, die Ziffern in den Säulen geben die Anzahl der Versuchstiere wieder.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IRAG^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern keinen veränderten Blutdruck unter physiologischen Basalbedingungen (Licht- und Dunkelphase) aufweisen. Auch bei einer Applikation von [cGMP]_i-steigernden Substanzen war die Blutdruckänderung und Blutdruckanpassung von IRAG^{-/-}- und Wildtyp-Tieren in einem Zeitraum von ca. 2 Stunden identisch.

C.7. Effekte einer schweren, LPS-induzierten Sepsis

Um einen Einblick in eine mögliche pathophysiologische Bedeutung von IRAG für die Blutdruckregulation zu erhalten, wurde bei IRAG-KO-Tieren und Wildtyp-Mäusen eine schwere Sepsis durch intraperitoneale Applikation von *E.coli*-Lipopolysacchariden (LPS) induziert. Während einer Sepsis kommt es zur massiven NO-Generierung durch induzierbare NO-Synthase, dieses wiederum aktiviert sGC und nachgeschaltete Signalkaskaden (Kleinert et al., 2003, Russell, 2006, siehe auch Einleitung A.6.).

C.7.1. Veränderung des MAP bei WT- und IRAG-KO-Tieren

Jeweils drei maskulinen Wildtyp- und altersgleichen (10-15 Wochen) IRAG-defizienten Nagern wurde nach B.5. ein Radiotransmitter zur Blutdruckbestimmung implantiert. Nach einer Regenerationsphase von mindestens 5 Tagen wurde den Tieren 10 mg/kg KG LPS (in 500 µl isotoner NaCl-Lösung) intraperitoneal injiziert. Im Anschluss wurden die Tiere auf Empfängerplatten gestellt und der Blutdruck für mindestens 6 h telemetrisch aufgezeichnet. Danach erfolgte eine Euthanasie durch Isofluran-Anästhesie und anschließender Dekapitation.

Während der LPS-Phase wurden die Tiere laufend, jedoch ohne sie zu stören, beobachtet, um bei ggf. auftretenden Komplikationen (Schnappatmung, stark ausgeprägte Kyphose, keine Bewegung des Tieres nach manueller Stimulation/Berührung) die vorzeitige Tötung des Tieres einleiten zu können.

Die Nager zeigten zunächst kein auffälliges Verhalten, jedoch war bei den Wildtyp-Tieren nach ca. 60 bis 90 min ein starker Abfall des MAP zu verzeichnen, der bei den IRAG-KO-Tieren nicht festzustellen war. Ausgehend von im Mittel 103.1 mmHg (WT) und 100.6 mmHg (KO) in den ersten 110 min reduzierte sich der Druck bei den Wildtypen signifikant im Mittel auf 75.4 mmHg und bei KO-Tieren nicht signifikant auf 97.3 mmHg (Zeitraum von 150 bis 360 min nach LPS-Applikation).

Nach etwa 3 bis 4 h zeigten Wildtyp-Tiere eine reduzierte Aktivität (verlangsamte, intensive Atmung, Kyphose in der Käfigecke und aufgestellte Fellhaare), die zwar bei den KO-Tieren auch auftrat, aber interessanterweise nicht so ausgeprägt war.

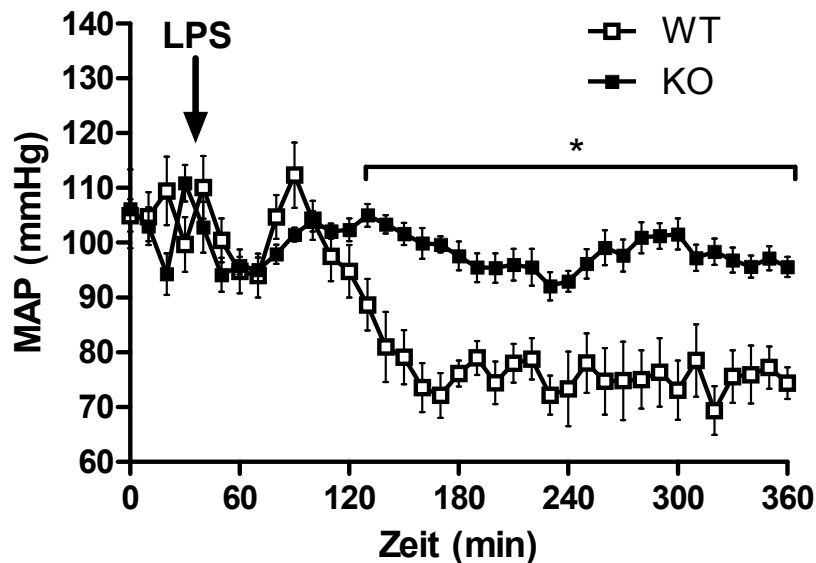


Abb. C.16. Effekte von LPS auf den Blutdruck. Zeitlicher Verlauf über 360 min nach intraperitonealer Applikation von *E.coli*- LPS (10 mg/kg KG) in der Lichtphase. Nach 60 bis 90 min kam es bei den Wildtyp-Tieren zum signifikanten Abfall des MAP um 27.7 mmHg, der bei IRAG-KO-Tieren im Mittel nur 3.3 mmHg betrug (N jeweils 3).

C.7.2. mRNA-Level diverser Gene der cGKI-Signalkaskade

Es wurde untersucht, ob bei Tieren, die mit LPS behandelt wurden, die Expression von Genen der cGKI-Signalkaskade beeinflusst ist. Dazu wurden die mRNA-Level verschiedener Proteine, die an der cGKI-Kaskade beteiligt sind, in diversen Organen analysiert. Zuerst wurde jeweils drei weiblichen Wildtyp- und IRAG^{-/-}-Tieren Vehikel (500 µl 0.9 % NaCl) als Kontrolle und jeweils drei weiteren weiblichen Wildtyp- und IRAG^{-/-}-Nagern 10 mg/kg KG LPS i.p. appliziert. Nach 12-16 h wurde retrograd perfundiert (B.6.). Anschließend wurden die Organe entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation (B.9.1.) bei -80°C gelagert. Die mRNA wurde mittels RT-PCR (B.9.8.) in cDNA umgeschrieben und dann eine quantitative Real-Time-PCR (B.9.9.) durchgeführt, mit der die entsprechenden RNA-Expressionen bestimmt wurden. Um interne Schwankungen auszugleichen, wurde die Expressionsmenge jedes Gens auf den Standard GAPDH bezogen. Die mRNA-Konzentration wurde jeweils in den einzelnen Versuchsgruppen gemittelt, bei den Kontrolltieren (Vehikel) als „1“ gesetzt und die Unterschiede in der Verum-Gruppe jeweils darauf bezogen.

In Abb. C.17. sind die iNOS-mRNA-Expressionsmengen von Niere, Herz und Aorta gezeigt, jeweils unter basalen und LPS-induzierten Bedingungen. In Niere und Herz wurde bei Wildtyp-Tieren jeweils eine stärkere iNOS-Expression als bei IRAG-KO-Tieren stimuliert. Aortengewebe ist bezüglich der RNA-Expression generell heterogener, d.h. es wurden allgemein größere interindividuelle Schwankungen in der Expression von Genen

ermittelt. Hier zeigte sich bei $IRAG^{-/-}$ -Gewebe tendenziell ein stärkerer Anstieg der iNOS-Expression als bei Wildtyp-Aorten.

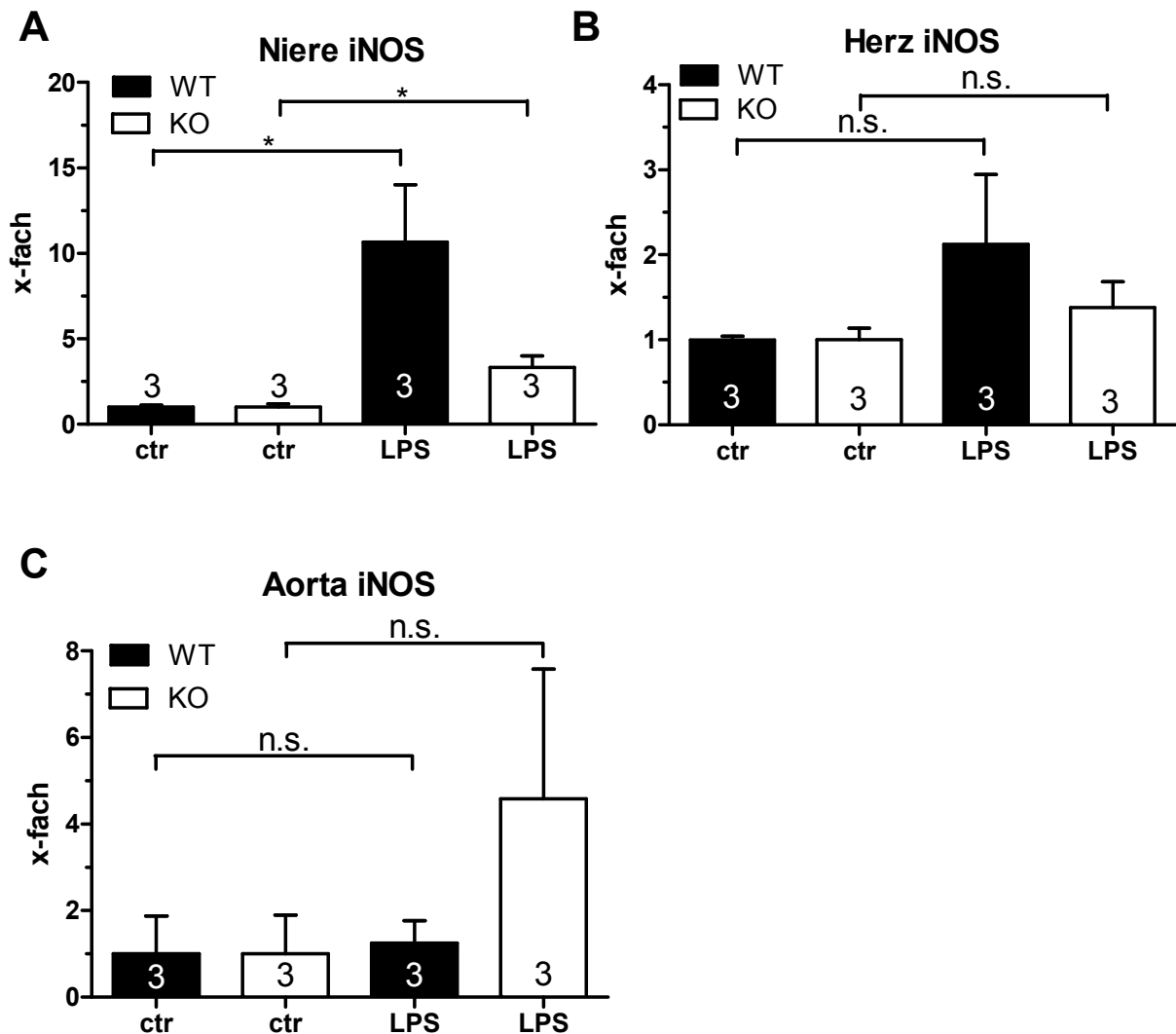


Abb. C.17. iNOS-mRNA in diversen Organen. In Niere (A) und Herz (B) konnte jeweils bei Wildtyp-Tieren nach 16h eine stärkere Expression von iNOS detektiert werden, als bei $IRAG^{-/-}$ -Tieren. In der Aorta (C) verhielt es sich die Expression umgekehrt, LPS-behandelte $IRAG^{-/-}$ -Tiere zeigten eine stärkere iNOS Expression. Die Zahl in den Säulen gibt die Anzahl der Organe an. ctr: mit 0.9 % NaCl behandelte Tiere; LPS: mit 10 mg/kg KG LPS behandelte Tiere.

Unter LPS-induzierten Bedingungen konnte auch eine Regulation zahlreicher, in die cGKI-Signalkaskade involvierter Gene festgestellt werden. Je nach Gewebe waren manche Gene hochreguliert und manche in der Expression reduziert. In der Niere von Wildtyp-Nagern konnte nach LPS-Applikation eine signifikante Reduktion von $IRAG$ -mRNA und parallel dazu auch eine verminderte Expression von $cGKI\beta$ -mRNA verzeichnet werden. Die mRNA von MYPT1 (Regulation der Calciumdesensibilisierung über MLCP) und RGS2 (Regulation der Signalstärke von GPCRs) sind in Wildtyp-Nieren nach LPS-Applikation verstärkt exprimiert (Abb. C.18.A). Im Gesamtherz konnte bei Wildtyp-Tieren eine reduzierte mRNA-Expression von $IRAG$, $cGKI\beta$, RGS2 und der $sGC\beta 1$ -Untereinheit

ermittelt werden. Die Expression von cGKI α -mRNA war in LPS-induzierten Wildtyp und IRAG $^{-/-}$ -Herzen leicht erhöht (Abb. C.18.B)

Auch bei der Analyse der cGKI-Gene konnte in Aortengewebe die heterogenen mRNA-Expressionsstärken festgestellt werden. Hier war bei LPS-behandelten IRAG $^{-/-}$ -Tieren eine verstärkte mRNA-Expression von IRAG, cGKI α und cGKI β zu registrieren. Lediglich die cGKI α -mRNA war auch bei LPS-behandelten Wildtyp-Tieren hochreguliert. RGS2 reduzierte sich in Wildtyp und IRAG-KO ähnlich stark (Abb. C.18.C).

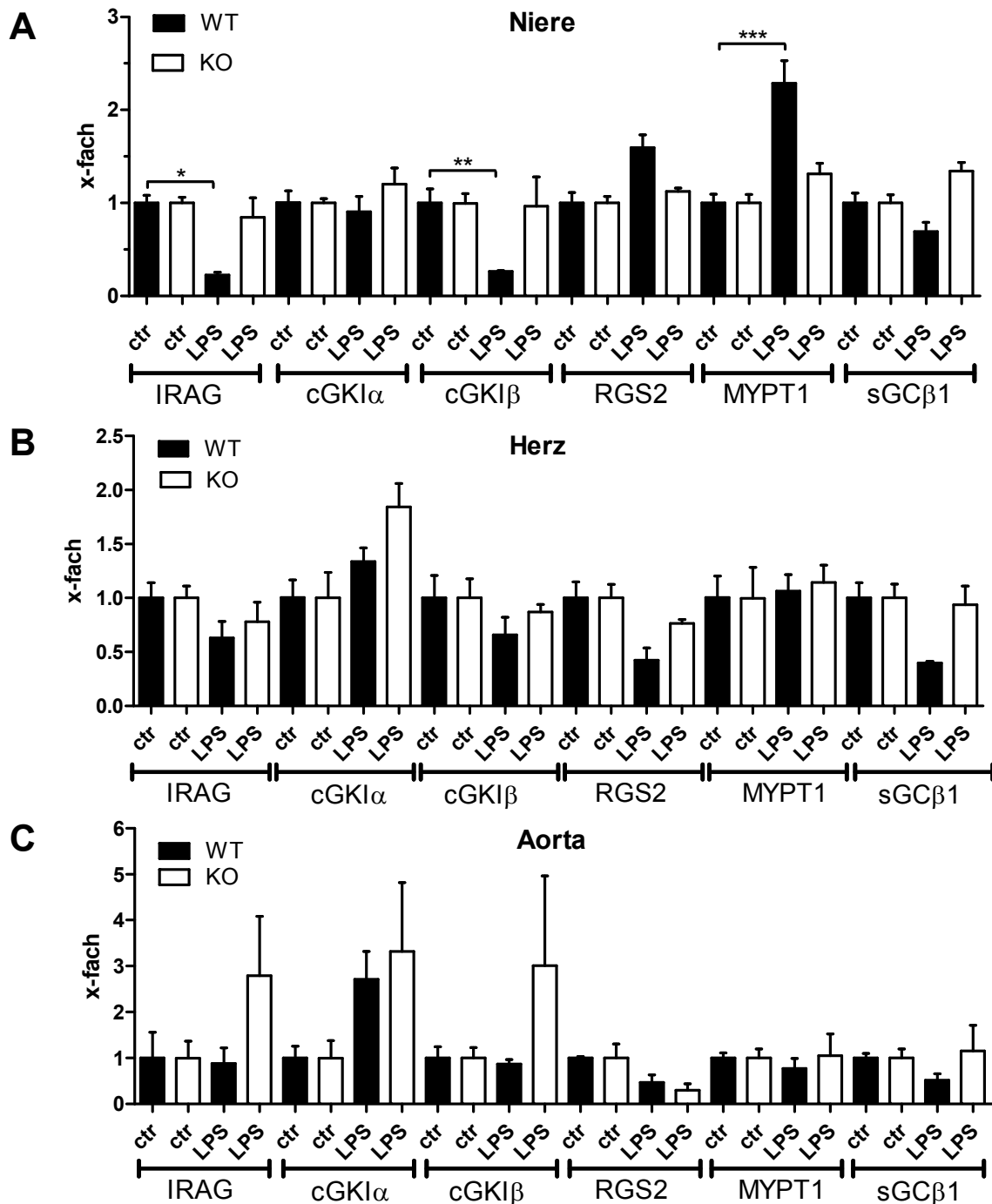


Abb. C.18. mRNA-Expression diverser Gene der cGKI-Kaskade in Niere (A), Herz (B) und Aorta (C) von Wildtyp und IRAG-KO Nagern unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen einer Sepsis nach 16 h. Eine einheitliche Systematik war nicht zu erkennen, jedoch sind die Tendenzen gewebsspezifisch (Details siehe Text). (N jeweils 3).

C.8. Analyse der funktionellen Rolle von cCMP

Unter Anwendung von hochsensiblen Methoden wie der GC/MS (Gaschromatographie, Massenspektrometrie) konnte kürzlich die Existenz und die Generierung von zyklischem Cytidin- 3',5'-monophosphat (cCMP) in Zellen nachgewiesen und damit ältere Arbeiten, die sich ebenfalls mit der Generierung und Effekten von cCMP beschäftigten (siehe Einleitung), bestätigt werden (Spangler et al., 2010). Es stellte sich daher die Frage, ob dem Molekül cCMP eine sog. „second messenger“-Funktion, insbesondere in vaskulären, glatten Muskelzellen zugeschrieben werden kann. Dazu wurden verschiedene Experimente an gereinigten Enzymen und am Myographen durchgeführt.

C.8.1. Expression und Reinigung von cGKI

cG-Kinasen wurden in Sf9-Insektenzellen heterolog überexprimiert und aufgereinigt. Eine (für gewöhnlich weitaus kostengünstigere) Expression aktiver Kinasen in *E.coli* war hinsichtlich fehlender postulierter posttranslationaler Modifikationen nicht möglich. Das heißt, cG-Kinasen können in *E.coli* zwar exprimiert werden, jedoch sind diese vor und nach der Aufreinigung inaktiv (Feil et al., 1993).

Um eine Proteinaufreinigung zu erleichtern, wurde native, bovine cDNA von cGKI α und cGKI β (von Prof. Dr. Jens Schlossmann zur Verfügung gestellt) genetisch verändert. Nach heterologer Expression in Sf9-Zellen wurde zunächst die IMAC-Methode (B.10.9.1.) verwendet, um exprimierte cG-Kinasen über einen Hexahistidintag (His)₆ durch immobilisiertes Nickel zu reinigen.

C.8.1.1. Klonierung eines C-terminalen (His)₆-Tags an cGKI-cDNA

Die zur Verfügung gestellten cDNAs von cGKI lagen ursprünglich im pMT3-Vektor (über EcoRI-Schnittstellen kloniert) vor. Diese wurden mit EcoRI-Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in pVL1393-Transfektor (für die spätere Generierung von Baculoviren) umklont. Um die Orientierung der cDNA festzustellen, wurden die Vektoren im Anschluss sequenziert und positive Klone isoliert. Zunächst sollte zusätzlich zu den nativen cDNAs (in pVL 1393) ein Hexahistidintag (His)₆ an das C-terminale Ende der cGKI α und cGKI β kloniert werden. Da beide Isoenzyme eine identische C-terminale Domäne haben, konnte dieser Schritt durch eine einzige PCR angefertigt werden, deren Amplifikationsprodukt für beide cDNAs geeignet war.

Für die PCR-Strategie zur Generierung der (His)₆-cDNA wurden die Schnittstellen AflII und EcoRI gewählt. AflII kommt nur einmal in der cDNA von cGKI α / β vor, jedoch nicht in der „multiple cloning site“ (MCS) und im Backbone des Transfektors pVL 1393. Für die

PCR wurde das Primerpaar MD16 und MD17 verwendet (siehe Tab. G.3.). Das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von 170 bp mit den Schnittstellen AflIII am 5'- und EcoRI am 3'-Ende. Das gereinigte PCR-Fragment und jeweils cGKI α - und cGKI β -cDNA in pVL 1393 wurden mit AflIII und EcoRI geschnitten und im Verhältnis Vektorbackbone : cGKI α / β -Fragment : (His) $_6$ -Fragment = 1:10:10 ligiert. Der korrekte Einbau in das Plasmid wurde durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung kontrolliert. Alle Produkte wurden am Ende jeweils mit und ohne C-terminale (His) $_6$ -Tag-Sequenz über EcoRI in pcDNA-3.1 (-) umklont, um bei Bedarf Säugerzellen transfizieren zu können.

cGKI α / β cDNA



Abb. C.19. Schematische Darstellung der cGKI α / β -cDNA. Der rote Teil bezeichnet die für den unterschiedlichen N-Terminus kodierende cDNA (ca. 300 bp), schwarz dargestellt ist die gemeinsame für den C-terminalen Bereich kodierende Basensequenz. AflIII zeigt grob die Position dieser Schnittstelle (bei cGKI α : bp 1878). Das PCR-Produkt zur C-terminalen (His) $_6$ -Konstruktion 5'-AflIII-(His) $_6$ -EcoRI-3' hat eine Größe von 170 bp.

C.8.1.2. Expression und Reinigung von cGKI $_{(His)_6}$ in Sf9-Zellen

Die Konstrukte pVL-1393-cGKI α -(His) $_6$, pVL-1393-cGKI α , pVL-1393-cGKI β -(His) $_6$ und pVL-1393-cGKI β wurden für die Generierung von rekombinanten Baculoviren (B.9.11.) verwendet. Nach der Fertigstellung erfolgte eine Expressionskontrolle der Viren auf Proteinebene. Dazu wurde eine Sf9-Monolayerschicht infiziert, nach 48-72 h geerntet und das überexprimierte Protein qualitativ nachgewiesen (B.10.7.).

Mit funktionellen Viren wurde im Anschluss entsprechendes cGKI-Enzym in Sf9-Suspensionskulturen im Kleinmaßstab (100-500 Mio Zellen) exprimiert, aufgearbeitet und über Ni $^{2+}$ -TED-Säulen aufgereinigt (B.10.8. und B.10.9.1.). Abb. C.20. zeigt den qualitativen Immunoblot-Nachweis mit cGKI α -Antikörper, cGKI β -Antikörper und einem für den Hexahistidintag spezifischen Antikörper. Die Qualität der Aufreinigung verschiedener Elutionsfraktionen wurde außerdem mittels Coomassie-Färbung analysiert.

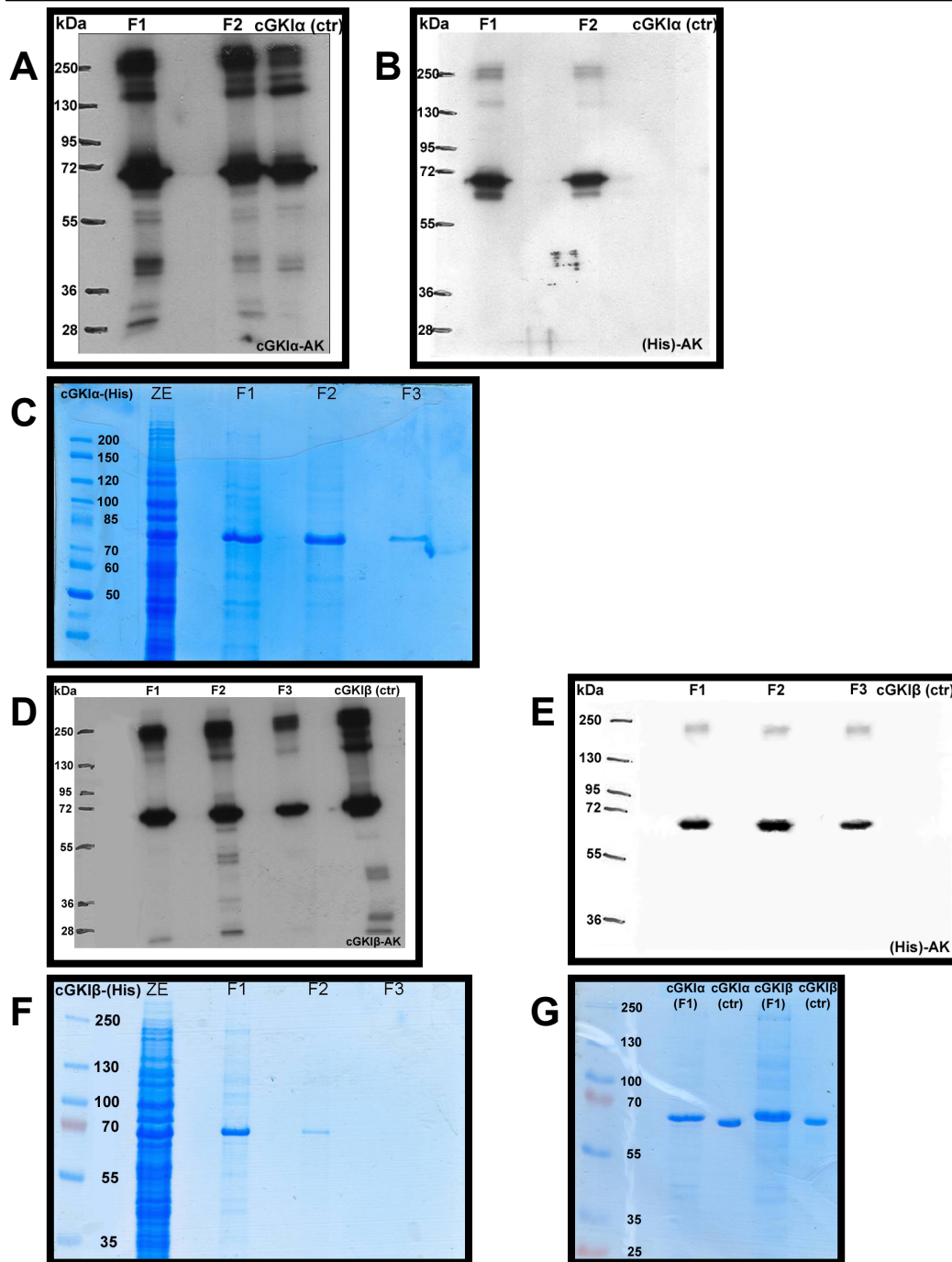


Abb. C.20. Proteinbiochemische Analyse von cGKI(His)₆. (A) mit Ni²⁺-TED gereinigte Elutionsfraktionen (F1 und F2) sowie zur Verfügung gestellte cGKIα (ohne (His)₆-Tag) als Kontrolle, wurden mit cGKIα-Antikörper (cGKIα-AK) durch Immunoblot analysiert. Das Bandenmuster von F1 und F2 ähnelt stark der Kontrolle. Eine apparente Verschiebung der exprimierten cGKIα im Vergleich zur Kontrolle ist aufgrund des jeweils 6 AS größeren exprimierten Proteins zu erkennen (siehe auch Unterabbildung G). (B) Entsprechende Fraktionen unter Anwendung eines (His)₆-Antikörpers für den Immunoblot. Die Kontrolle enthält keinen Hexahistidin-Tag. (C) Der ungereinigte Zellextrakt und die ersten drei Elutionsfraktionen (je 10 µl) mit hohem Reinheitsgrad wurden mit SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. Entsprechende Blots wie (A) und (B) mit cGKIβ, jeweils die ersten drei Fraktionen und Kontrolle (gereinigte cGKIβ ohne Hexahistidintag) mit cGKIβ-AK (D) und (His)₆-AK (E). (F) zeigt eine Coomassiefärbung des Zellextrakts von cGKIβ und den ersten drei Elutionsfraktionen. (G) stellt die jeweils die erste Elutionsfraktion von cGKIα und cGKIβ und die entsprechenden Kontrollen gegenüber. Hier ist die apparente Verschiebung der exprimierten Enzyme aufgrund des größeren Molekulargewichts (Hexahistidintag) zu sehen (die Kontrollen haben keinen (His)₆-Tag). cGKIα und cGKIβ haben normalerweise eine molekulare Masse von ca. 76 kDa (Monomer). Die verwendeten vorgefärbten Marker (A, B, D-G) geben dies nicht korrekt wieder, da die Kopplung an den Farbstoff die Masse verändert (in C ungefärbter Marker). ZE: Zellextrakt, AK: Antikörper

C.8.1.3. Aktivitätsbestimmung von aufgereinigter cGKI $\alpha_{(\text{His})6}$

Die Aktivität der nach C.8.1.2. exprimierten und aufgereinigten cG-Kinasen mit C-terminalem Hexahistidintag wurde nach Aufkonzentrierung (B.10.10.) und Protein-Konzentrationsbestimmung (B.10.3.) mittels Phosphotransferase-Assay (B.10.11.) in Gegenwart von VASPtide als cGKI Substratpeptid ermittelt. Abb. C.21. zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) verschiedener Expressionen von cGKI α unter Verwendung von aufsteigenden cGMP-Konzentrationen.

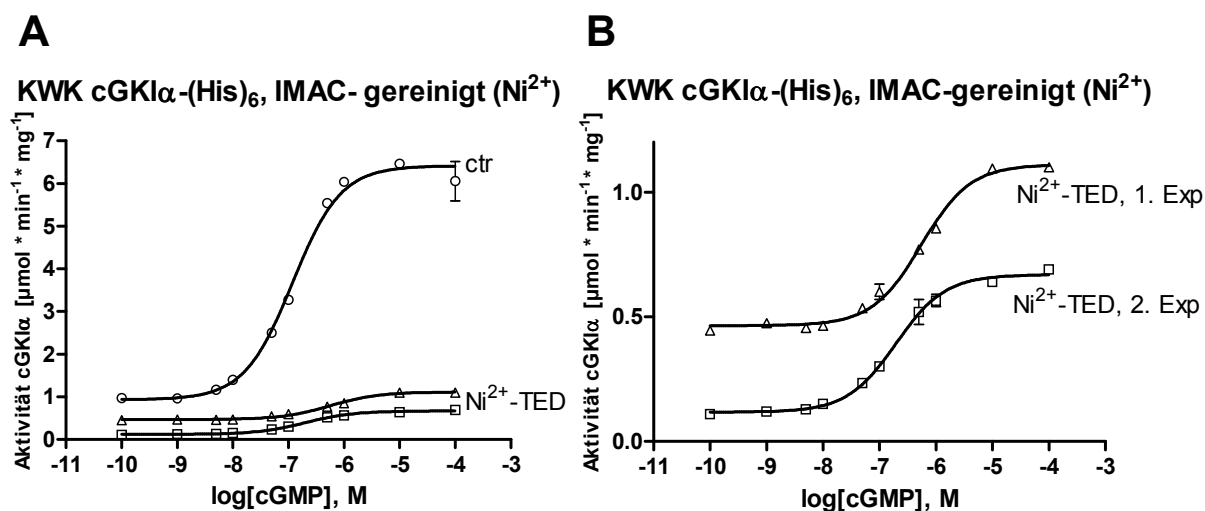


Abb. C.21. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ni^{2+} -TED-gereinigter cGKI α und gereinigtem cGKI α -Kontrollenzym (ctr) ohne Hexahistidintag (A). Vergrößerte Darstellung der in (A) gezeigten DWK von Ni^{2+} -TED-gereinigter cGKI α (B). Dargestellt sind zwei unabhängige Expressionschargen (N jeweils 3).

Kontrollenzyme (ctr) konnten durch 10 μM cGMP auf das 7-10-fache (max. Umsatzrate) bezogen auf die Basalaktivität (Wasser) aktiviert werden. Bei Ni^{2+} -TED-gereinigten cGKI α -Enzymen konnte keine, bzw. eine minimale Aktivierung durch 10 μM cGMP erzielt werden. Diese war zwar bei der zweiten Expression ebenfalls 5-6-fach bezüglich der Basalaktivität, jedoch war die maximale Umsatzrate (Aktivität) sehr niedrig. Für cGKI β ergaben sich ähnlich schlechte Konzentrations-Wirkungs-Kurven (nicht gezeigt). Die IMAC-Methode eignete sich zwar hervorragend, um cGKI im mg-Bereich zu exprimieren und zu reinigen, jedoch konnten immer nur inaktive Enzyme gewonnen werden. Selbst durch Puffermodifikationen, unterschiedliche Expressionszeiten (24 h bis 80 h) und Adaption der Reinigungsbedingungen (Geschwindigkeit, Vakuum, Temperatur) konnten keine aktiven Enzyme angereichert werden.

Um die Ursache einer möglichen Inaktivierung der Enzyme festzustellen, wurde Zellextrakt vor der Aufreinigung im Phosphotransferase-Assay getestet. Einerseits konnte damit die Aktivität bestimmt werden, andererseits war es möglich, so den Gehalt an cG-Kinasen im Gesamtlisat von Sf9-Zellen zu bestimmen (B.10.11.1.). Da im Phosphotransferaseassay VASPtide als Substrat verwendet wurde, welches auch durch cAK

phosphoryliert werden kann, wurde cAK-Inhibitorpeptid zugegeben, um endogen exprimierte Sf9-spezifische cAK zu blockieren. Dadurch konnte eine mögliche unspezifische cAK-vermittelte Phosphorylierung ausgeschlossen werden.

Um einen potentiellen Proteinabbau der Enzyme während der Expression zu detektieren und einen optimalen Erntezeitpunkt bezüglich Expressionsmenge und Aktivität zu bestimmen, wurden verschiedene Ansätze (100 Mio Zellen, 1 Mio/ml) mit cGKI α -(His) $_6$ -Baculoviren infiziert und nach 48 h, 72 h und 80 h geerntet. Interessanterweise waren die Kinasen im Zellextrakt jeweils vor der Aufreinigung aktiv und es konnten ähnliche maximale Umsatzraten (abhängig von Enzymmenge und Basalaktivität) und Aktivierungskonstanten (K_a) wie von gereinigtem Kontrollenzym (K_a (cGKI α): 0.12 μ M) erzielt werden. Nach 48 h betrug der cGKI α -Enzymanteil 3.3 % (K_a : 0.26 μ M) vom Gesamtproteinanteil, nach 72 h 3.0 % (K_a : 0.31 μ M) und nach 80 h 4.6 % (K_a : 0.26 μ M). Für cGKI α ist dies exemplarisch in Abb. C.22. dargestellt. Der Versuch mit cGKI β zeigte im Phosphotransferaseassay ähnliche Ergebnisse (nicht abgebildet) mit einem K_a für die Kontrolle von 0.96 μ M und für den cGKI β -Zellextrakt von 1.0 μ M.

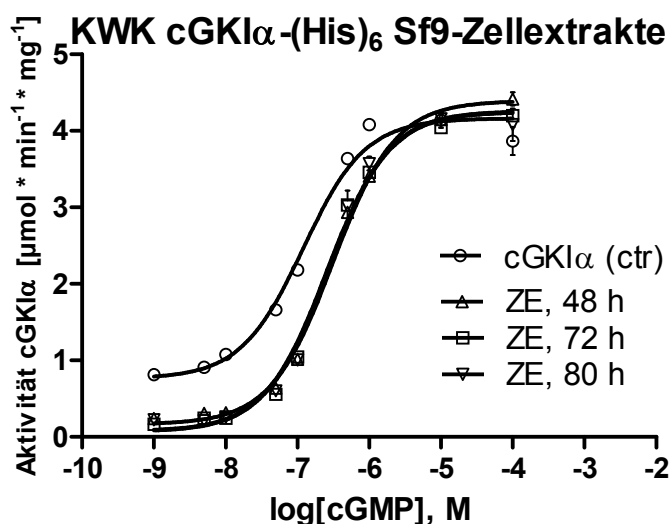


Abb. C.22. Analyse von Zellextrakten. Konzentrations-Wirkungs-Kurven von gereinigtem cGKI α -Kontrollenzym (ohne Hexahistidintag, ctr) und Zellextrakten nach unterschiedlichen Erntezeitpunkten. VASptide diente als Substrat, der Assay erfolgte unter Zugabe von cAK-Inhibitorpeptid. Für die Zellextrakte konnten vor der IMAC-Reinigung ähnliche maximale Umsatzraten erzielt werden, wie für die Kontrolle. Der prozentuale Enzymanteil vom Gesamtprotein ist im Text angegeben. Die Ergebnisse wurden in jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Da vor der Reinigung aktives Enzym nachgewiesen werden konnte, beschränkte sich die Suche nach der Ursache für die geringe Aktivität der IMAC-angereicherten Enzyme auf die Reinigungsmethode. Im nächsten Schritt sollte daher generell das Verfahren der Aufreinigung geändert werden. Deshalb wurde von der IMAC-Methode auf die Affinitätsreinigung mit 8-AEA-cAMP-Agarose (B.10.9.2.) gewechselt.

C.8.1.4. Expression, Reinigung und Charakterisierung von cGKI_{wt}

Für die Expression und Charakterisierung (Aktivitätsbestimmung mittels Phosphotransferaseassay) von cGKI α und cGKI β wurde analog der cGKI-(His)₆-Methoden verfahren. Die Baculovirus-Generierung erfolgte nach gleichem Schema, hierfür wurde jedoch cDNA ohne C-terminalen Hexahistidintag verwendet. Die Expressionsbedingungen wurden beibehalten, für den Aufschluss der Zellen und für die Reinigung nach der Methode der Affinitätschromatographie mit 8-AEA-cAMP-Agarose aber ein anderer Puffer verwendet (siehe B.10.9.2.). Das Prinzip der Aufreinigung beruht dabei auf der Absorption von cGKI an immobilisiertes cAMP und der anschließenden Verdrängung von der Säule durch cGMP (20 μ M im Elutionspuffer), zu dem die Kinasen eine höhere Affinität haben.

Abb. C.23. zeigt verschiedene Expressionschargen von cGKI α und cGKI β . Um die Qualität nachzuweisen, wurden cGKI α - und cGKI β -spezifische Antikörper verwendet. Die Quantität und Qualität der Reinheit wurde durch Coomassiefärbung ermittelt. Unter Anwendung der Affinitätsreinigung mit 8-AEA-cAMP-Agarose konnten insgesamt qualitativ reinere Fraktionen gesammelt werden als mit der IMAC-Methode.

Die aufgetragenen Reinigungsfraktionen (Abb. C.23.B und C, je 10 μ l) sind nicht aufkonzentriert und beweisen eine starke Überexpression der cGKI-Isoenzyme. Vergleicht man die Haupt- und Nebenbanden, so lässt sich eine Reinheit > 95 % abschätzen.

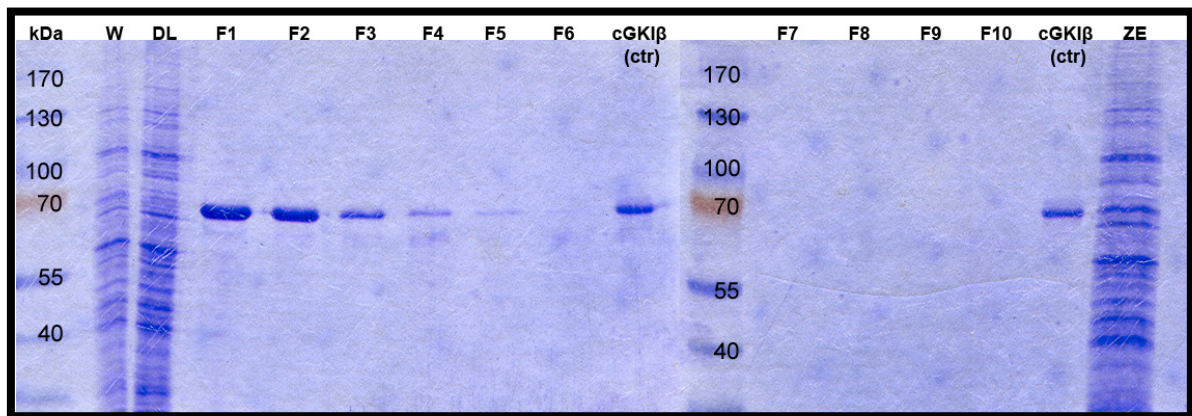
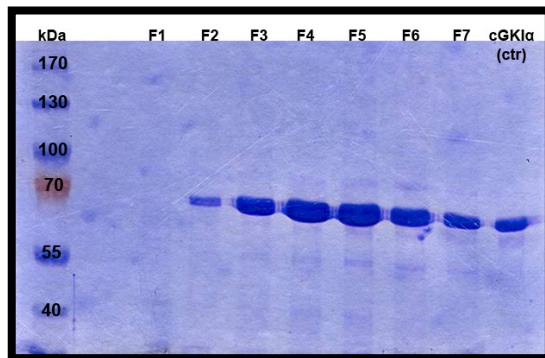
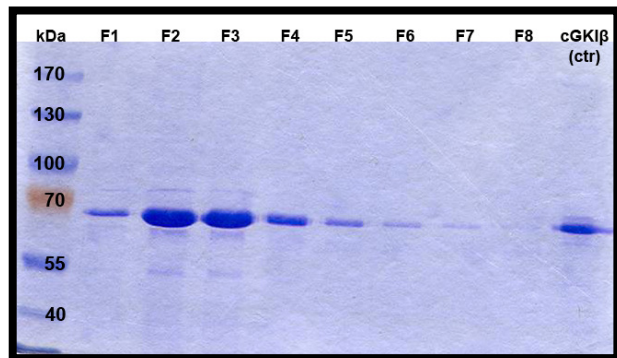
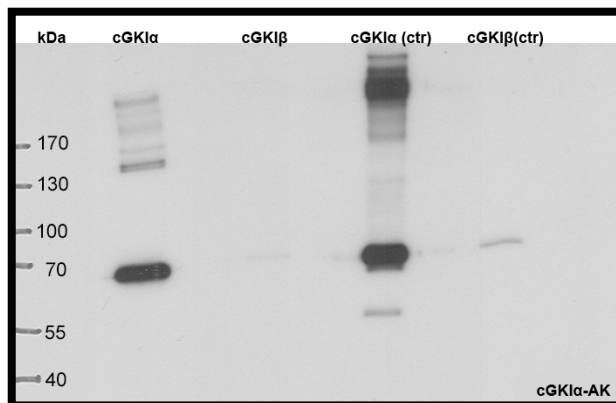
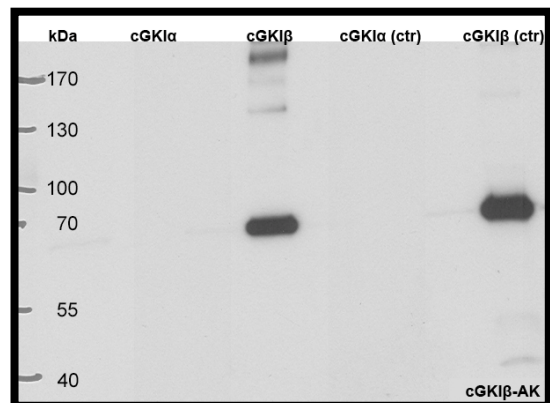
A**B****C****D****E**

Abb. C.23. Proteinbiochemische Analyse aufgereinigter cGKI_{wt}. (A) Coomassiegele einer cGKI β -Expression (600 Mio. Zellen). W: Wasch-Fraktion, DL: Durchlauf-Fraktion, ZE: Zellextrakt vor der Reinigung. cGKI β (ctr): Kontrolle (bereits gereinigte cGKI β). Die Ziffern F1-F10 geben die Elutionsfraktionen an. Der Großteil des Enzyms wird bereits in den ersten vier Fraktionen eluiert. Von den Elutionsfraktionen wurden jeweils 10 μ l, von W, DL und ZE jeweils 3 μ l und von den Kontrollen jeweils 1 μ g aufgetragen.

Elutionsfraktionen einer Expression (1 Mrd. Zellen) von (B) cGKI α und (C) cGKI β (je Fraktion 10 μ l, Kontrollen jeweils 1 μ g). Immunoblot einer Expression von (D) cGKI α und (E) cGKI β . Ctr sind jeweils bereits gereinigte Kontrollen (aufgetragene Menge aller Proben jeweils 10 ng). Die beiden Antikörper zeigen nahezu keine Kreuzreaktivität. Die Banden oberhalb 130 kDa sind bereits beschriebene Dimere (Richie-Jannetta et al., 2006) und bisher nicht bekannte Oligomere (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Clemens Steegborn, Universität Bayreuth).

Die anschließende Aktivitätsbestimmung unter Anwendung des Phosphotransferaseassays zeigte eine nahezu identische Aktivität im Vergleich mit bereits vorliegenden aktiven Kontrollenzymen cGKI α und cGKI β , wie in Abb. C.24. gezeigt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Chargen an Enzymen exprimiert und gereinigt. Jede dieser Chargen wurde hinsichtlich Identität und Aktivität charakterisiert.

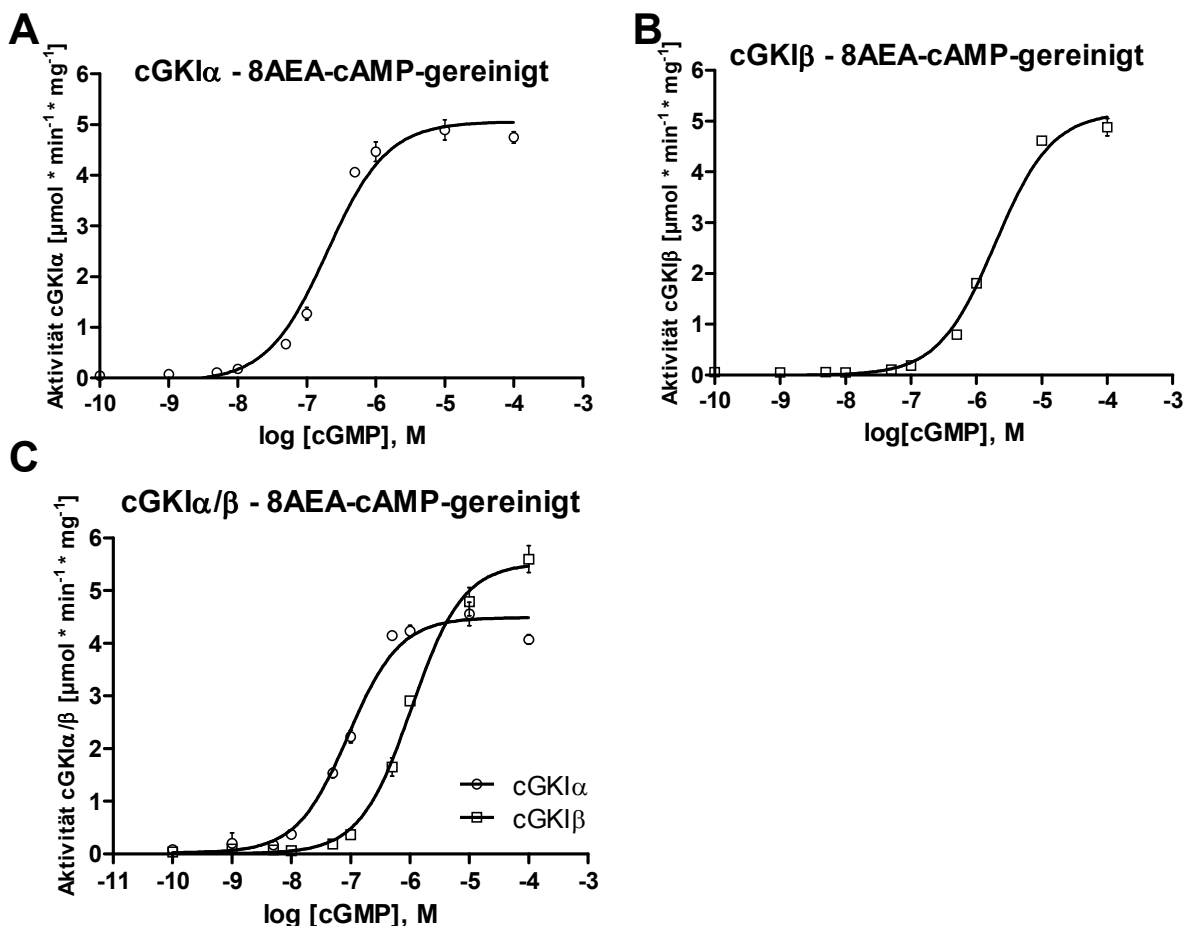


Abb. C.24. Phosphotransferaseassays unterschiedlicher Expressions- und Reinigungschargen von (A) cGKI α (K_a : 0.19 μ M), (B), cGKI β (K_a : 1.98 μ M) und (C) cGKI α (K_a : 0.09 μ M) und cGKI β (K_a : 1.06 μ M). A, B und C verdeutlichen Unterschiede in den maximalen Umsatzraten und in den K_a -Werten. Die maximale Umsatzrate hängt vom Substrat und vom Anteil an falsch gefaltetem Protein ab.

Durch die Methode der Affinitätsreinigung mit 8-AEA-cAMP-Agarose (Säulenvolumen: 6 ml) konnten aktive cGKI-Enzyme im mg-Bereich (Großmaßstab) gewonnen werden. Mittels Ultrafiltration (B.10.10.) wurden Enzymstocklösungen in Konzentrationsbereichen von 1-8 mg/ml hergestellt. Diese hohen Enzymkonzentrationen waren insbesondere für Kristallisationsversuche (Kooperation mit Prof. Dr. Clemens Steegborn, Universität Bayreuth) notwendig. Bei der Charakterisierung mehrerer Chargen heterolog exprimierter cGKI-Isoenzyme konnte für cGKI α im Mittel ein K_a (cGMP) von 0.1 μ M und für cGKI β ein K_a (cGMP) von 1.0 μ M ermittelt werden. Diese stimmten mit den Werten in der bisher veröffentlichten Literatur überein (Pöhler et al., 1995, Feil et al., 1993).

C.8.2. Analyse von cCMP im *in vitro* Phosphotransferase-Assay

Zyklische Nukleotide wie cAMP oder cGMP aktivieren je nach Gewebsart hauptsächlich cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinasen, die ihrerseits weitere Substrate ansteuern und damit Gewebs- und Zellfunktionen regulieren. Dadurch entfalten diese zyklischen Nukleotide ihre „second messenger“ Funktion. Eine mögliche Zielstruktur und die funktionelle Rolle des zyklischen Nukleotids cCMP wurde bisher noch nicht identifiziert. Aufgrund der zyklischen Nukleotid-Eigenschaft lag die Theorie einer Aktivierung von cNMP-abhängigen Proteinkinasen nahe. Um zu zeigen, dass cG-Kinasen und cA-Kinasen direkt von cCMP aktiviert werden, wurden zur Aktivitätsbestimmung von cGKI und cAK Phosphotransferase-Analysen mit cCMP durchgeführt. Dazu wurden nach C.8.1.4. gereinigte und charakterisierte cG-Kinasen sowie kommerziell erhältlichen cA-Kinasen (aus bovinem Herzen, Sigma-Aldrich) verwendet.

Heterolog exprimierte und gereinigte cGKI und cGKII (freundlicherweise von Prof. Dr. Jens Schlossmann zur Verfügung gestellt) war durch cCMP stimulierbar, wobei die Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Vergleich zur Stimulation mit cGMP stark nach rechts verschoben waren (Abb. C.25.A). Die EC_{50} -Werte waren jeweils: cGKI α (cCMP): $66 \pm 8 \mu\text{M}$, cGKI β (cCMP): $56 \pm 8 \mu\text{M}$ und cGKII (cCMP): $169 \pm 8 \mu\text{M}$.

Setzt man die mit cCMP und cGMP ermittelten EC_{50} -Werte der cGKI-Isoenzyme in Relation, so resultiert für cGKI α ein Wert von 660 und für cGKI β ein Wert von 56. cGKI β wird also verhältnismäßig stärker von cCMP aktiviert als cGKI α .

Weiterhin wurde im Phosphotransferaseassay versucht, gereinigte cA-Kinase mit cCMP zu stimulieren. Hierbei resultierten folgende EC_{50} -Werte: cAMP: $0.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$, cGMP: $59 \pm 1 \mu\text{M}$, cCMP: $106 \pm 10 \mu\text{M}$ (Abb. C.25.B). cA-Kinase aus bovinem Herzen ist somit deutlich weniger sensitiv auf cCMP als cGKI-Isoenzyme. Zusätzlich ist zu beachten, dass aus dem Herzen aufgereinigte cAK wesentlich geringer aktiv ist als cG-Kinasen, da laut Hersteller nur 0.5 U/ μg cAK-Protein enthalten sind und 1 U cAK ein Picomol Casein pro Minute phosphoryliert (zum Vergleich: 1 U cGKI β phosphoryliert 1 Micromol VASPtide pro Minute). Dies verdeutlicht ein Vergleich der maximalen Umsatzraten in Abb. C.25.A und Abb. C.25.B.

Ebenfalls sollte gezeigt werden, dass cCMP auch endogen exprimierte Kinasen in Aortenlysaten stimulieren kann. Dazu wurden Aorten von Wildtyp und cGKI $^{-/-}$ -Tieren nach B.10.11.3. aufbereitet und radioaktiv analysiert.

Aortenlysate von Wildtyp-Nagern phosphorylierte exogen zugegebenes Substratpeptid (VASPtide) unter cAK-Blockade (cAK-Inhibitorpeptid AS₅₋₂₄) nach 10 μM cGMP-Stimulation im Mittel 11.7-fach im Vergleich zur Kontrolle (Stimulation mit Wasser). Bei maximaler Stimulation mit 300 μM cGMP erfolgte eine 13.5-fache Stimulation. cCMP zeigte bei einer Konzentration von 10 μM nahezu basale Werte (1.3-fache Stimulation),

wohingegen 300 μM cCMP endogene cG-Kinasen im Aortenlysat 8.3-fach stimulieren konnten (Abb. C.25.C). Da cAK-Inhibitorpeptid zugegeben wurde, konnte eine Phosphorylierung durch cAK ausgeschlossen werden.

Führte man die Phosphorylierungen mit Aortenlysat von cGKI-defizienten Mäuse durch, konnte keine Stimulation/Phosphorylierung durch cGMP sowie cCMP detektiert werden (Abb. C.25.D). Dies lässt darauf schließen, dass cCMP auch endogene cGKI α und cGKI β spezifisch stimuliert, analog den Phosphorylierungsversuchen mit gereinigten cG-Kinasen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven und die Aortenlysat-Stimulationen sind in Abb. C.25. dargestellt.

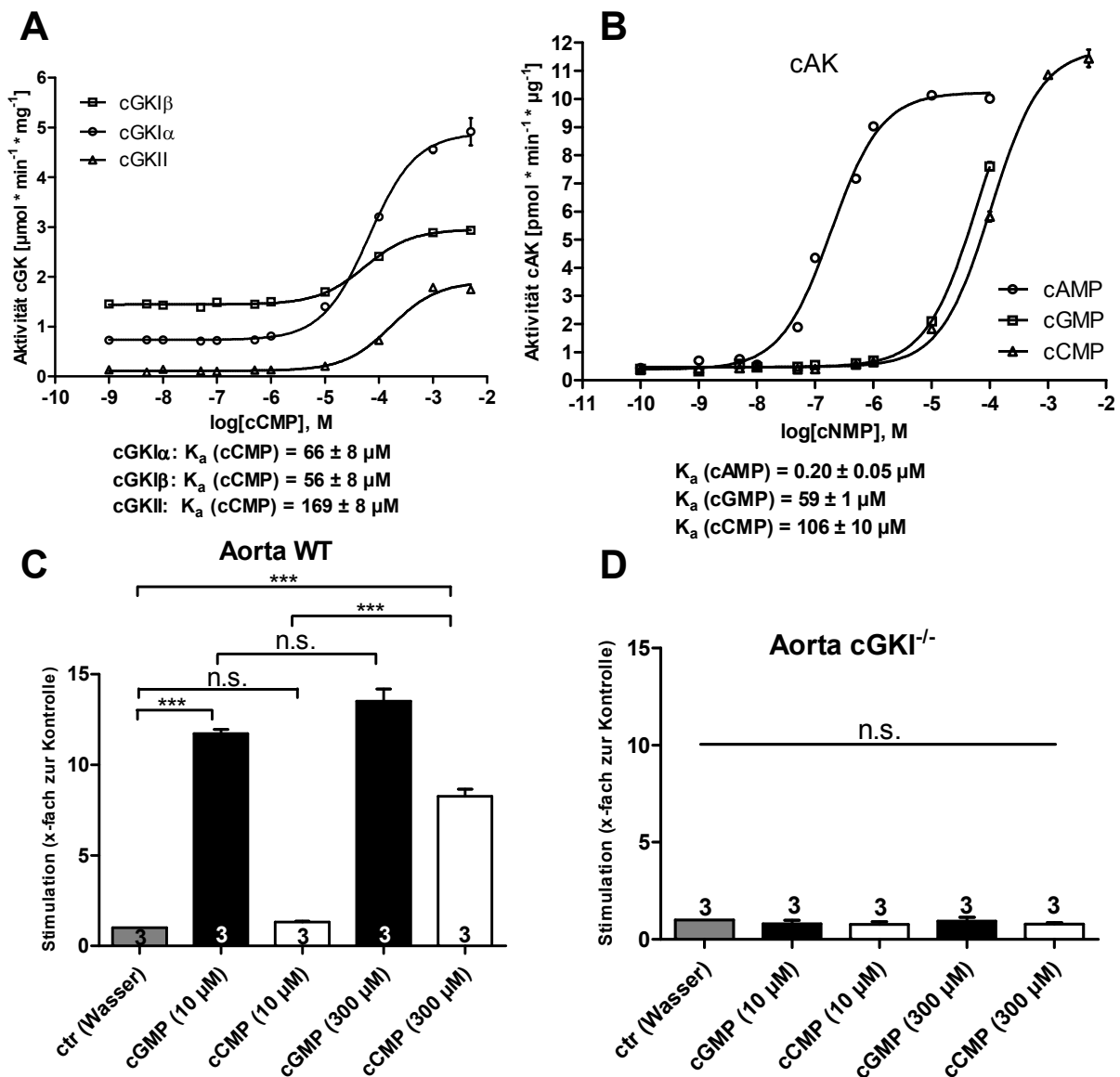


Abb. C.25. *In vitro*-Aktivierung von cGKI durch cCMP. Konzentrations-Wirkungs-Kurven gereinigter (A) cGK (cGKI α und cGKI β bovin, cGKI II murin) und (B) cAK (bovin, Herz). Die entsprechenden K_a der einzelnen cNMPs sind unterhalb angegeben. Die Kurven wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Stimulation von (C) Wildtyp-Aortenlysat und (D) cGKI $^{-/-}$ -Aortenlysat (jeweils mit cAK-Inhibitorpeptid) mit cGMP und cCMP (jeweils 10 und 300 μM). Wasser wurde als Kontrollwert („1“) verwendet. Die Ziffern in den Säulen geben die Anzahl der Experimente an. Detaillierte Angaben über Zahlenwerte sind im Text angegeben.

Eine weitere Hypothese, wie cCMP cGKI aktivieren könnte, begründet sich in einer potentiellen Sensibilisierung von cGKI durch cCMP gegenüber cGMP. Jedes cG-Kinase-Monomer hat eine cGMP-Tandem-Bindungsstelle mit hoch- und niedrigaffiner cGMP-Bindungstasche (Hofmann et al., 2009). Die Bindung von cCMP in eine Tasche könnte eine Konformationsänderung hervorrufen, wodurch die Affinität von cGMP für die zweite Bindungstasche erhöht werden könnte. Nach dieser Hypothese könnten somit bereits geringe (basale) cGMP-Konzentrationen cGKI bei gleichzeitiger Anwesenheit von cCMP aktivieren. Dies würde eine Konzentrations-Wirkungskurve nach links verschieben, d.h. die EC_{50} für cGMP verringern.

Koinkubierte man jeweils gereinigte cGKI α und cGKI β im Phosphotransferaseassay mit verschiedenen cGMP-Konzentrationen unter Anwesenheit von konstant 10 μ M cCMP, so konnte keine Sensibilisierung ermittelt werden. Es trat keine Linksverschiebung der Kurve auf, d.h. die EC_{50} -Werte änderten sich nicht signifikant (Abb. C.26.) Jedoch war die Basalaktivität im linken Teil der Kurve erhöht, was durch die konstante cCMP Konzentration von 10 μ M hervorgerufen wurde. Bei höheren cGMP-Konzentrationen lagen die Konzentrations-Wirkungskurven von cGMP alleine und cGMP + cCMP (10 μ M) übereinander.

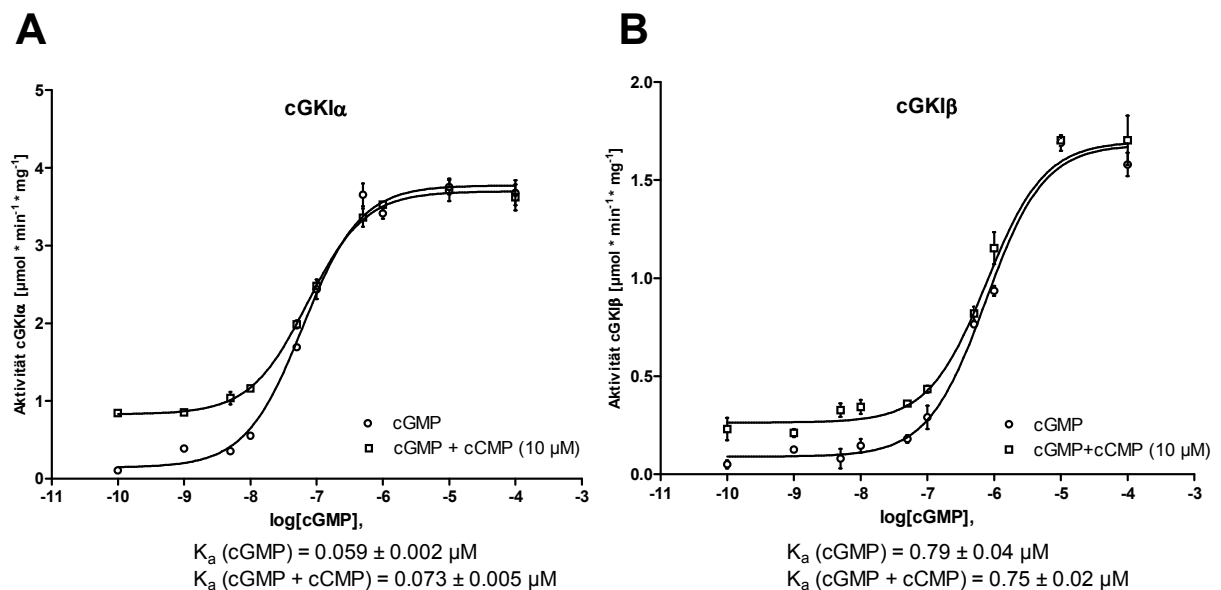


Abb. C.26. Keine Sensibilisierung von cGKI durch cCMP. Konzentrations-Wirkungs-Kurven von (A) cGKI α und (B) cGKI β mit aufsteigenden cGMP-Konzentrationen unter Koinkubation mit konstant 10 μ M cCMP. Es konnte keine Linksverschiebung der Kurven festgestellt werden. Die höhere Basalaktivität im linken Ast der Kurve resultiert von der Aktivierung der cG-Kinasen durch cCMP. Die K_a -Werte verändern sich dadurch nicht signifikant. Die Kurven wurden anhand drei unabhängiger Experimente erstellt.

Im nachfolgenden Kapitel C.8.3. wurden myographische Experimente mit dem Membran-permeablen cCMP Analogon db-cCMP durchgeführt. db-cCMP hat laut Hersteller (Biolog) einen „Prodrug“-Charakter, d.h. bei Applikation werden die Butyratreste durch im Gewebe oder in Zellen exprimierte Esterasen abgespalten und somit aktive cCMP-Metaboliten

generiert. Anhand Esterase-freier Phosphotransferase-Experimente konnte gezeigt werden, dass das „Prodrug“ db-cCMP cGKI im Gegensatz zu cCMP (siehe Abb. C.25.A) nicht aktivieren kann (Abb. C.27.) und die Effekte in der Myographie von aktiven Metaboliten (cCMP und monobutyryliertes cCMP) stammen.

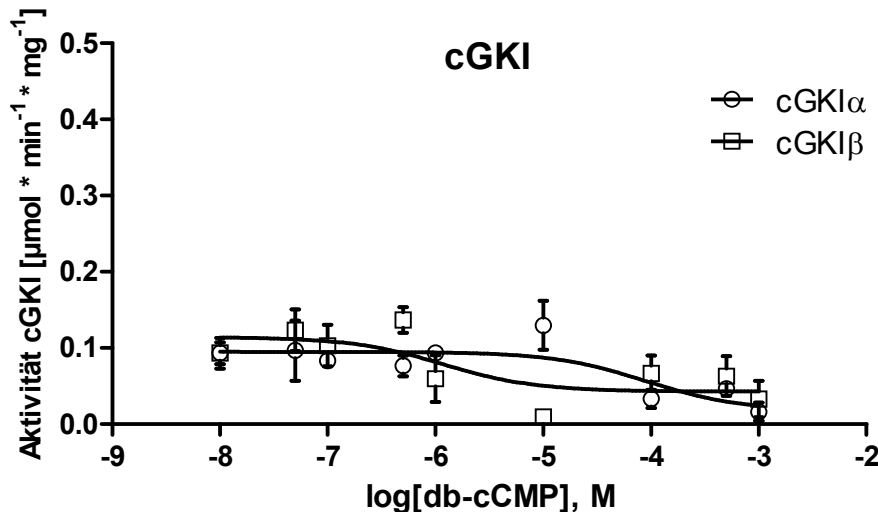


Abb. C.27. db-cCMP kann cGKI nicht aktivieren. db-cCMP kann gereinigte cGKI-Isoenzyme nicht aktivieren. Dies verdeutlicht den „Prodrug“-Charakter der Substanz. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden anhand drei unabhängiger Experimente erstellt.

C.8.3. Effekte von cCMP auf den vaskulären glatten Muskel

In den 70er und 80er Jahren wurde in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten die Existenz von zyklischem Cytidin-3',5'-monophosphat (cCMP) in diversen Geweben beschrieben (Cech and Ignarro, 1977). Jedoch wurde dies oftmals aufgrund der Analysenmethoden angezweifelt (Gaion et al., 1979, Gaion et al., 1979). Kürzlich konnte die Existenz und Generierung von cCMP aus CTP durch moderne, hochsensitive Methoden (LC/MS) in Zellkultur bestätigt werden (Spangler et al., 2010). Zur Analyse einer möglichen „second messenger“-Funktion von cCMP wurde in dieser Arbeit murines vaskuläres Glattmuskelgewebe (thorakale Aorta) verwendet. Dies sollte die mit gereinigten cG- und cA-Kinasen ermittelten Ergebnisse (C.8.2.) untermauern.

Die Präparation und der Versuchsaufbau für die Myographie erfolgte analog B.4.1. und B.4.3. Eine durch Phenylephrin (3 μM) induzierte Vorkontraktion konnte durch Applikation von dibutyryl-cCMP (db-cCMP, membrangängiges „Prodrug“ von cCMP, Reinheit >99.7 % n. HPLC, Biolog) signifikant reduziert werden. db-cCMP ist das derzeit einzige etablierte lipophile Analogon von cCMP, daher wurde in der Myographie darauf zurückgegriffen. Im vorherigen Kapitel C.8.2. konnte bereits gezeigt werden, dass db-cCMP cGKI nicht direkt aktivieren kann (Abb. C.27).

db-cCMP (300 μM) erniedrigte einen durch PE (3 μM) induzierten Tonus bei Wildtyp-Aorten im Mittel um $44.0 \pm 2.8 \%$ (Abb. C.28.A und E) (zum Vergleich: 8-Br-cGMP relaxierte um $60.1 \pm 2.2 \%$, Abb. C.28.B und E). Eine myographische Konzentrations-Wirkungskurve ergab für das Prodrug db-cCMP eine extrapolierte EC_{50} von $479 \pm 54 \mu\text{M}$ und für 8-Br-cGMP eine EC_{50} von $27 \pm 9 \mu\text{M}$ (Abb. C.28.C und D).

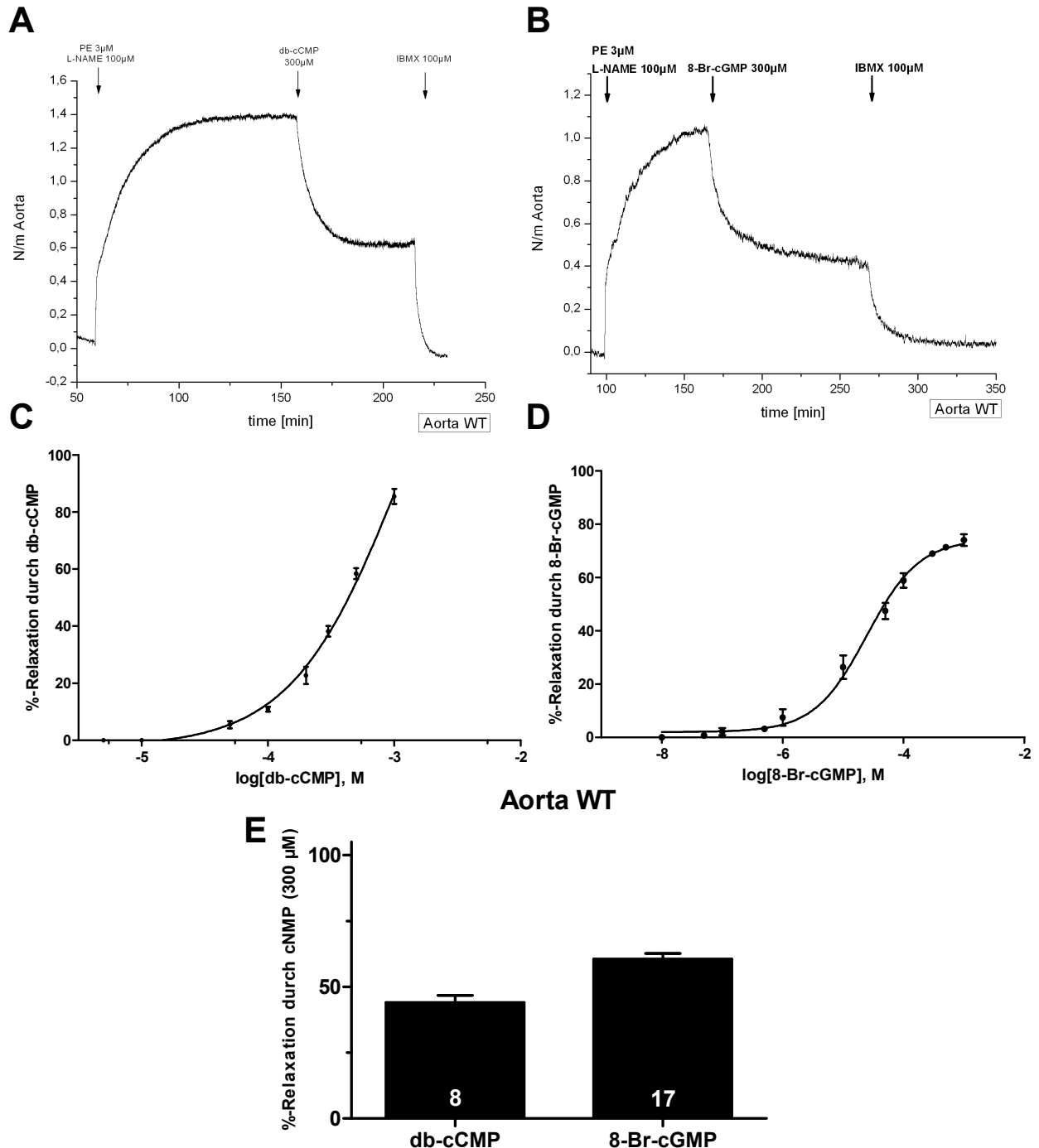


Abb. C.28. Effekte von db-cCMP auf den glatten Muskel der Aorta. Beispielgraphen einer mit PE (3 μM) und L-NAME (100 μM) vorkontrahierten Wildtyp-Aorta, die mit jeweils 300 μM db-cCMP (**A**) und 8-Br-cGMP zum Vergleich (**B**) relaxiert wurden.

Myographische Konzentrations-Wirkungskurve (N jeweils 4) einer vorkontrahierten Aorta, die additiv mit db-cCMP (**C**) und 8-Br-cGMP (Vergleich) (**D**) relaxiert wurde. Der K_a für die 8-Br-cGMP-Kurve beträgt $27 \pm 9 \mu\text{M}$, der für die db-cCMP-Kurve bei Extrapolation etwa $479 \pm 54 \mu\text{M}$.

(**E**) gibt die Relaxation bei jeweils 300 μM an. Die Ziffern in den Säulen entsprechen der Anzahl unabhängig durchgeführter Experimente.

C.8.3.1. Effekte von Butyraten auf den Tonus der glatten Muskulatur

db-cCMP zeigte in Phosphotransferaseanalysen keine Aktivität, in der Myographie wurde jedoch ein Effekt ermittelt. In intaktem Gewebe spalten Esterasen die Butyryl-Reste ab und erzeugen somit aktive Metaboliten.

Das intrazellulär entstehende Butyrat kann „second messenger“-Systeme beeinflussen. In der Literatur wurde beschrieben, dass Mesenterialarterien von Ratten durch Butyrat in millimolaren Konzentrationen relaxieren (Aaronson et al., 1996). Um daher einen möglichen Effekt durch abgespaltenes Butyrat aus db-cCMP in der Myographie auszuschließen, wurden Kontrollexperimente unter Verwendung von Natriumbutyrat oder Tributyrin (lipophiler als Natriumbutyrat) erstellt.

Wie Abb. C.29. zeigt, konnte bei Phenylephrin-vokontrahierten Aortenringen keine Relaxation festgestellt werden. Erst bei millimolaren Konzentrationen von Butyrat nahm der Tonus des Gewebes zu (spätere Tributyrinzugabe zeigte keinen Effekt auf den Tonus).

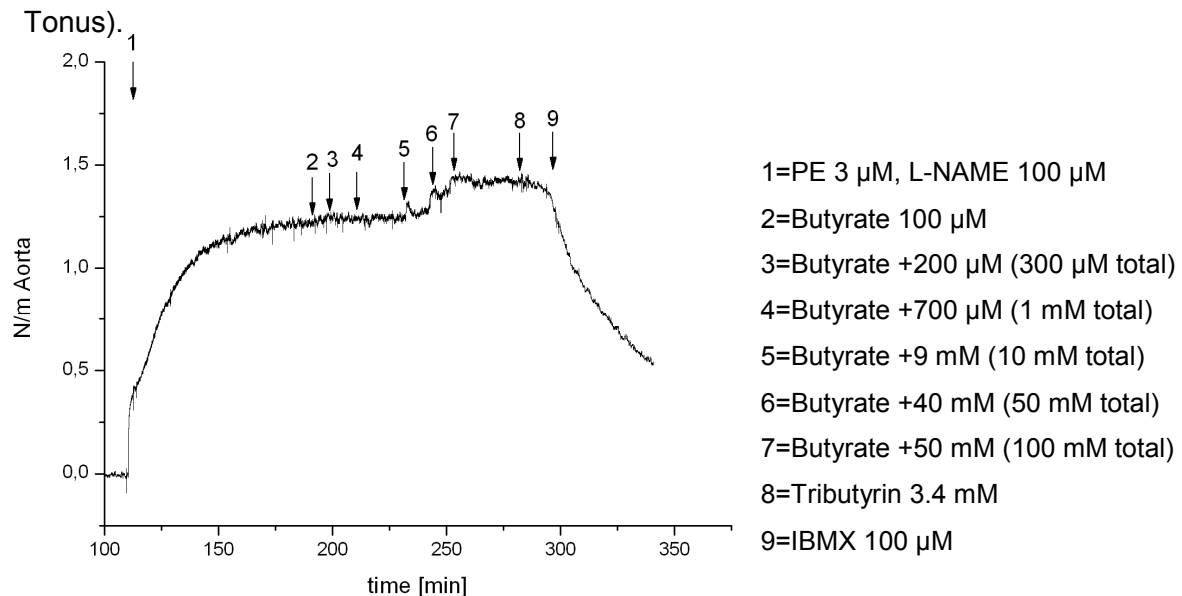


Abb. C.29. Effekte von Butyrat auf Aortengewebe. Exposition einer vokontrahierten Wildtyp-Aorta mit aufsteigenden Konzentrationen von Natriumbutyrat. Die Pfeile und die entsprechenden Ziffern zeigen die Applikationszeitpunkte. Erst ab einer Konzentration von 50 mM konnten kontroverse Effekte verzeichnet werden, die auf keine Relaxation deuteten. Auch die Zugabe von Tributyrin (lipophiler Butyratdonor) zeigte keinen Effekt. Der relaxierende Effekt von IBMX (100 μ M) zeigt, dass das Gewebe intakt ist.

Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die relaxierenden Effekte in der Myographie durch intrazellulär akkumuliertes Butyrat vermittelt wurden. Dies zeigt, dass die durch db-cCMP hervorgerufene Tonuserniedrigungen durch daraus generiertes cCMP hervorgerufen wurden.

C.8.3.2. Potentielle Hemmung von Phosphodiesterasen durch cCMP

Weiterhin sollte genauer untersucht werden, über welche Signalkaskade die durch cCMP hervorgerufene Relaxation erzeugt wurde.

db-cCMP könnte cGKI indirekt aktivieren, analog dem Wirkungsmechanismus von PDE 5-Inhibitoren (z.B. Sildenafil oder Vardenafil). Durch eine Hemmung von PDE 5 kommt es zur intrazellulären Anreicherung von cGMP und damit zu cGKI-vermittelten Effekten (Kouvelas et al., 2009), wie zum Beispiel eine Erschlaffung des *Corpus Cavernosum* mit vermehrtem Bluteinstrom (Prinzip des Wirkungsmechanismus bei der Therapie der erektilen Dysfunktion (Heidelbaugh, 2010)).

Daher sollte geklärt werden, ob cCMP möglicherweise eine cGMP hydrolysierende Phosphodiesterase (z.B. PDE 5) hemmt. Als Kontrollversuch für eine PDE 5-Hemmung diente die Relaxation von vorkontrahierter Aorta (PE 3 μ M, L-NAME 100 μ M) mit dem selektiven PDE 5-Inhibitor Zaprinast (5 μ M) (Abb. C.30.A). Im Mittel erfolgte dabei eine Tonussenkung um 59.5 ± 2.0 % (Abb. C.30.D).

Durch vorherige selektive Blockade von sGC mit ODQ (25 μ M) über 30 Minuten wurde eine wichtige cGMP-Synthesequelle inaktiviert. Somit reicherte sich im Gewebe bei anschließender Zaprinast-Inkubation weniger cGMP in der Glattmuskelzelle an und die Zaprinast-vermittelte Relaxation wurde aufgrund von reduzierter $[cGMP]_i$ verringert (Abb. C.30.B). Durch ODQ reduzierte sich die Zaprinast-vermittelte Relaxation um 16.2 ± 2.4 % auf 43.3 ± 1.3 %. Falls cCMP ebenfalls eine cGMP-hydrolysierende PDE (PDE 5) hemmt, sollte ODQ somit ebenfalls die Wirkung von db-cCMP beeinflussen. Die relaxierende Wirkung von db-cCMP war jedoch nicht vermindert (Abb. C.30.C und D). Eine Hemmung von cGMP-abbauender PDE (einschließlich von PDE5) durch cCMP im Aortengewebe konnte somit ausgeschlossen werden.

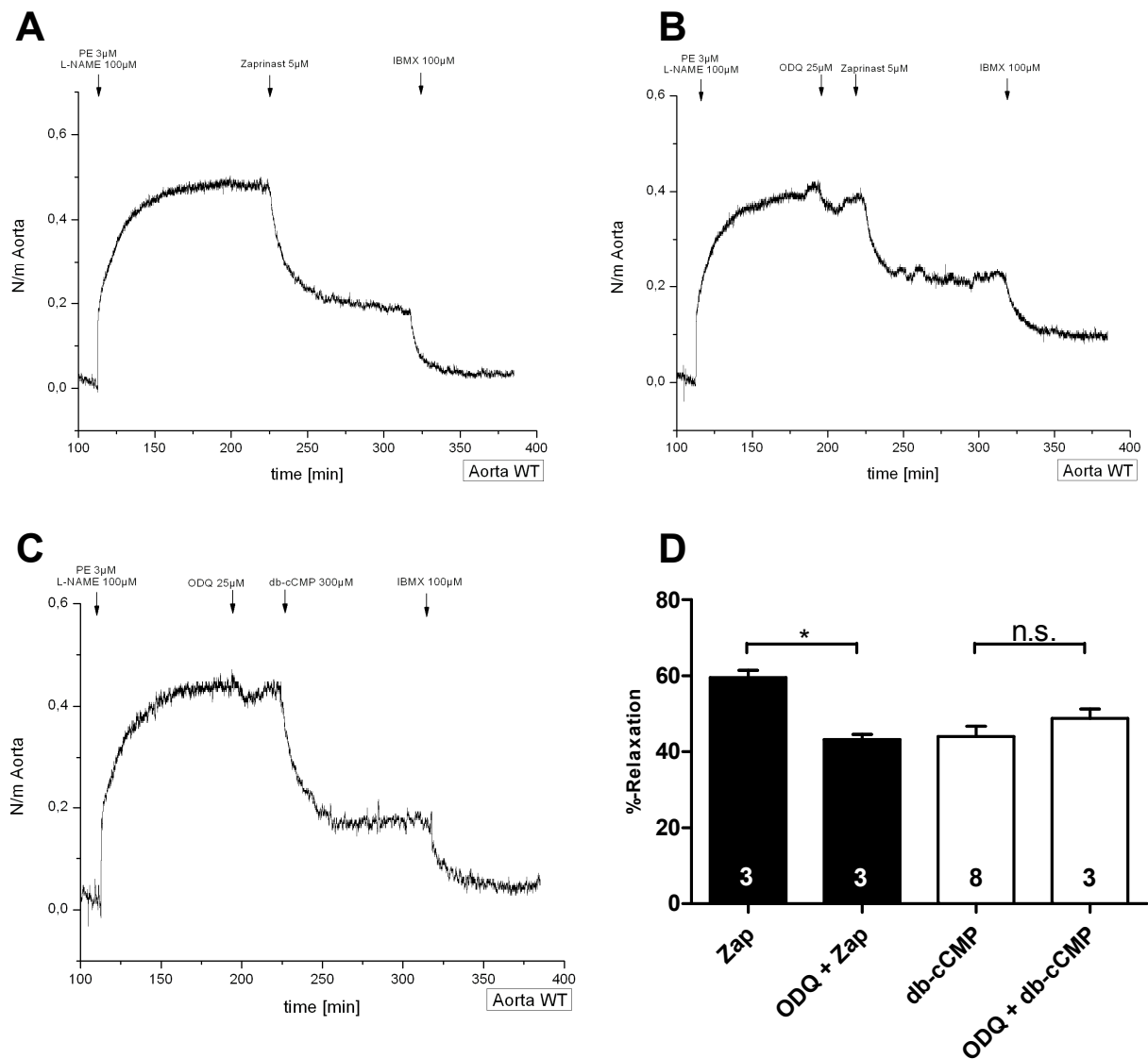


Abb. C.30. Keine Hemmung von cGMP-abhängigen PDEs durch db-cGMP. (A) Relaxation eines vorkontrahierten Wildtyp-Aortenrings mit 5 μM Zaprinast. (B) Relaxation eines vorkontrahierten Aortenrings mit 5 μM Zaprinast nach Vorinkubation mit 25 μM ODQ (30 min). (C) gleicher Versuch wie (B), jedoch Relaxation mit 300 μM db-cGMP. (D) Statistik über die Versuche aus (A), (B) und (C). Eine Vorinkubation mit ODQ verminderte die Relaxation signifikant (Zaprinast alleine: 59.5 \pm 2.0 %; ODQ + Zaprinast: 43.3 \pm 1.3 %). Eine Vorinkubation mit ODQ hatte keinen Einfluss auf die Relaxation mit db-cGMP (db-cGMP alleine: 44.0 \pm 2.8 %; ODQ + db-cGMP: 48.7 \pm 2.6 %). Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl unabhängiger Experimente an. Abkürzungen: Zap: Zaprinast, Eingesetzte Konzentrationen Zap: 5 μM ; ODQ: 25 μM ; db-cGMP: 300 μM .

C.8.3.3. Aktivierung endogener, glattmuskulärer cGKI durch cCMP

Da eine cCMP-vermittelte Hemmung der cGMP-hydrolysierenden PDEs (einschließlich PDE 5) im glatten Muskel ausgeschlossen werden konnte, stellte sich die Frage, ob es bei Applikation von db-cCMP zu einer direkten Aktivierung von cG-Kinasen im glatten Muskel kommt. Um dies zu analysieren, wurden verschiedene Mauslinien verwendet, die Defekte in der cGKI- Signalkaskade aufweisen.

Mittels Myographie wurden Aorten von cGKI^{-/-}, IRAG^{-/-} und SMI α -rescue-Tieren (cGKI-KO-Hintergrund mit glattmuskelspezifischer Expression von cGKI α) analysiert.

Nach Vorkontraktion mit PE (3 μ M) und L-NAME (100 μ M) zeigten Aorten aus cGKI-defizienten Nagern nahezu keine Relaxation durch db-cCMP (Abb. C.31.A). Der Tonus wurde dabei so schwach gesenkt wie vergleichsweise durch 8-Br-cGMP (Abb. C.31.B) (vergleiche auch Pfeifer et al., 1998, Geiselhöringer et al., 2004). db-cCMP reduzierte den Tonus um 4.4 ± 0.8 %; 8-Br-cGMP senkte den Tonus um 2.6 ± 0.2 %.

Eine anschließende Applikation von db-cAMP (lipophiles Analogon von cAMP) senkte den Tonus von cGKI^{-/-}-Aorten um 59.7 ± 3.0 %. Dies zeigte, dass cGKI-defiziente Aorten eine funktionelle cAMP-Signalkaskade aufweisen, die eine Relaxation nach Stimulation mit cAMP herbeiführen kann (Abb. C.31.A und B).

Ebenso wiesen IRAG-KO Aorten einen Defekt in der Relaxation nach Applikation von db-cCMP oder 8-Br-cGMP auf. Der Phenylephrin/L-NAME induzierte Tonus wurde durch 8-Br-cGMP um 16.7 ± 1.5 %, durch db-cCMP um 8.9 ± 0.5 % reduziert (Abb. C.31.C und D). Dies deutet darauf hin, dass insbesondere der cGKI β -Signalweg über IRAG in die cCMP-vermittelte Glattmuskelrelaxation involviert zu sein scheint. Auch durch die Phosphotransferase-Analysen konnte festgestellt werden, dass cGKI β verhältnismäßig stärker durch cCMP aktiviert wurde als cGKI α (Abb. C.25.A).

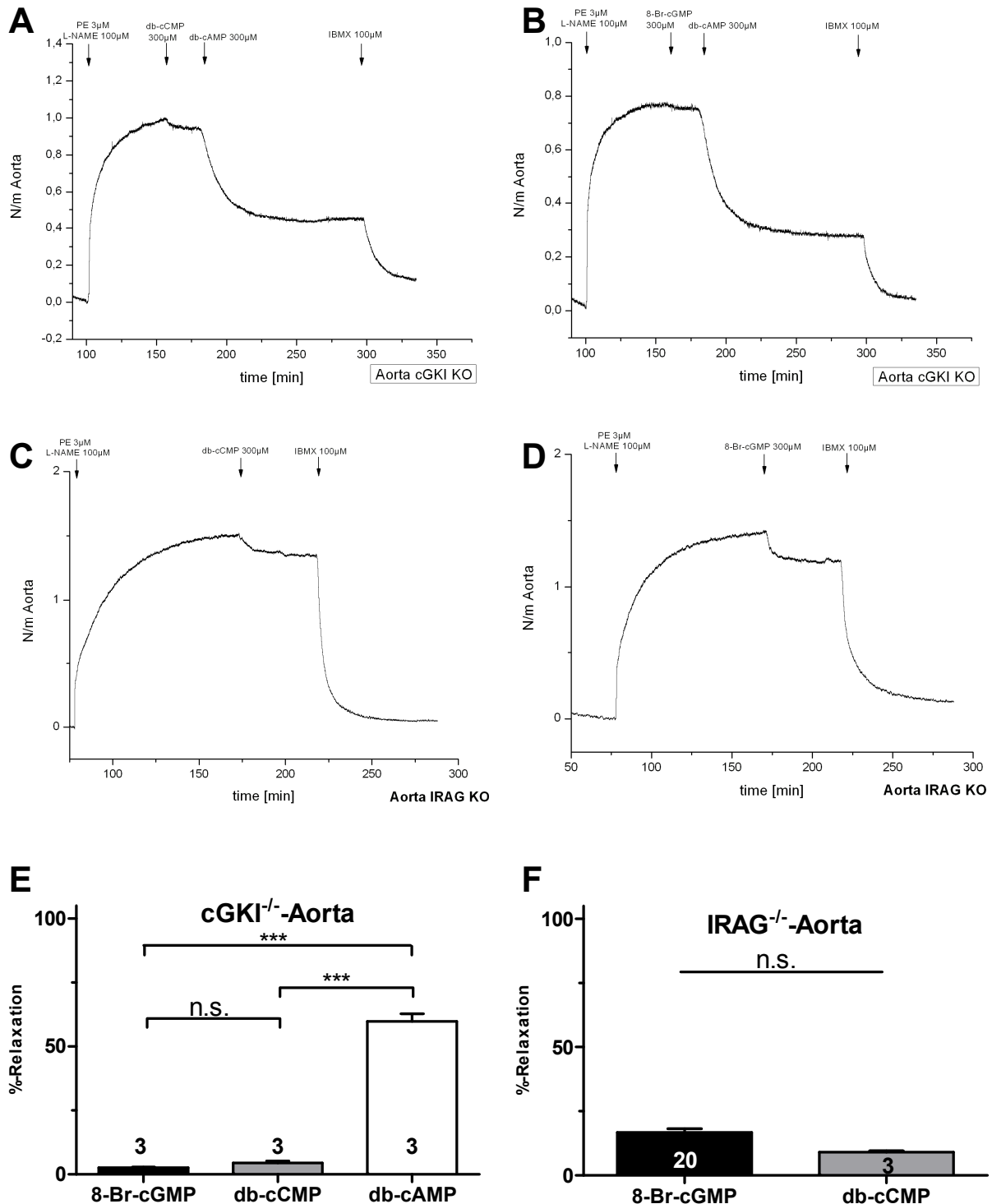


Abb. C.31. Defekt in der db-cGMP vermittelten Relaxation von genetisch verändertem Aortengewebe. Beispielerperiment eines vorkontrahierten cGKI-defizienten Aortenrings, der mit (A) db-cGMP (300 μ M) oder mit (B) 8-Br-cGMP (300 μ M) relaxiert wurde. Eine Reduktion des Tonus war nahezu nicht feststellbar. Eine Applikation von db-cAMP (300 μ M) konnte den Tonus anschließend signifikant senken. Dies zeigt, dass die Gewebe eine intakte cAMP-Signalkaskade aufweisen.

Vorkontrahiertes IRAG^{-/-}-Aortengewebe konnte ebenso verhältnismäßig schwach durch 8-Br-cGMP (siehe auch C.4.1.) oder db-cGMP relaxiert werden. Eine Applikation von IBMX (100 μ M) entspannte auf den ursprünglichen Basaltonus.

(E) statistische Auswertung von jeweils drei Experimenten aus (A) für cGKI-KO-Aorta: db-cAMP konnte den Tonus signifikant senken im Vergleich zu 8-Br-cGMP oder db-cGMP. (F) zeigt die Statistik für IRAG-KO-Aorten. Im Vergleich zu Wildtyp-Gewebe (vgl. Abb. C.28.E) war die Relaxation stark eingeschränkt.

Um die cCMP-vermittelte Glattmuskelrelaxation in vaskulärem Aortengewebe genauer zu charakterisieren, wurden die myographischen Experimente auch mit Aortengewebe von SM-cGKI α -rescue Tieren durchgeführt. SM-cGKI α -rescue-Tiere haben einen cGKI $^{-/-}$ -Hintergrund, jedoch wird cGKI α unter der Kontrolle des SM22-Promotors glattmuskelspezifisch überexprimiert („SMI α -rescue“). Dadurch kann die mittlere Überlebensfähigkeit der Tiere im Vergleich zu cGKI-total-KO-Tieren erheblich verlängert werden (Weber et al., 2007). Im Endeffekt handelt es sich somit bei SMI α -rescue-Tieren um glattmuskelspezifische cGKI $\beta^{-/-}$ -Tiere.

Eine myographische Analyse von SMI α -rescue-Aorten ergab ebenfalls einen Defekt in der tonussenkenden Eigenschaft von db-cCMP und 8-Br-cGMP (als Vergleich):

db-cCMP konnte einen durch PE (3 μ M) und L-NAME (100 μ M) induzierten Tonus bei SMI α -rescue-Gewebe nur noch um 11.2 ± 0.5 % senken (vgl. Tonusreduktion in Wildtyp-Aorten durch db-cCMP: 44.0 ± 2.8 %, Abb. C.32.A und C).

Als Vergleich konnte in SMI α -Aortengewebe ein induzierter Tonus nur noch um 37.7 ± 1.7 % mit 8-Br-cGMP reduziert werden (vgl. Tonusreduktion in Wildtyp-Aorta durch 8-Br-cGMP: 60.1 ± 2.2 %, Abb. C.32.B und C).

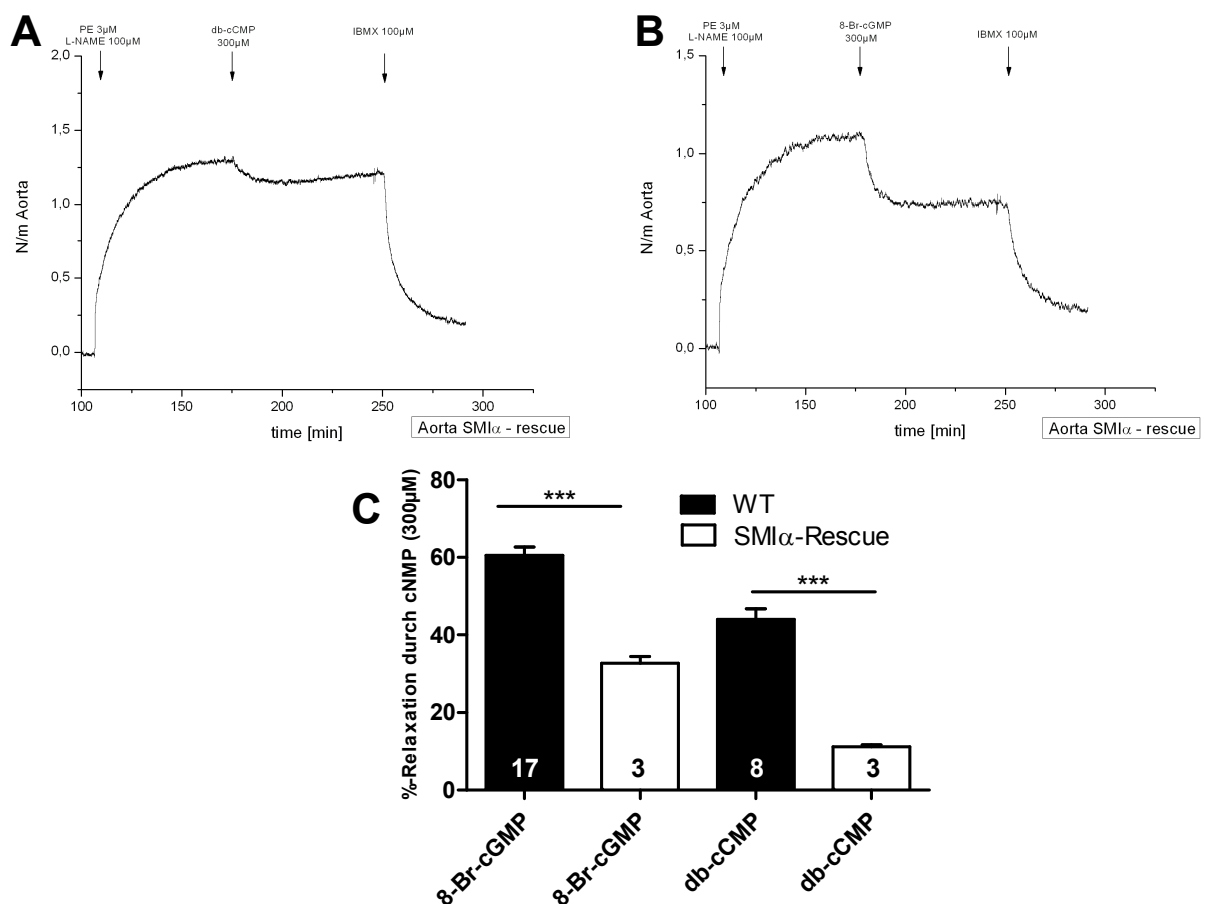


Abb. C.32. Relaxation von SMI α -rescue-Gewebe durch db-cCMP. Tonussenkung von Aortengewebe mit db-cCMP (A) und 8-Br-cGMP als Vergleich (B) nach Vorkontraktion. (C) Statistische Auswertung der in (A) und (B) gezeigten Versuche. Die Relaxation von db-cCMP war im Vergleich zu Wildtyp-Aortenringen jeweils signifikant verringert. Die Ziffern in den Säulen geben die Anzahl der Versuche wieder.

Die Resultate aus den Versuchen mit SMI α -Gewebe sowie die vorher unter Verwendung von IRAG^{-/-}-Aorten erzielten Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass cCMP im vaskulären glatten Muskel der Aorta gezielt über die cGKI β -Kaskade signalisiert.

C.8.3.4. Potentielle Sensibilisierung von cGKI durch cCMP

Möglicherweise könnte zyklisches CMP aber auch cG-Kinasen bezüglich einer Aktivierung durch cGMP sensibilisieren, d.h. eine stärkere Aktivierung der Kinasen bei geringeren (basalen) cGMP-Konzentrationen bewirken. Dies würde demnach den EC₅₀-Wert von cG-Kinasen für cGMP senken. Dieser potentielle Sensibilisierungseffekt konnte jedoch bereits durch Phosphotransferase-Experimente (Abb. C.26.) ausgeschlossen werden.

Deshalb sollte zusätzlich durch myographische Versuche an intaktem Aortengewebe widerlegt werden, dass endogene cGKI in glatten Muskelzellen durch cCMP auf cGMP sensibilisiert wird.

Um dies zu zeigen, wurden durch Phenylephrin (3 μ M) und L-NAME (100 μ M) vorkontrahierte Wildtyp-Aortensegmente zuerst mit einer subeffektiven Konzentration von db-cCMP (10 μ M) für 15 min inkubiert und dann eine submaximale Effekt-Konzentration von 8-Br-cGMP (100 μ M) zugegeben. Sollten cG-Kinasen durch cCMP gegenüber cGMP sensibilisiert werden, würde sich dies in einer verstärkten Relaxation zeigen.

Eine 15-minütige Vorinkubation von durch PE (3 μ M) und L-NAME (100 μ M) vorkontrahierten Aorten mit db-cCMP (10 μ M) hatte keinen Einfluss auf die Relaxation durch 100 μ M 8-Br-cGMP (8-Br-cGMP: 68.2 \pm 1.9 %, Abb. C.33.A und C; 8-Br-cGMP + db-cCMP: 64.3 \pm 1.2 %, Abb. C.33.B und C). Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den Phosphotransferase-Experimenten, mit denen ebenfalls keine Sensibilisierung von cGKI durch cCMP ermittelt werden konnte.

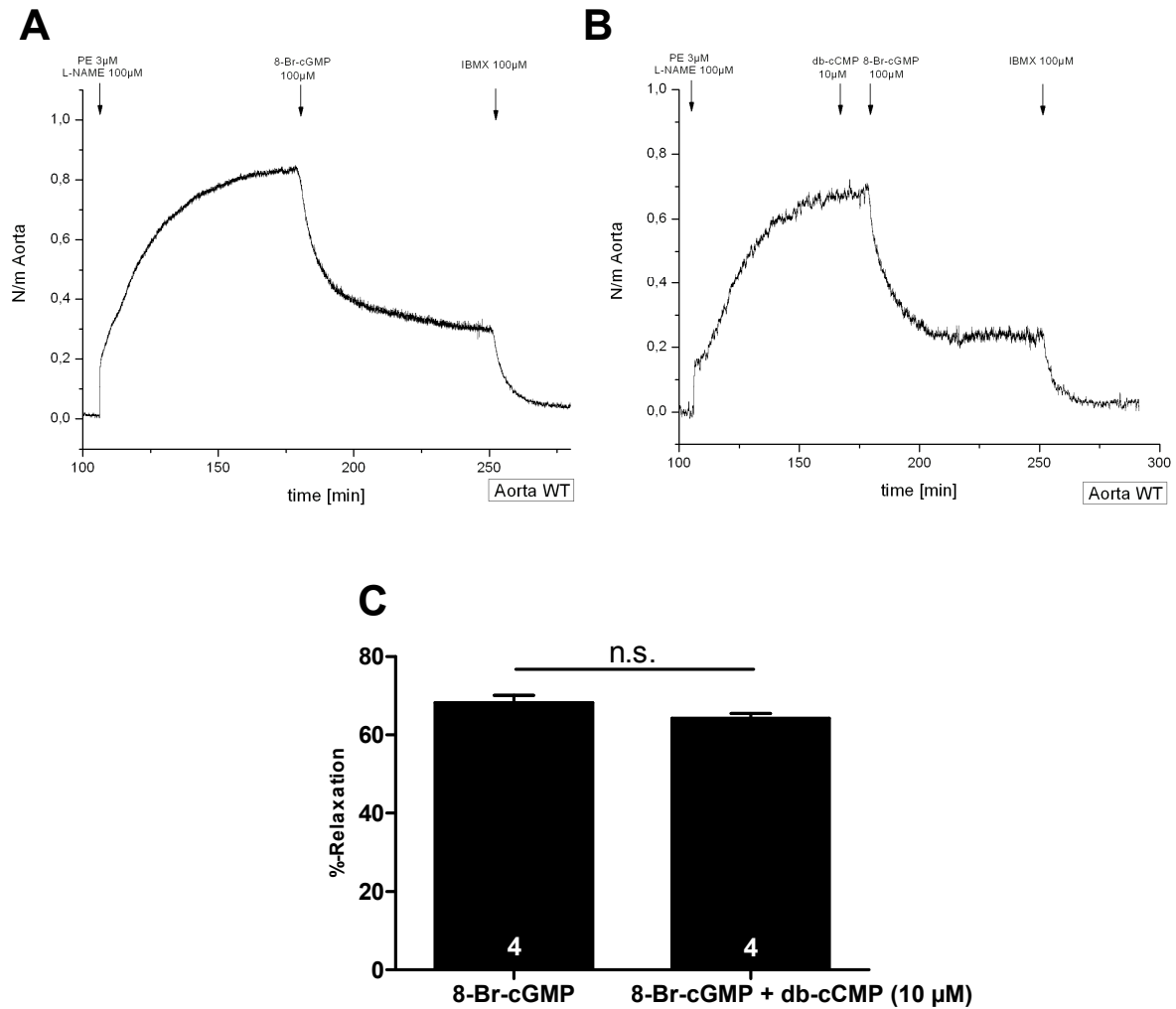


Abb. C.33. db-cGMP kann cGKI nicht sensibilisieren. (A) Relaxation eines vorkontrahierten Wildtyp-Aortensegments mit 100 μ M 8-Br-cGMP. (B) Relaxation eines vorkontrahierten Aortenrings mit 8-Br-cGMP nach 15 min. Vorinkubation mit db-cGMP (10 μ M). (C) Statistische Auswertung der Versuche (A) und (B). Es konnte keine Verstärkung der Relaxation durch db-cGMP-Vorinkubation ermittelt werden. (N ist jeweils in den Säulen angegeben).

Demnach kann zusammenfassend der Schluss gezogen werden, dass cGMP (im Gegensatz zu db-cGMP, welches lediglich einen „Prodrug“-Charakter aufweist) cGKI direkt im vaskulären glatten Muskel aktiviert und damit zu einer Relaxation von vorkontrahiertem Gewebe führt. Die Signalkaskade über cA-Kinasen spielt dabei im Vergleich zur Aktivierung von cG-Kinasen in Aortengewebe eine untergeordnete Rolle.

D. Diskussion

D.1. Physiologische Rolle von IRAG im glatten Muskel

Die Modulation der zytosolischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ spielt in vielen zellulären und physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Beispiele hierfür sind Neurotransmission, Vesikeldegranulation oder Kontraktion und Relaxation von glatten Muskelzellen des kardiovaskulären und gastrointestinalen Systems. Speziell die Relaxation glatter Muskelzellen, d.h. die Absenkung bzw. die Modulation der Sensibilität auf gleich bleibende $[Ca^{2+}]_i$ scheint überwiegend über die NO/cGMP- bzw. ANP/cGMP-cGKI Signalkaskade reguliert zu werden. Dabei werden zahlreiche Substrate der beiden cGKI-Isoenzyme cGKI α und cGKI β phosphoryliert, die den entsprechenden Teil der Signalkaskade fortsetzen. Diese einzelnen Mechanismen, bzw. Signalwege überlagern sich dabei. Die Relevanz eines Weges ist zusätzlich erschwert zu charakterisieren, da die Bedeutung der cGKI-Isoenzyme in diversen glattemuskelhaltigen Geweben jeweils unterschiedlich sein kann.

Ein bis dato wichtiger und stabiler Signalkomplex der cGKI besteht aus der Interaktion von cGKI β , IRAG und dem IP₃-Rezeptor I, der im endoplasmatischen Retikulum verankert ist und erheblich an der Steuerung der $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt ist (Ammendola et al., 2001, Schlossmann et al., 2000). Durch Aktivierung von cGKI β kommt es zu einem verminderten Ausstrom von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die IRAG-defiziente Maus insbesondere auf kardiovaskulärer Ebene charakterisiert werden.

Die myographische Analyse von isoliertem Glattemuskel-Gewebe mit IRAG-Defizienz (kardiovaskulär und gastrointestinal) zeigte, dass IRAG für die Reduktion von hormonell (bzw. hormonähnlich) gesteigertem Tonus essentiell zu sein scheint. Ein Carbachol-induzierter Tonus ließ sich in IRAG-defizientem, isoliertem Colon- und Jejunum-Gewebe wesentlich schlechter durch 8-Br-cGMP und NO (in Form von DEA-NO) relaxieren als Wildtyp-Gewebe. IRAG-Knockout-Tiere versterben median nach etwa 29 Wochen. Tiere, die rein statistisch kurz vor dem Exitus stehen, weisen bei Eröffnung des Abdomens einen stark dilatierten Gastrointestinaltrakt (Oesophagus, Magen, Caecum) mit üblem, „gärigem“ Geruch auf, was auf eine Maldigestion schließen lässt, analog den IRAG- $\Delta 12$ -Tieren (Geiselhöringer et al., 2004). Warum die Tiere frühzeitig versterben ist bis jetzt noch ungeklärt, jedoch könnte der Grund eine Malfunktion des Gastrointestinaltraktes sein (verlängerte Magen-Darm-Passage durch Glattemuskelinsuffizienz), da beispielsweise eine Perforation des Darms zu einer Sepsis führen könnte. Dies bedarf jedoch noch genauerer Untersuchung.

Im Colon von IRAG^{-/-}-Tieren konnte eine verstärkte Expression von MYPT1, einem Substratprotein der cGKI α gefunden werden (Given et al., 2007). Hierbei könnte es sich möglicherweise um einen Kompensationsmechanismus handeln. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in Jejunum eine Relaxation überwiegend durch Calciumdesensitisierung und in Colon durch eine Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ über IRAG erfolgt (Frei et al., 2009). Möglicherweise könnte dadurch die verstärkte Expression von MYPT1 im Colon von IRAG-defizienten Mäusen erklärt werden. Bei MYPT1 handelt es sich um eine regulatorische Untereinheit der Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase (MLCP). Wenn MYPT1 über cGKI aktiviert wird, wird die Phosphataseaktivität erhöht und die Sensibilität des kontraktile Apparates auf $[Ca^{2+}]_i$ verringert (Calciumdesensitisierung). Ob durch die erhöhte Expression von MYPT1 folglich auch eine verstärkte Calciumdesensitisierung nach cGKI-Aktivierung erfolgt, muss durch weitere Experimente noch geklärt werden. Wenn der kontraktile Apparat also vermindert auf $[Ca^{2+}]_i$ anspricht, könnte dies einen möglichen Kompensationsmechanismus infolge der IRAG-Defizienz erklären. Trotzdem ist aber ein ausgeprägter gastrointestinaler Phänotyp bei IRAG-KO-Tieren zu erkennen.

Die Relaxation von IRAG-defizientem, vaskulärem glatten Muskel war nach Applikation von cGMP-Analoga, exogen applizierten NO-Donoren (DEA-NO), Acetylcholin und ANP sehr stark beeinträchtigt. Ebenfalls konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ -Aortenringe, bei denen die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃RI zerstört ist, im Vergleich zu Wildtyp-Aorten schlechter mit 8-Br-cGMP relaxierten (Geiselhöringer et al., 2004). Das Verhalten von IRAG- Δ^{12} -Aorten auf DEA-NO, Acetylcholin und ANP wurde damals nicht untersucht. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass der Signalmechanismus beider cGMP-Quellen (sGC und pGC) in vaskulärem Gewebe nach hormonähnlicher Kontraktion überwiegend über die cGKI β /IRAG/IP₃RI Kaskade abläuft.

Exogen appliziertes DEA-NO führte, wie bereits erwähnt, zu einer starken Relaxation von Wildtyp-, IRAG^{-/-}- und IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ -Aorten. Die Unterschiede in der durch DEA-NO (entspricht exogenem NO) hervorgerufenen Relaxationen waren zwar zwischen allen Geweben sehr gering, jedoch signifikant. Eine Relaxation von Aorten mit Acetylcholin (durch endogene NO-Synthese über eNOS) führte ebenfalls zur Relaxation, jedoch mit hoch signifikanten Unterschieden zwischen IRAG-defizienten, bzw. IRAG-mutierten und Wildtyp-Aorten. Die endogene NO-Generierung hat aber eine höhere physiologische Relevanz, da NO dabei einerseits lokal am Gefäß wirkt (Diffusion vom Endothel in die Glattmuskelzellen) und andererseits in physiologischen Konzentrationen entsteht.

Deshalb könnte der Unterschied der Aortenrelaxation bezüglich exogen und endogen appliziertem NO durch eine Kreuzaktivierung des cAMP-Signalweges durch cGMP erklärt werden. In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass beispielsweise

cGMP in Aorten auch über den cAMP-Signalweg relaxiert (Wörner et al., 2007). Selbst cGKI-defiziente Aorten konnten mit DEA-NO in niedrigen mikromolaren Konzentrationen relaxiert werden (Sausbier et al., 2000).

Desweiteren kann eine Wirkung von NO-Konzentrationen, die viel höher als physiologische Konzentrationen sind, über andere Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine NO vermittelte Relaxation (exogen über DEA-NO und SNP, 10 μ M) von murinem Aortengewebe anscheinend größtenteils über cGMP-unabhängige Mechanismen durch SERCA-Aktivierung und zu einem kleineren Teil über cGMP-abhängige, Calcium-desensitisierende Effekte abläuft (Van Hove et al., 2009). Dies würde zwar die kleinen, signifikanten Unterschiede in der Relaxation von Wildtyp und IRAG-mutiertem, bzw. -defizientem Gewebe erklären, jedoch nicht, warum bei Applikation von Acetylcholin bei intaktem Endothel solch große, hochsignifikante Unterschiede in der Relaxation festzustellen waren. Die Quelle von NO scheint, entgegen der Behauptung in der Arbeit von Van Hove et al., 2009, eine entscheidende Rolle zu spielen. In der genannten Arbeit wurden Konzentrationen von 10 μ M für DEA-NO und SNP verwendet, was nach Ansicht von anderen Autoren (Sausbier et al., 2000) bereits eine Kreuzaktivierung des cAMP-Signalweges hervorrufen kann. Eine Aktivierung von eNOS über einen Calciumanstieg (durch Acetylcholin vermittelt) könnte somit eine Erklärung sein, warum eine physiologische NO-Synthese den glatten Muskel über cGKI relaxiert, wohingegen eine exogene Applikation mit DEA-NO auch den cAK-Signalweg aktiviert und daher cGKI-unabhängig relaxiert.

IRAG bildet mit dem IP₃RI und cGKI β einen stabilen Komplex, der überwiegend an der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ über IP₃ nach hormonbedingter Aktivierung beteiligt ist. Jedoch kann intrazelluläres Calcium auch durch Öffnung und Schließung von TRP-Kanälen (TRP: transient receptor potential) abhängig von cGKI moduliert werden (Kwan et al., 2004). TRP-Kanäle lassen sich ebenfalls Gq-abhängig über Diacylglycerol (DAG) öffnen und werden als sog. SOCs bezeichnet (SOC: store operated channels). Durch Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher werden diese TRPs aktiviert. Zwischen den N-Termini von IP₃R und den C-Termini von TRP-Kanälen konnte eine Interaktion festgestellt werden (Tiruppathi et al., 2002). Ob somit IRAG aufgrund seiner IP₃R-Assoziation an einer direkten Öffnung oder Hemmung von TRP-Kanälen beteiligt ist, bedarf weiterer Aufklärung. TRPC6 führt nach Öffnung zum intrazellulären Anstieg von Calcium und damit über eine NFAT (nuclear factor of activated T-cells) Aktivierung zur Gentranskription. TRPC6 ist cGKI α -abhängig hemmbar. Da auch TRPC6 unter der Kontrolle von NFAT steht, ist somit eine positive Feedback-Schleife möglich, die durch cGKI α unterbunden werden kann (Koitabashi et al., 2009). Dies wäre somit eine weitere Möglichkeit, $[Ca^{2+}]_i$ über SOCs zu erhöhen und über cGKI zu regulieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte nochmals bestätigt werden, dass IRAG ausschließlich an der hormonvermittelten Calciumregulation beteiligt ist. An der Relaxation der durch Depolarisation induzierten Kontraktion ist der cGKI β /IRAG-Signalkomplex nicht beteiligt. Eine Depolarisation durch 85 mM extrazelluläres Kalium steigerte den Tonus von vaskulärem Glattmuskelgewebe von Wildtyp und IRAG-KO-Gewebe durch Calciumeinstrom über L-Typ-Calciumkanäle, der durch Nifedipin komplett unterdrückt werden konnte. Relaxiert man im Anschluss durch 8-Br-cGMP, so konnte zwischen beiden Gewebetypen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei dieser Art der Kontraktion entsteht kein IP₃, welches einen Ausstrom von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum vermittelt. Somit war in IRAG-defizientem Gewebe erwartungsgemäß kein Unterschied in der Relaxation zu beobachten. Ebenso war in IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ -Aorten die Relaxation durch K⁺-Depolarisation nicht verändert (Geiselhöringer et al., 2004).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass IRAG an beiden Prozessen der cGMP-vermittelten Glattmuskelrelaxation beteiligt ist (unabhängig davon, ob das IRAG-Protein fehlt (IRAG^{-/-}) oder mutiert ist (IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$)): einerseits über den NO-Rezeptor sGC, andererseits den ANP-Rezeptor pGC. Für den Wirkungsmechanismus ist jedoch eine Hormon-vermittelte Kontraktion über PLC β 3 und IP₃ Generierung notwendig.

Eine beeinträchtigte Relaxation bei IRAG^{-/-}- oder IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ -Gewebe könnte aber durch eine verminderte cGMP-Synthese bedingt sein. Anhand dieser Arbeit konnte dies aber widerlegt werden, da nach NO-Stimulation die cGMP-Synthese in Aorten der IRAG-KO- und der IRAG- Δ^{12} -Linie im Vergleich zu Wildtyp-Gewebe nicht verändert war.

Bei IRAG-KO-Tieren war auch das Expressionsniveau von cGKI β im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermindert ist. Deshalb könnte sich auch dadurch eine eingeschränkte cGKI-vermittelte Relaxation erklären lassen, da infolge einer geringeren cGKI β -Expression auch cGKI β -spezifische Substrate weniger aktiviert werden würden. Durch Kreuzung von IRAG-defizienten Tieren (IRAG^{-/-}) mit Mäusen, die glattmuskelspezifisch cGKI β unter der Kontrolle des SM22-Promotors (unter ansonsten normalem cGKI-Hintergrund) überexprimierten, konnten Tiere generiert werden, die trotz IRAG-Defizienz ein normales Expressionsniveau von cGKI β in glattmuskelhaltigen Geweben aufwiesen (Genotyp: IRAG^{-/-}/SM-cGKI β^{tg} /cGKI^{+/+}).

Interessanterweise blieb eine defekte Glattmuskelrelaxation in Colon, Jejunum und Aorta trotz cGKI β -Normalexpression unter einem IRAG^{-/-}-Hintergrund bestehen.

Kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der Tiere unter einem cGKI^{-/-}-Hintergrund entweder cGKI α oder cGKI β glattmuskelspezifisch unter der nicht physiologischen Kontrolle des SM22-Promotors exprimierten („cGKI α -rescue“ und „cGKI β -rescue“). Mit diesen Tieren konnten spezifische Funktionen von cGKI α und cGKI β in glatter Muskulatur

untersucht werden. Sowohl cGKI α -rescue- als auch cGKI β -rescue-Tiere zeigten einen normalen mittleren arteriellen Blutdruck und entnommene Aorten dieser Tiere verhielten sich bezüglich cGKI-stimulierter Relaxation wie Aorten von Wildtyp-Nagern (Weber et al., 2007). Demnach sollte man bei Aorten von IRAG-defizienten Tieren mit cGKI β -Normalexpression ebenfalls die gleichen cGMP-vermittelten relaxierenden Eigenschaften erwarten wie bei Aorten von Wildtyp-Tieren. Die Expressionslevel der jeweiligen cGKI-Isoenzyme befanden sich in der Arbeit von Weber et al., 2007 aber nicht auf Normniveau (cGKI α stark überexprimiert). Weiterhin wurden in der Arbeit cDNAs von bovinen cG-Kinasen verwendet. Aktivitätsunterschiede zwischen bovinen und murinen Kinasen könnten daher eine große Rolle spielen, da bovine Kinasen für murine Substrate andere Spezifitäten und Affinitäten haben könnten. Desweiteren standen die bovinen cG-Kinasen unter der Kontrolle des SM22 Promotors, der nicht unter den gleichen Bedingungen reguliert wird, wie der bis dato nicht charakterisierte endogene Promoter der cGKI (siehe cGKI α -Überexpression). Dies könnte erklären, warum die eine cGKI-Isoform die Funktionen der anderen Isoform kompensieren könnte.

In IRAG-KO-Gewebe war keine kompensatorische Überexpression von cGKI α im Gegensatz zur IRAG Δ 12-Mutante detektierbar (Geiselhöringer et al., 2004).

IRAG-KO- und IRAG- Δ 12-Aorten waren in der cGKI-vermittelten Relaxation ähnlich stark defizient verglichen mit Wildtyp-Aorten. Dennoch haben beide IRAG-Mauslinien keinen identischen Phänotyp. So ist beispielsweise der Blutdruck von IRAG Δ 12 Δ 12-Tieren leicht erniedrigt (persönliche Mitteilung von Dr. Dominik Bernhard) im Vergleich zu IRAG $^{-/-}$ -Tieren (siehe D.2.). Auch konnte bei IRAG- Δ 12-Tieren im Modell der Hinterbeinperfusion kein NO-vermittelter Druckabfall, bzw. keine signifikante NO-vermittelte Gefäßerweiterung verglichen mit Wildtyp oder IRAG $^{-/-}$ -Tieren festgestellt werden (persönliche Mitteilung von Bernhard Hieke und Dr. Dominik Bernhard).

Der Unterschied zwischen der IRAG-KO- und IRAG- Δ 12-Mauslinie könnte sein, dass IRAG in der Δ 12-Mutante zwar funktionslos ist, weiterhin aber cGKI β binden kann, was mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt werden konnte. Bei einer Immunpräzipitation mit IRAG-Antikörper (oder cGMP-Agarose) aus IRAG- Δ 12-Gewebe wurde cGKI β gemeinsam mit IRAG gefällt. Der IP $_3$ RI war in diesem Komplex nicht zu detektieren (Geiselhöringer et al., 2004). Im intakten IRAG- Δ 12-Gewebe könnte cGKI β somit weiterhin an IRAG- Δ 12-Protein gebunden bleiben und somit an der Phosphorylierung von anderen potentiellen Substraten gehindert werden. Im IRAG-KO-Gewebe ist die Interaktion von cGKI β mit IRAG unterbunden und somit das Enzym für weitere Substrate verfügbar. Ob es noch weitere potentielle (Ca $^{2+}$ -regulatorische) Substrate für cGKI β gibt, muss noch geklärt werden. Für die Identifikation dieser Substrate eignet sich daher die IRAG-KO-Mauslinie besonders, da der stabile trimere Komplex aus IRAG, cGKI β und IP $_3$ RI zerstört ist.

Abb. D.1. veranschaulicht die Signalkaskade einer glatten Muskelzelle in Kombination mit einer Endothelzelle.

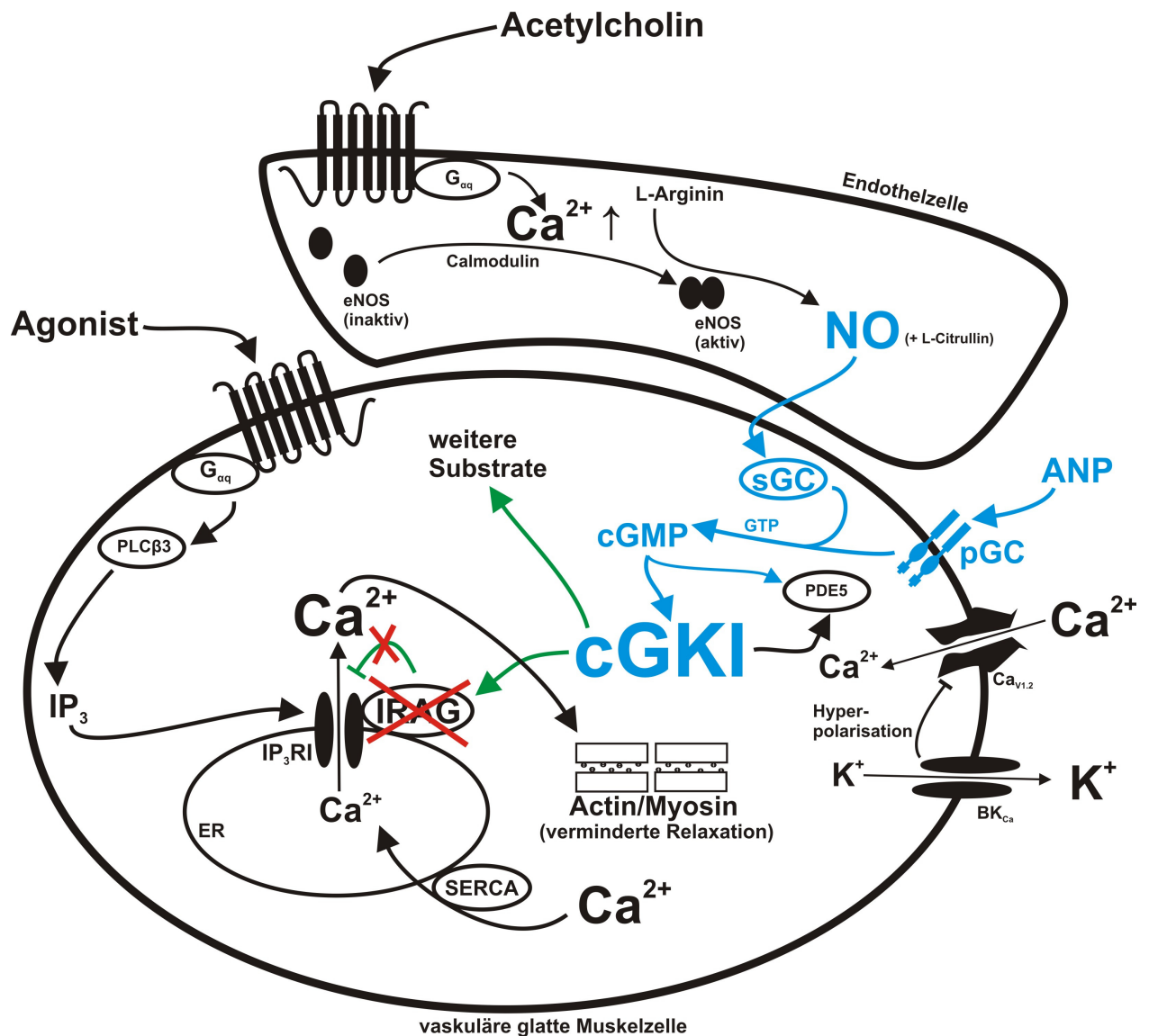


Abb. D.1. cGKI-Signalkaskade im vaskulären glatten (IRAG-KO)-Muskel. Acetylcholin aktiviert den endothelialen M₃-Rezeptor, wodurch es zum Anstieg der [Ca²⁺]_i kommt. Calcium/Calmodulin-abhängig wird eNOS aktiviert und es wird NO synthetisiert, das in den glatten Muskel diffundiert. Dort wird NO-abhängig sGC oder ANP-abhängig pGC aktiviert, wodurch [cGMP]_i steigt. cGMP aktiviert cGKI und führt über verschiedene Substrate zur Senkung von [Ca²⁺]_i und/oder zur Calciumdesensibilisierung. Dadurch relaxiert der glatte Muskel.

Fehlt das cGKIβ-Substrat IRAG (IRAG^{-/-}, rot durchgestrichen) oder ist die Interaktionsstelle mit dem IP₃RI deletiert (IRAG^{Δ12/Δ12}, nicht dargestellt), ist die Glattmuskelrelaxation stark beeinträchtigt.

Wichtige Abkürzungen: ER: endoplasmatisches Retikulum; BK_{Ca}: Calcium-abhängiger Kaliumkanal; Ca_{V1.2}: ein spannungsabhängiger Calciumkanal; PLC: Phospholipase C; ANP: Atriales natriuretisches Peptid; SERCA: Sarko-endoplasmatisches Retikulum Ca²⁺-ATPase.

Für cG-Kinasen werden auch gentranskriptionale Eigenschaften postuliert. So konnte in heterolog exprimierten Zellen („baby hamster kidney“, BHK) gezeigt werden, dass cGKI β nach cGMP-Stimulation in den Zellkern transloziert (Casteel et al., 2008). Wurde IRAG mit cGKI β in BHK-Zellen koexprimiert, konnte cGKI β nach cGMP-Stimulation nicht mehr im Zellkern detektiert werden. IRAG fungierte in diesem Fall sozusagen als „GKAP“ (G-kinase anchoring protein). Somit könnte cGKI β gentranskriptionale Funktionen haben, zumal die Kinase spezifisch auch mit TFII-I (Transkriptionsfaktor) interagiert (Casteel et al., 2005). Kürzlich wurde auch eine sog. cGKI γ -Isoform im Golgiapparat und im Nukleus von vaskulären Glattmuskelzellen lokalisiert (Sugiura et al., 2008). Bei cGKI γ handelt es sich um ein 60 kDa-Fragment, welches konstitutiv aktiv ist (C-Terminus von cGKI, ohne Leucinzipper). Aufgrund des identischen C-Terminus von cGKI α und cGKI β könnte cGKI γ von beiden Isoenzymen stammen. Da cGKI nachweislich an Gentranskriptionen beteiligt ist (Casteel et al., 2008), könnte diese Proteolyse im Golgiapparat ein Prozess sein, um cGKI translokationsfähig zu machen, um im Nukleus zellkernspezifische Proteine (z.B. CREB: cAMP response element binding protein) zu phosphorylieren (Sugiura et al., 2008).

In der IRAG-KO-Maus fehlt IRAG als stabiler Interaktionspartner von cGKI β (GKAP-Funktion von IRAG). Dadurch könnte cGKI β vermehrt im Zytosol gelöst vorliegen und für andere Prozesse (z.B. Proteolyse zu cGKI γ) verfügbar sein. Demnach eignet sich die IRAG-KO-Mauslinie, um zukünftig weitere, bisher unbekannte Eigenschaften von cGKI β genauer zu analysieren. Gentranskriptionale oder cGKI β -autoregulatorische Unterschiede (verminderte Expression von cGKI β in IRAG KO-Gewebe) zwischen IRAG-KO- und Wildtyp-Tieren könnten somit mit Gen-Arrays untersucht werden.

D.2. Der Einfluss von IRAG auf die Blutdruckregulation

In Industriestaaten führen kardiovaskuläre Ereignisse die Liste der häufigsten Todesursachen an (statistisches Bundesamt Deutschland). Kardiovaskuläre Ereignisse beginnen meist mit symptomlosen Hypertonien, die verschiedene Ursachen haben können. Bei einer primär essentiellen Hypertonie, die etwa 90 - 95 % aller Hypertonien ausmacht, handelt es sich weitestgehend um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, die in der Regel genetischen Ursprungs ist. Ätiologische Faktoren hierfür sind oft erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentrationen, eine gesteigerte Aktivität des Sympathikus oder auch psychosoziale Faktoren. Die restlichen 5-10 % der Fälle sind sog. sekundäre symptomatische Hypertonien. Davon sind etwa 25 % auf Erkrankungen des Nierenparenchyms oder der Nierengefäße (renale Hypertonie) mit akuten glomerulären bzw. renovaskulären Erkrankungen oder chronischen Nierenleiden zurückzuführen. Etwa 3 % beruhen auf endokrinen Störungen, wie z.B. Phäochromozytom, Cushing-Syndrom, Hyperthyreose oder Akromegalie. Der Rest ist auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen (Aortenklappeninsuffizienz, Aortenisthmusstenose) (Quelle: Schmidt, Lang, Thews: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 29. Auflage).

Der Blutdruck (oder Gefäßdruck) wird in der Regel in einem Spitzenwert (Systole) und einem Minimalwert (Diastole) in mmHg ermittelt. Aussagekräftiger ist aber der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) der sich näherungsweise über die Summe des diastolischen Druckwertes und einem Drittel aus der Differenz von Systole und Diastole errechnet. Exakt berechnet ist der MAP das Produkt aus Herzauswurfleistung und der Compliance der Aorta, zu dem der zentrale Venendruck addiert wird. Physiologisch wird der Blutdruck auf komplexe Weise reguliert und aufrechterhalten. Dabei wirken eine Reihe verschiedener Mechanismen zusammen.

Die kurzfristige Regulation des Blutdrucks hängt primär mit der Aktivität des Sympathikus zusammen. Eine Sympathikusaktivierung erhöht den Druck (beispielsweise bei Anstrengung, Sport), eine Verminderung der Sympathikusaktivität senkt den Druck. An der langfristigen Regulation des Blutdrucks sind die Niere und das darüber regulierte Renin-Angiotensin-System (RAS) maßgeblich beteiligt (Cowley, 1992, Fukamizu et al., 1993). Die Protease Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen der renalen afferenten Arteriolen synthetisiert. Renin hat biologisch keine direkte Funktion, spaltet aber das überwiegend in der Leber (aber auch in Herz, Niere und Fettgewebe) gebildete Angiotensinogen zum Decapeptid Angiotensin I (AngI). AngI wird vom „angiotensin converting enzyme“ (ACE) in das Octapeptid AngII gespalten, welches seine physiologischen Funktionen über die AngII-Rezeptoren 1 (und 2) (AT-1 und AT-2) entfaltet (Lavoie et al., 2003). Dazu gehören beispielsweise Glattmuskelkontraktion, Hypertrophieinduktion am Herzen und pro-

inflammatorische Funktionen an Gefäßen, die über AT-1 Rezeptoren vermittelt werden (Pandey et al., 2009).

Aufgrund der entscheidenden Bedeutung des IRAG-Signalweges für die cGMP-vermittelte Glattmuskelrelaxation wurde daher der Blutdruck von IRAG-defizienten Tieren bestimmt. Hierfür wurde eine radiotelemetrische Methode gewählt.

In Korrelation mit Daten von Dr. Dominik Bernhard konnte bei IRAG^{-/-}-Tieren keine Differenz im basalen Blutdruck von wachen und schlafenden Tieren ermittelt werden. Ebenso waren die Aktivität, die Herzfrequenz und der Pulsdruck der Mäuse im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Geschwistern unverändert. Dies war zu erwarten, da bei cGKI-defizienten adulten Mäusen der basale Blutdruck ebenfalls unverändert ist (Pfeifer et al., 1998).

Anschließend wurde der Effekt von NO-freisetzenden Pharmaka auf den Blutdruck in Wildtyp- und IRAG-defizienten Mäusen analysiert. Sowohl SNP als auch DETA-NO-Applikationen reduzierten den Blutdruck bei Wildtyp und KO-Tieren in gleichem Maße. Eine direkte Stimulation der sGC (durch YC-1) führte ebenfalls zu einer Drucksenkung, die jedoch bei beiden Maus-Genotypen nicht so ausgeprägt war.

Dies basalen Blutdruckergebnisse und die Reduktion des Blutdrucks durch NO-freisetzende Pharmaka zeigt, dass IRAG an der Regulation des mittleren arteriellen Blutdrucks unter physiologischen Basalbedingungen nicht beteiligt ist. Es wurden myographisch zwar signifikante Unterschiede in der Relaxation von Wildtyp- und IRAG^{-/-}-Aorten analysiert, jedoch lassen sich diese Ergebnisse nicht auf die Blutdruckregulation *in vivo* übertragen, da die Aorta primär nicht an der kurzfristigen Blutdruckregulation durch Widerstandsänderung beteiligt ist. Eine Blutdruckänderung erfolgt überwiegend über kleinere terminale Arterien und Arteriolen (sog. Widerstandsgefäße) und über das venöse System (Kapazitätsgefäße), was zukünftig noch detaillierter an IRAG^{-/-}-Mäusen analysiert werden sollte.

Im Gegensatz zur kurzfristigen Blutdruckregulation wird die chronische Blutdruckregulation überwiegend volumenabhängig renal über das RAS reguliert. Daher ist es ersichtlich, dass basal keine Blutdruckunterschiede zwischen Wildtyp und IRAG-KO-Tieren auftreten. Eine Expression von IRAG in RAS-regulierenden Abschnitten der Niere (z.B. juxtaglomerulärer Apparat) konnte nach intensiver Analyse ausgeschlossen werden (persönliche Mitteilung von Elisabeth Schinner). Daher liegt es nahe, dass IRAG an der chronischen Blutdruckregulation über die Niere nicht beteiligt ist. Weiterhin könnten Kompensationsmechanismen (analog der Überexpression von MYPT1 im Colon bei IRAG-defizienten Tieren) in anderen Abschnitten des arteriellen Systems möglich sein. In der Aorta wurde eine Reihe von cGKI-Substraten mittels Westernblot analysiert. Dabei

konnten jedoch keine Expressionsunterschiede festgestellt werden (z.B. sGC β 1 oder RGS2).

Es gibt jedoch auch verschiedene Arbeiten, die zeigen, dass eine Inaktivierung von Genen aus der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade zu Hypertonien führen kann. So resultierte eine ubiquitäre Deletion des Gens für sGC (β 1-Untereinheit) bei Mäusen in einer ausgeprägten Hypertonie (Friebe et al., 2007). Selbst ein glattmuskelspezifisches Ausschalten der sGC β 1-Untereinheit reicht aus, um bei Mäusen eine Hypertonie zu erzeugen (Groneberg et al., 2010).

Darüber hinaus kann man durch Deletion des RGS2-Gens bei Mäusen ebenfalls eine Hypertonie induzieren (Heximer et al., 2003). Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass sich bei einem inaktivierten RGS2-Gen die Wirkung von AngII verstärkt (Hercule et al., 2007, Calo et al., 2008). Dies spricht daher dafür, dass RGS2 an einer chronischen Blutdruckregulation in Zusammenspiel mit dem RAS beteiligt ist, da durch dieses Protein unmittelbar in die GPCR-Signalkaskade eingegriffen wird.

Auch bei juvenilen cGKI^{-/-}-Tieren konnte ein erhöhter Blutdruck gemessen werden (Pfeifer et al., 1998). Durch gezielte glattmuskuläre Expression („Rescue“) von entweder cGKI α oder cGKI β (unter cGKI-KO-Hintergrund) ist aber diese Hypertonie wieder normalisierbar (Weber et al., 2007).

Im Gegensatz dazu scheinen aber IRAG- Δ 12-Tiere leicht hypoton zu sein (persönliche Mitteilung von Dr. Dominik Bernhard). In IRAG- Δ 12-Gewebe konnte eine Überexpression von cGKI α festgestellt werden, die ggf. (über)kompensatorisch wirkt (Geiselhöringer et al., 2004). Eine dadurch verstärkte Basalaktivität von cGKI α , die wichtige Blutdruck-regulierende Substrate wie RGS2, MYPT1 oder BK_{Ca} (Sausbier et al., 2005) steuert, könnte die geringe Blutdrucksenkung erklären. Eine verstärkte Expression von cGKI α konnte bei IRAG-defizienten Tieren (bei denen ein normaler Blutdruck ermittelt wurde) nicht festgestellt werden.

Interessanterweise zeigen hauptsächlich solche Tiere einen stark erhöhten Blutdruck, bei denen Gene inaktiviert wurden, die die cGKI-Signalkaskade stimulieren (eNOS (Shesely et al., 1996, sGC)). Möglicherweise kann somit eine Defizienz von „upstream“-Proteinen der cGKI-Signalkaskade schlechter durch andere Proteine kompensiert werden, wohingegen deletierte Substrate der cGKI (z.B. IRAG), d.h. „downstream“-Proteine durch überexprimierte andere Substrate ersetzt werden können. So wird zum Beispiel IRAG in BK_{Ca}-defizienten Tieren verstärkt exprimiert (Sausbier et al., 2005).

Septischer Schock und Sepsis fordern mit einer Mortalitätsrate von über 50 % nach wie vor zahlreiche Todesopfer in Deutschland (Engel et al., 2007). Ein gravierendes Problem bei septischen Patienten ist neben der Therapie der Ursache der Sepsis auch die Kontrolle des Blutdrucks. Durch eine iNOS-Induktion werden im Serum NO-

Konzentrationen generiert, die bis zu 1000-fach höher sein können als basale NO-Konzentrationen. Dadurch resultiert bei einer schweren Sepsis, bzw. im septischen Schock u.a. ein starker Abfall des MAP, der sich nur sehr schwer behandeln lässt (Cobb, 2001, Russell, 2006).

Um die Rolle von IRAG für die Blutdruckregulation unter pathophysiologischen Gesichtspunkten zu analysieren, wurde IRAG^{-/-}-Tieren *E.coli* Lipopolysaccharide (LPS) injiziert und damit ein Sepsis-ähnlicher Zustand induziert.

Interessanterweise waren IRAG^{-/-}-Mäuse unter pathophysiologischen Bedingungen einer Sepsis (LPS-induziert) gegenüber einer starken Reduktion des MAP in den ersten sechs Stunden nach LPS-Applikation resistent (Reduktion bis zu 28 mmHg bei Wildtyp-Tieren; bis zu 3 mmHg bei IRAG-KO-Tieren). IRAG-KO-Mäuse waren nach 6-12 Stunden auch aktiver als ihre Wildtyp-Geschwister und erweckten objektiv betrachtet aufgrund Körperhaltung, Agilität und Fellpflege den Anschein eines besseren Allgemeinbefindens. IRAG könnte daher unter pathophysiologischen Bedingungen, insbesondere unter exzessiver längerfristiger Stickstoffmonoxid-Bildung an einer akuten Blutdruckregulation beteiligt sein.

Eine quantitative mRNA-Analyse von cGKI und diversen cGKI-Substratproteinen konnte 12-16 h nach einer LPS-Applikation keine eindeutige Regulation zeigen, da Substratproteine in diversen Geweben jeweils unterschiedlich stark exprimiert wurden. Dies ist möglicherweise ebenfalls wieder ein Indiz für organabhängige, bevorzugte Regulationsmechanismen der cGKI-Signalkaskade.

Es bedarf aber zukünftig noch weiterer Aufklärung, durch welche Mechanismen ein Blutdruckabfall unter septischen Bedingungen hervorgerufen wird. Weiterhin sollte auch ein Augenmerk auf Entzündungsmechanismen gelegt werden, die zum einen direkt über den NO/cGMP/cGKI Weg (Werner et al., 2005) oder auch indirekt über NO, aber cGMP unabhängig vermittelt werden können (Korhonen et al., 2005).

D.3. Fungiert cCMP als „second messenger“?

Die purinergen zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP haben eine essentielle Funktion als intrazelluläre „second messenger“ in zahlreichen Geweben und Organen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (Beavo et al., 2002). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde auch eine Synthese von Cytidin 3',5'-monophosphat (cCMP) in diversen Geweben wie Glattmuskelzellen, Herz und Gehirn beschrieben (Cech and Ignarro, 1977 und Newton et al., 1990). Weiterhin konnten kürzlich Cytidylylzyklase-Aktivitäten von Bakterientoxinen (Pertussistoxin, „edema factor“ aus *Bacillus anthracis*) und Adenylylzyklasen gezeigt werden (Spangler et al. 2010). Dem Molekül cCMP wurde

schon in früheren Jahren verschiedene Funktionen zugeordnet, wie zum Beispiel Zellwachstum oder Aktivierung von Neutrophilen (Bloch et al., 1974 und Ervens et al., 1991).

Auch in relativ jungen Arbeiten wurde für cCMP eine Signalrolle postuliert. So wurde in verschiedenen Teilen der Schleimhaut von Wistar-Rattenmägen (Antrum und Fundus) nachweislich cCMP detektiert. Die cCMP-Konzentrationen konnten dabei durch Vorbehandlung der Tiere mit Ranitidin (H_2 -Rezeptor-Antagonist), Prostacyclin und Prostaglandin E_2 moduliert werden (Balint et al., 2001). Dies zeigt, dass cCMP möglicherweise eine Signalfunktion hat, die durch Applikation von verschiedenen Substanzen beeinflusst werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Detail auf diese potentielle „second messenger“-Funktion von cCMP eingegangen. Zur Aufklärung möglicher Zielstrukturen von cCMP wurden gereinigte cA- und cG-Kinasen verwendet. Um reine cGKI zu gewinnen, wurden entsprechende cDNAs für cGKI α und cGKI β kloniert (Wernet et al., 1989), daraus Baculoviren generiert und die Kinasen in Sf9-Zellen exprimiert. Die ursprünglich angedachte IMAC-Methode zur Aufreinigung über einen C-terminalen Hexahistidintag (His) $_6$ erwies sich als nicht geeignet. Mit dieser Methode konnten zwar Enzyme im Milligramm-Bereich aufgereinigt werden, jedoch zeigten diese gereinigten Proteine nahezu keine Aktivität. Der C-terminale (His) $_6$ beeinflusste die Aktivität der Enzyme jedoch nicht, da vor der Aufreinigung über die IMAC-Methode sowohl cGKI α -(His) $_6$ als auch cGKI β -(His) $_6$ im Zellextrakt enzymatisch aktiv waren. Demnach musste der Aktivitätsverlust bei der Aufreinigung eingetreten sein. Ein Grund dafür ist, dass abhängig von verschiedenen Metallen die Aktivität von cG-Kinasen beeinflusst werden kann (Landgraf et al., 1991). Das negative Redoxpotential von Ni^{2+} in der Säulenmatrix verringert dabei die katalytische Aktivität. Dies erklärt möglicherweise, warum über IMAC gereinigte cGKI nach der Elution nicht mehr aktiv war.

Eine Affinitätsreinigung mit 8-AEA-cAMP-Agarose führte zur Anreicherung von hochreinen Wildtyp-Isoenzymen (ohne (His) $_6$), die auch nach der Reinigung noch dieselbe Aktivität hatten, wie die Kontrollenzyme. Auch cGKI α -(His) $_6$ und cGKI β -(His) $_6$, die mit 8-AEA-cAMP-Agarose aufgereinigt wurden, zeigten nach der Reinigungsprozedur dieselbe Aktivität, wie Kontrollenzyme. Dies zeigte, dass nicht der Hexahistidintag die Aktivität von cGKI beeinflusste, sondern das IMAC-Säulenmaterial, was zusätzlich auch anhand der Aktivität der cGKI α - und cGKI β -haltigen Sf9-Zellextrakte vor der Aufreinigung bestätigt werden konnte.

Neben der Charakterisierung von cCMP in *in vitro*-Phosphotransferase-Versuchen an gereinigten cNMP-abhängigen Proteinkinasen wurde in dieser Arbeit die Funktion von

cCMP als potentieller „second messenger“ im vaskulären glatten Muskel von muriner Aorta untersucht.

Mittels Myographie konnte eine ausgeprägte Relaxation von Phenylephrin-vorkontrahiertem Wildtyp-Aortengewebe durch Zugabe von dibutyryliertem cCMP (db-cCMP, Membran-permeables Prodrug von cCMP) erreicht werden. Verwendete man analog dem Wildtyp-Gewebe aber cGKI^{-/-}, IRAG^{-/-} oder SML α -rescue Aorten, so war diese Relaxation nahezu aufgehoben.

Allgemein ist bekannt, dass dibutyrylierte Analoga von cNMPs keine Potenz haben, ihre Substrate (cG- oder cA-Kinasen) zu stimulieren (Kaukel et al., 1972). Intrazellulär wird Esterasen-vermittelt Butyrat abgespalten, wodurch aktives cCMP entsteht. In der Literatur sind ebenso Effekte von Butyrat (das bei der Aktivierung der dibutyrylierten Vorstufen von cCMP entsteht) beschrieben, die einen Einfluss auf das „second messenger“-System haben können (Aaronson et al., 1996). Jedoch konnte ein Effekt von Butyrat (in Form von Natriumbutyrat und Tributyrin) ausgeschlossen werden, da erst in höheren millimolaren Konzentrationen gegenteilige Effekte (Tonusanstieg) auf das präparierte Gefäßsystem registriert werden konnten. db-cCMP hatte im Phosphotransferaseversuch (der keine Esterasen enthielt) keinen stimulierenden Effekt auf cG-Kinasen, was auf eine Metabolisierung durch Esterasen und damit auf eine Freisetzung von cCMP aus db-cCMP in vaskulärem Gewebe schließen lässt und somit den „Prodrug“-Charakter für db-cCMP bestätigte.

Für db-cCMP wurde im Vergleich zu 8-Br-cGMP in der Myographie ein relativ hoher (dreistelliger) K_a -Wert ermittelt. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei db-cCMP um eine inaktive Vorstufe von cCMP handelt, ist der K_a für cCMP (welches Esterasen-vermittelt entsteht) in der Myographie wahrscheinlich deutlich niedriger als der errechnete K_a für db-cCMP. Für 8-Br-cGMP ließ sich der K_a in der Myographie direkt ermitteln, da 8-Br-cGMP cG-Kinasen direkt aktiviert. Außerdem beträgt der K_a (8-Br-cGMP) für cGKI α 0.01 μ M (Pöhler et al. 1995), d.h. cGKI α wird durch 8-Br-cGMP um den Faktor 10 stärker aktiviert als durch (endogenes) cGMP (K_a cGKI α (cGMP): 0.1 μ M). Dies verdeutlicht, dass cCMP also ein stärkerer Aktivator von cG-Kinasen zu sein scheint, als der K_a aus der Myographie vermuten lässt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass cCMP cGMP-abbauende PDEs nicht hemmt, was eine indirekte Aktivierung von cGKI durch cCMP-vermittelte Erhöhung von [cGMP]_i ausschließt. Eine mögliche Sensibilisierung (Verkleinerung der EC₅₀) von cGKI durch niedrige cCMP-Konzentrationen konnte ebenfalls myographisch ausgeschlossen werden. Eine vermutete direkte Stimulation der cGKI durch cCMP konnte durch *in vitro* Phosphotransferaseversuche bewiesen werden. Ebenso konnte eine mögliche Sensibilisierung von cGKI durch cCMP in Gewebe widerlegt werden. Um zusätzlich zu

überprüfen, ob endogene cG-Kinasen durch cCMP aktiviert werden, wurde die Phosphotransferase-Aktivität in Aortenlysat von Wildtyp und cGKI^{-/-}-Tieren getestet. Durch Zugabe von 300 µM cCMP (entsprechend den Konzentrationen in der Myographie) ließ sich endogene cGKI um den Faktor acht stimulieren. Bei cGKI^{-/-}-Aortenlysat konnte durch cCMP nicht stimuliert werden. Dies beweist, dass cCMP endogene cG-Kinasen aktivieren kann.

Möglicherweise könnte der Effekt von cCMP in den Aorten auch durch eine Aktivierung des cAK-Systems erfolgen. Jedoch konnte cGKI^{-/-}-Gewebe in der Myographie mit cCMP nicht relaxiert werden. Eine nachfolgende Applikation von db-cAMP leitete aber einen starken Tonusabfall ein, was durch eine intakte cAMP-Signalkaskade vermittelt wurde. Auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass cAMP im cGKI-defizienten Gewebe weiterhin eine Relaxation verursachen kann (Sausbier et al., 2000). Eine effektive Aktivierung von cAK durch cCMP im glatten Muskel kann unter den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen somit ausgeschlossen werden.

cCMP agiert aber neben vaskulären Geweben auch in anderen Zellen über cG-Kinasen. Murine Thrombozyten exprimieren ebenfalls cGKI und IRAG. Die Thrombin-induzierte Aggregation von Wildtyp-Thrombozyten konnte durch Vorinkubation mit 200 µM db-cCMP verhindert werden. Dieser Effekt war bei cGKI^{-/-} und IRAG^{-/-} Blutplättchen nahezu aufgehoben (persönliche Mitteilung von Elisabeth Schinner).

Die physiologische Relevanz der cGMP/cGKIβ/IRAG-vermittelten Thrombozytenaggregationshemmung konnte vor wenigen Jahren gezeigt werden (Antl et al., 2007). Kürzlich wurde eine cCMP-stimulierte Phosphorylierung diverser Proteine im Gesamthirn von Mäusen beschrieben (Ding et al., 2008). Jedoch wurde dabei die entsprechende Kinase nicht charakterisiert. Da cGKI auch in vielen Regionen des Gehirns exprimiert wird (Hofmann et al., 2009), könnte es sich ggf. auch um eine cGKI-vermittelte Phosphorylierung handeln.

cGMP-abhängige Proteinkinasen haben in der regulatorischen Domäne eine cGMP-Tandembindungsstelle (cGMP-A und cGMP-B), die unterschiedliche Affinitäten für cGMP haben (Francis et al., 1999). Um die cCMP-spezifische Aktivierung von cGKI aufzuklären, sollten in Zukunft Bindungsexperimente mit cCMP erfolgen. Dies könnte zusätzlich klären, ob cG-Kinasen bei gleichzeitiger Anwesenheit von cGMP und cCMP durch homologe oder heterologe Bindung der zyklischen Nukleotide (d.h. durch ein „Gemisch“ von cCMP und cGMP) aktiviert werden. Da das Holoenzym der cGK-Kinasen aus einem Dimer mit vier zyklischen Nukleotid-Bindungsstellen besteht (Alverdi et al., 2008), könnte so die Bindungsstöchiometrie von cGMP und cCMP aufgeklärt werden.

Weiterhin konnte im Feld der cCMP-Forschung bisher keine Zielstruktur für cCMP nachgewiesen werden, jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine durch cCMP

aktivierbare Kinase beschrieben. cGKI konnte durch cCMP mit annähernd gleichen Konzentrationen aktiviert werden wie mit cAMP (Pöhler et al., 1995), jedoch zeigte cCMP eine ausgesprochene Spezifität für cGKI (im Vergleich zu cAK), was durch cGKI-defiziente Aorten bewiesen werden konnte. Auch in den Phosphotransferaseexperimenten konnte dies bestätigt werden. Die EC_{50} -Werte (cGMP) für cGKI α und cGKI β unterscheiden sich um den Faktor 10 (cGKI α : 0.1 μ M; cGKI β : 1.0 μ M) (Pöhler et al., 1995). Für cCMP konnten jedoch annähernd gleiche EC_{50} -Werte für cGKI α und cGKI β ermittelt werden (etwa 60 μ M), die EC_{50} (cCMP) für cAK war > 100 μ M.

Neben der Kreuzaktivierung von cNMP-abhängigen Proteinkinasen durch cCMP konnte kürzlich aber auch eine cCMP-spezifische Phosphorylierung von Rab23 (ein Protein aus der Ras GTPase-Familie) in Maushirn-Lysaten ermittelt werden. In entsprechenden Kontrollversuchen erfolgte keine Phosphorylierung von Rab23 nach cAMP und cGMP-Inkubation (Bond et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass es möglicherweise cCMP-abhängige Proteinkinasen gibt. Bisher fehlt jedoch eine detaillierte Analyse des cCMP-generierenden Systems. Analog von Adenylylzyklasen (ACs) oder Guanylylzyklasen (GCs) gibt es bisher keine Evidenz für separate Cytidylylzyklasen. ACs von Säugern sowie Pertussistoxin und „edema factor“ können aber mit relativ geringer Kinetik cCMP generieren. Ob cCMP möglicherweise in pathophysiologischen Prozessen eine übergeordnete Rolle spielt, muss nachfolgend noch geklärt werden.

Eine cCMP-spezifische Phosphodiesterase konnte bisher nicht identifiziert werden, was somit eine Akkumulation von cCMP in Zellen ermöglicht (Reinecke et. al, 2010). Somit könnte ab einem bestimmten Schwellenwert die cGKI-Signalkaskade durch cCMP aktiviert werden. Rein spekulativ könnte cCMP aber auch auf andere Weise gewebsspezifisch agieren, zum Beispiel durch Stimulation von bisher unbekannter cCMP-abhängiger Proteinkinase oder andere cCMP-bindende Proteine.

Abb. D.2. zeigt einen möglichen cGKI-abhängigen Signalweg für cCMP im vaskulären glatten Muskel.

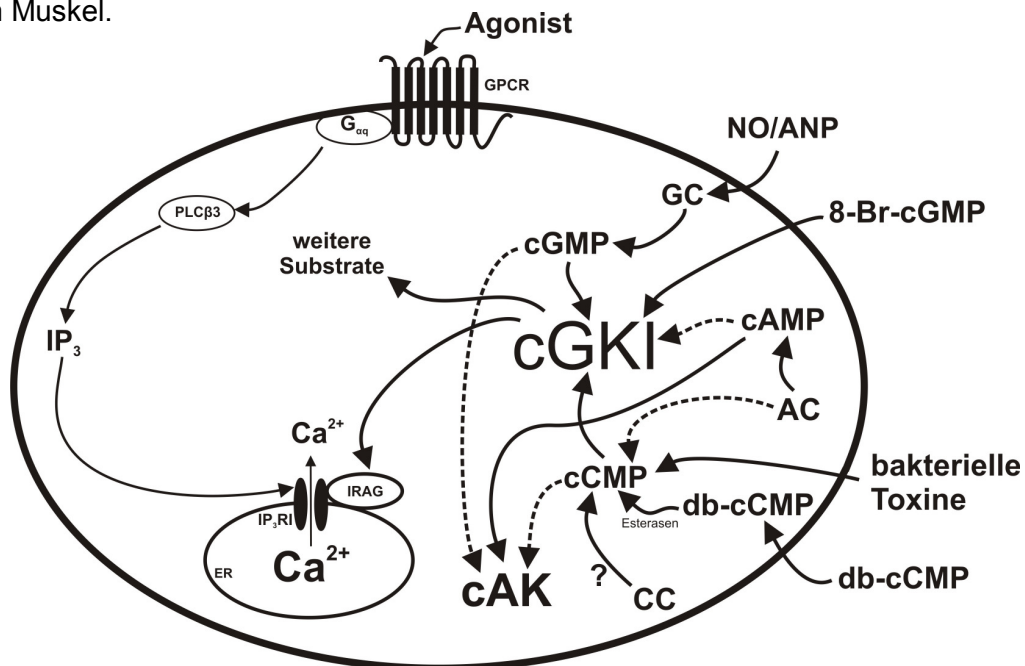


Abb. D.2. Potentieller Signalmechanismus von cCMP im glatten Muskel. Schematische Darstellung einer glatten Muskelzelle mit potentiellen Angriffspunkten für cCMP. Um die Übersichtlichkeit zu bewahren, ist nur der trimere Komplex aus IRAG, IP $_3$ RI und cGKI β für einen weiterführenden Signalmechanismus dargestellt.

Abkürzungen: AC: Adenylylzyklase; CC: Cytidylylzyklase; GC: Guanylylzyklase; ER: endoplasmatisches Retikulum; PLC β_3 : Phospholipase C β_3 ; GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals für cCMP eine potentielle „second messenger“-Funktion mit cGKI als Effektorsystem gezeigt werden. Inwieweit dies aber (patho)physiologisch eine Rolle spielt, muss in zukünftigen Experimenten noch geklärt werden. Der Fokus sollte dabei insbesondere auf cCMP-generierende Proteine (Cytidylylzyklasen) und cCMP-bindende Proteine gelegt werden.

E. Zusammenfassung

Der NO/cGMP- und ANP/cGMP- cGKI Signalweg spielt für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse, wie zum Beispiel Relaxation und Proliferation von glatter Muskulatur, Neurotransmission oder Thrombozytenfunktion eine bedeutende Rolle.

cGKI moduliert im glatten Muskel überwiegend die $[Ca^{2+}]_i$ bzw. die Sensibilität des kontraktile Apparats auf gleichbleibende $[Ca^{2+}]_i$, wodurch die Kontraktilität beeinflusst wird. Das **IP₃-Rezeptor assoziierte cGKI Substrat IRAG** bildet am endoplasmatischen Retikulum einen stabilen trimeren Komplex mit dem IP₃RI und dem cGKI β -Isoenzym. In vorhergehenden Arbeiten wurde an IRAG-Mausmutanten, bei denen die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃RI zerstört wurde („coiled coil“-Domäne von IRAG, mutiert durch Deletion von Exon 12), ein Defekt in der Calciumregulation und in der kardiovaskulären und gastrointestinalen Glattmuskelrelaxation gefunden.

Um detaillierte physiologische Funktionen von IRAG im NO/cGMP und ANP/cGMP-Signalweg zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit eine IRAG-total-KO Mauslinie analysiert. Gastrointestinales (Colon und Jejunum) sowie kardiovaskuläres Gewebe (Aorta) zeigten einen starken Defekt in der cGMP-vermittelten Relaxation von Hormonanaloga-induziertem Tonus. Diese verminderte Relaxation war myographisch mit allen Stimulatoren der cGKI-Signalkaskade zu beobachten, entweder durch direkte Stimulation von cGKI mit einem cGMP-Analogen, durch endogene Stimulation der NO-Synthese (Acetylcholin bei intaktem Endothel), durch exogene NO-Applikation (DEA-NO) oder durch Aktivierung der pGC mittels ANP. IRAG spielt also bei der Hormon-induzierten Tonusregulation über das cGKI-Signalsystem eine entscheidende Rolle.

Eine radiotelemetrische Blutdruckanalyse von IRAG-defizienten Tieren ergab während der Wach- und Schlafphase im mittleren arteriellen Druck (MAP), in der Herzfrequenz, im Pulsdruck und in der Aktivität der Tiere keinen signifikanten Unterschied verglichen mit Wildtyp-Geschwistern. Ebenso fiel der MAP bei intraperitonealer Applikation von NO-Donoren (DETA-NO, SNP) und sGC-Aktivatoren (YC-1) bei Wildtyp- und IRAG^{-/-}-Tieren gleichermaßen ab. IRAG scheint also in der Aufrechterhaltung des basalen Blutdrucks und in der kurzfristigen Blutdruckregulation im Gesamtorganismus keine signifikante Rolle zu spielen, da eine Vielzahl von Einflussfaktoren und Kompensationsmechanismen für die Blutdruckregulation verantwortlich sein können. Unter den pathophysiologischen Bedingungen einer *E.coli* LPS-induzierten Sepsis (bei der NO durch iNOS-Induktion in hohen Konzentrationen synthetisiert wird), war jedoch der Blutdruckabfall bei IRAG-KO-Tieren signifikant weniger stark ausgeprägt als bei Wildtyp-Geschwistern. Demnach hat

IRAG unter den Bedingungen einer Sepsis mit massiver NO-Generierung regulatorische Eigenschaften auf den Blutdruck.

cAMP und cGMP sind seit Jahrzehnten gut etablierte und erforschte „second messenger“ und essentiell für zahlreiche (patho)physiologische Prozesse auf zellulärer Ebene. Die Existenz eines dritten zyklischen Nukleotids, cCMP, wurde bereits in den 70er und 80er Jahren beschrieben, jedoch nie ausgiebig erforscht. Kürzlich konnten bakterielle Toxine und Adenylylzyklasen von Säugern als schwach aktive Cytidylylzyklasen identifiziert werden. Demnach könnte cCMP eine potentielle „second messenger“-Funktion einnehmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Anwendung verschiedener Mausmutanten die cGKI-Signalkaskade als potentieller Effektor von cCMP im vaskulären glatten Muskel ermittelt werden. Die physiologische Rolle von cCMP bleibt zwar weiterhin ungeklärt, insbesondere da bisher keine spezifischen Cytidylylzyklasen gefunden wurden. Jedoch wurde nun erstmals ein Effektorsystem für cCMP identifiziert. In zukünftigen Studien sollte ein besonderer Fokus auf potentielle Cytidylylzyklasen und cCMP-bindende Proteine gelegt werden. Da bisher vor allem bakteriellen Toxinen cCMP-generierende Eigenschaften zugeschrieben wurden, könnte ein cCMP-Signalmechanismus speziell unter pathophysiologischen Bedingungen verstärkt eine Rolle spielen.

F. Literaturverzeichnis

F.1. Zitierte wissenschaftliche Veröffentlichungen

Aaronson, P. I., W. McKinnon and L. Poston (1996), Mechanism of butyrate-induced vasorelaxation of rat mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol*, 117(2), 365-371.

Alioua, A., Y. Tanaka, M. Wallner, F. Hofmann, P. Ruth, P. Meera and L. Toro (1998), The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, 273(49), 32950-32956.

Alverdi, V., H. Mazon, C. Versluis, W. Hemrika, G. Esposito, R. van den Heuvel, A. Scholten and A. J. Heck (2008), cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain. *J Mol Biol*, 375(5), 1380-1393.

Ammendola, A., A. Geiselhöringer, F. Hofmann and J. Schlossmann (2001), Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*, 276(26), 24153-24159.

Antl, M., M. L. von Bruhl, C. Eiglsperger, M. Werner, I. Konrad, T. Kocher, M. Wilm, F. Hofmann, S. Massberg and J. Schlossmann (2007), IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*, 109(2), 552-559.

Archer, S. L. and E. D. Michelakis (2009), Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 361(19), 1864-1871.

Bachmann, B. J. and K. B. Low (1980), Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 6. *Microbiol Rev*, 44(1), 1-56.

Balint, G. A., M. Galfi, A. Rimanoczy, G. Falkay and A. Juhaaz (2001), On a possible new intracellular signal-system in rat gastric mucosa. *J Physiol Paris*, 95(1-6), 243-245.

Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002), Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9), 710-718.

Belik, J. (2009), Riociguat, an oral soluble guanylate cyclase stimulator for the treatment of pulmonary hypertension. *Curr Opin Investig Drugs*, 10(9), 971-979.

Bender, A. T. and J. A. Beavo (2006), Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58(3), 488-520.

Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998), Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395(6703), 645-648.

Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003), Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-529.

Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000), The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 11-21.

- Biel, M. and S. Michalakakis (2009), Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 111-136.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), 1513-1523.
- Bloch, A., G. Dutschman and R. Maue (1974), Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP). II. Initiation of leukemia L-1210 cell growth in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 59(3), 955-959.
- Bond, A. E., E. Dudley, R. Tuytten, F. Lemiere, C. J. Smith, E. L. Esmans and R. P. Newton (2007), Mass spectrometric identification of Rab23 phosphorylation as a response to challenge by cytidine 3',5'-cyclic monophosphate in mouse brain. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21(16), 2685-2692.
- Bonnevier, J. and A. Arner (2004), Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2+) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem*, 279(28), 28998-29003.
- Bootman, M. D., M. J. Berridge and H. L. Roderick (2002), Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7320-7322.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Burgoyne, J. R., M. Madhani, F. Cuello, R. L. Charles, J. P. Brennan, E. Schroder, D. D. Browning and P. Eaton (2007), Cysteine redox sensor in PKG α enables oxidant-induced activation. *Science*, 317(5843), 1393-1397.
- Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J. Hoppe and U. Walter (1994), cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem*, 269(20), 14509-14517.
- Calo, L. A., E. Pagnin, G. Ceolotto, P. A. Davis, S. Schiavo, I. Papparella, A. Semplicini and A. C. Pessina (2008), Silencing regulator of G protein signaling-2 (RGS-2) increases angiotensin II signaling: insights into hypertension from findings in Bartter's/Gitelman's syndromes. *J Hypertens*, 26(5), 938-945.
- Casteel, D. E., G. R. Boss and R. B. Pilz (2005), Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I β and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif. *J Biol Chem*, 280(46), 38211-38218.
- Casteel, D. E., T. Zhang, S. Zhuang and R. B. Pilz (2008), cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity. *Cell Signal*, 20(7), 1392-1399.
- Cech, S. Y. and L. J. Ignarro (1977), Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP) formation in mammalian tissues. *Science*, 198(4321), 1063-1065.

- Cha, B., J. H. Kim, H. Hut, B. M. Hogema, J. Nadarja, M. Zizak, M. Cavet, W. Lee-Kwon, S. M. Lohmann, A. Smolenski, C. M. Tse, C. Yun, H. R. de Jonge and M. Donowitz (2005), cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. *J Biol Chem*, 280(17), 16642-16650.
- Chambers, D. A., D. W. Martin, Jr. and Y. Weinstein (1974), The effect of cyclic nucleotides on purine biosynthesis and the induction of PRPP synthetase during lymphocyte activation. *Cell*, 3(4), 375-380.
- Chan, P. J., D. R. Tredway, I. Henig and S. G. Prough (1990), Cyclic CMP (cytidine 3',5'-monophosphate) suppresses changes in human sperm amplitude of lateral head displacement and hyperactivation. *Experientia*, 46(7), 734-736.
- Chang, D. F., N. S. Belaguli, J. Chang and R. J. Schwartz (2007), LIM-only protein, CRP2, switched on smooth muscle gene activity in adult cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1), 157-162.
- Chauhan, S. D., G. Seggara, P. A. Vo, R. J. Macallister, A. J. Hobbs and A. Ahluwalia (2003), Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J*, 17(6), 773-775.
- Cobb, J. P. (2001), Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)*, 2(2), 93-100; discussion 100-101.
- Cowley, A. W., Jr. (1992), Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev*, 72(1), 231-300.
- de Vente, J., E. Asan, S. Gambaryan, M. Markerink-van Ittersum, H. Axer, K. Gallatz, S. M. Lohmann and M. Palkovits (2001), Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*, 108(1), 27-49.
- Dedkova, E. N. and L. A. Blatter (2002), Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*, 539(Pt 1), 77-91.
- Dejam, A., C. J. Hunter, A. N. Schechter and M. T. Gladwin (2004), Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*, 32(3), 423-429.
- Deng, J. T., J. E. Van Lierop, C. Sutherland and M. P. Walsh (2001), Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem*, 276(19), 16365-16373.
- Desch, M., K. Sigl, B. Hieke, K. Salb, F. Kees, D. Bernhard, A. Jochim, B. Spiessberger, K. Hoehnerl, R. Feil, S. Feil, R. Lukowski, J. W. Wegener, F. Hofmann and J. Schlossmann (2010), IRAG determines NO- and ANP-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res*.
- Ding, S., A. E. Bond, F. Lemiery, R. Tuytten, E. L. Esmans, A. G. Brenton, E. Dudley and R. P. Newton (2008), Online immobilized metal affinity chromatography/mass spectrometric analysis of changes elicited by cCMP in the murine brain phosphoproteome. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22(24), 4129-4138.
- Eardley, I., C. Donatucci, J. Corbin, A. El-Meliegy, K. Hatzimouratidis, K. McVary, R. Munarriz and S. W. Lee (2010), Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *J Sex Med*, 7(1 Pt 2), 524-540.

- Ellerbroek, S. M., K. Wennerberg and K. Burridge (2003), Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem*, 278(21), 19023-19031.
- Engel, C., F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler and K. Reinhart (2007), Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33(4), 606-618.
- Ervens, J. and R. Seifert (1991), Differential modulation by N4, 2'-O-dibutyryl cytidine 3':5'-cyclic monophosphate of neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 174(1), 258-267.
- Eto, M., T. Ohmori, M. Suzuki, K. Furuya and F. Morita (1995), A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem*, 118(6), 1104-1107.
- Feil, R., M. Bigl, P. Ruth and F. Hofmann (1993), Expression of cGMP-dependent protein kinase in Escherichia coli. *Mol Cell Biochem*, 127-128, 71-80.
- Feil, R., S. M. Lohmann, H. de Jonge, U. Walter and F. Hofmann (2003), Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, 93(10), 907-916.
- Feil, R., S. Muller and F. Hofmann (1993), High-level expression of functional cGMP-dependent protein kinase using the baculovirus system. *FEBS Lett*, 336(1), 163-167.
- Fernandes, D., R. Sordi, L. K. Pacheco, G. M. Nardi, B. T. Heckert, C. G. Villela, A. R. Lobo, C. Barja-Fidalgo and J. Assreuy (2009), Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. *J Pharmacol Exp Ther*, 328(3), 991-999.
- Filtz, T. M. and Y. Niibori (2004), Desensitization of angiotensin-stimulated inositol phosphate accumulation in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 502(1-2), 11-19.
- Francis, S. H. and J. D. Corbin (1999), Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36(4), 275-328.
- Francis, S. H., J. D. Corbin and E. Bischoff (2009), Cyclic GMP-hydrolyzing phosphodiesterases. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 367-408.
- Frei, E., M. Huster, P. Smital, J. Schlossmann, F. Hofmann and J. W. Wegener (2009), Calcium-dependent and Calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Friebe, A., E. Mergia, O. Dangel, A. Lange and D. Koesling (2007), Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18), 7699-7704.
- Fukamizu, A., K. Sugimura, E. Takimoto, F. Sugiyama, M. S. Seo, S. Takahashi, T. Hatae, N. Kajiwar, K. Yagami and K. Murakami (1993), Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem*, 268(16), 11617-11621.

- Fukao, M., H. S. Mason, F. C. Britton, J. L. Kenyon, B. Horowitz and K. D. Keef (1999), Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, 274(16), 10927-10935.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980), The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.
- Gaion, R. M. and G. Krishna (1979), Cytidylate cyclase: possible artifacts in the methodology. *Science*, 203(4381), 672-673.
- Gaion, R. M. and G. Krishna (1979), Cytidylate cyclase: the product isolated by the method of Cech and Ignarro is not cytidine 3',5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 86(1), 105-111.
- Gambaryan, S., C. Hausler, T. Markert, D. Pohler, T. Jarchau, U. Walter, W. Haase, A. Kurtz and S. M. Lohmann (1996), Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest*, 98(3), 662-670.
- Gamm, D. M., S. H. Francis, T. P. Angelotti, J. D. Corbin and M. D. Uhler (1995), The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms. *J Biol Chem*, 270(45), 27380-27388.
- Garthwaite, J. (2010), New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem*, 334(1-2), 221-232.
- Geiselhöringer, A., M. Gaisa, F. Hofmann and J. Schlossmann (2004), Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*, 575(1-3), 19-22.
- Geiselhöringer, A., M. Werner, K. Sigl, P. Smital, R. Worner, L. Acheo, J. Stieber, P. Weinmeister, R. Feil, S. Feil, J. Wegener, F. Hofmann and J. Schlossmann (2004), IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J*, 23(21), 4222-4231.
- Ghosh, D. K. and J. C. Salerno (2003), Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci*, 8, d193-209.
- Given, A. M., O. Ogut and F. V. Brozovich (2007), MYPT1 mutants demonstrate the importance of aa 888-928 for the interaction with PKG1alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1), C432-439.
- Glass, D. B., H. C. Cheng, L. Mende-Mueller, J. Reed and D. A. Walsh (1989), Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-stable inhibitor protein. *J Biol Chem*, 264(15), 8802-8810.
- Gohla, A., G. Schultz and S. Offermanns (2000), Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res*, 87(3), 221-227.
- Groneberg, D., P. König, A. Wirth, S. Offermanns, D. Koesling and A. Friebe (2010), Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation*, 121(3), 401-409.

- Hamaguchi, T., M. Ito, J. Feng, T. Seko, M. Koyama, H. Machida, K. Takase, M. Amano, K. Kaibuchi, D. J. Hartshorne and T. Nakano (2000), Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochem Biophys Res Commun*, 274(3), 825-830.
- Hanafy, K. A., J. S. Krumenacker and F. Murad (2001), NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 7(4), 801-819.
- Hanahan, D. (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.
- Hauber, H. P. and P. Zabel (2009), [Pathophysiology and pathogens of sepsis]. *Internist (Berl)*, 50(7), 779-780, 782-774, 786-777.
- Hauser, B., H. Bracht, M. Matejovic, P. Radermacher and B. Venkatesh (2005), Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*, 101(2), 488-498.
- Hauser, W., K. P. Knobloch, M. Eigenthaler, S. Gambaryan, V. Krenn, J. Geiger, M. Glazova, E. Rohde, I. Horak, U. Walter and M. Zimmer (1999), Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 8120-8125.
- Heidelbaugh, J. J. (2010), Management of erectile dysfunction. *Am Fam Physician*, 81(3), 305-312.
- Helfman, D. M., N. Katoh and J. F. Kuo (1984), Purification and properties of cyclic CMP phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*, 16, 403-416.
- Helfman, D. M. and J. F. Kuo (1982), A homogeneous cyclic CMP phosphodiesterase hydrolyzes both pyrimidine and purine cyclic 2':3'- and 3':5'-nucleotides. *J Biol Chem*, 257(2), 1044-1047.
- Helfman, D. M., M. Shoji and J. F. Kuo (1981), Purification to homogeneity and general properties of a novel phosphodiesterase hydrolyzing cyclic CMP and cyclic AMP. *J Biol Chem*, 256(12), 6327-6334.
- Hellermann, G. R. and L. P. Solomonson (1997), Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 272(18), 12030-12034.
- Hepler, J. R. (1999), Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*, 20(9), 376-382.
- Hercule, H. C., J. Tank, R. Plehm, M. Wellner, A. C. da Costa Goncalves, M. Gollasch, A. Diedrich, J. Jordan, F. C. Luft and V. Gross (2007), Regulator of G protein signalling 2 ameliorates angiotensin II-induced hypertension in mice. *Exp Physiol*, 92(6), 1014-1022.
- Heximer, S. P., R. H. Knutsen, X. Sun, K. M. Kaltenbronn, M. H. Rhee, N. Peng, A. Oliveira-dos-Santos, J. M. Penninger, A. J. Muslin, T. H. Steinberg, J. M. Wyss, R. P. Mecham and K. J. Blumer (2003), Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest*, 111(8), 1259.
- Heximer, S. P., S. P. Srinivasa, L. S. Bernstein, J. L. Bernard, M. E. Linder, J. R. Hepler and K. J. Blumer (1999), G protein selectivity is a determinant of RGS2 function. *J Biol Chem*, 274(48), 34253-34259.

- Hickey, M. J., K. A. Sharkey, E. G. Sihota, P. H. Reinhardt, J. D. Macmicking, C. Nathan and P. Kubes (1997), Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J*, 11(12), 955-964.
- Hisatsune, C., K. Nakamura, Y. Kuroda, T. Nakamura and K. Mikoshiba (2005), Amplification of Ca^{2+} signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem*, 280(12), 11723-11730.
- Hofmann, F. (2005), The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 280(1), 1-4.
- Hofmann, F., A. Ammendola and J. Schlossmann (2000), Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10), 1671-1676.
- Hofmann, F., D. Bernhard, R. Lukowski and P. Weinmeister (2009), cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol*, (191), 137-162.
- Hofmann, F., R. Feil, T. Kleppisch and J. Schlossmann (2006), Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, 86(1), 1-23.
- Hollenberg, S. M., J. J. Tangora, M. J. Piotrowski, C. Easington and J. E. Parrillo (1997), Impaired microvascular vasoconstrictive responses to vasopressin in septic rats. *Crit Care Med*, 25(5), 869-873.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri (1987), Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24), 9265-9269.
- Jaiswal, N., G. Lambrecht, E. Mutschler, R. Tacke and K. U. Malik (1991), Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 258(3), 842-850.
- Kaukel, E. and H. Hilz (1972), Permeation of dibutyryl cAMP into HeLa cells and its conversion to monobutyryl cAMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 46(2), 1011-1018.
- Kilbourn, R. G., S. S. Gross, A. Jubran, J. Adams, O. W. Griffith, R. Levi and R. F. Lodato (1990), NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(9), 3629-3632.
- Kirkeboen, K. A. and O. A. Strand (1999), The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*, 43(3), 275-288.
- Kitazawa, T., M. Eto, T. P. Woodsome and D. L. Brautigan (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(14), 9897-9900.
- Kitazawa, T., M. Eto, T. P. Woodsome and M. Khalequzzaman (2003), Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca^{2+} sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, 546(Pt 3), 879-889.
- Kitazawa, T., A. N. Polzin and M. Eto (2004), CPI-17-deficient smooth muscle of chicken. *J Physiol*, 557(Pt 2), 515-528.
- Klein, C. (2002), Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell Signal*, 14(6), 493-498.

- Kleinert, H., P. M. Schwarz and U. Forstermann (2003), Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem*, 384(10-11), 1343-1364.
- Koitabashi, N., T. Aiba, G. G. Hesketh, J. Rowell, M. Zhang, E. Takimoto, G. F. Tomaselli and D. A. Kass (2009), Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *J Mol Cell Cardiol*.
- Koller, A., J. Schlossmann, K. Ashman, S. Uttenweiler-Joseph, P. Ruth and F. Hofmann (2003), Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(1), 155-160.
- Korhonen, R., A. Lahti, H. Kankaanranta and E. Moilanen (2005), Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(4), 471-479.
- Kosmicki, M. A. (2009), Long-term use of short- and long-acting nitrates in stable angina pectoris. *Curr Clin Pharmacol*, 4(2), 132-141.
- Kots, A. Y., E. Martin, I. G. Sharina and F. Murad (2009), A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 1-14.
- Kouvelas, D., A. Goulas, G. Papazisis, C. Sardeli and C. Pourzitaki (2009), PDE5 inhibitors: in vitro and in vivo pharmacological profile. *Curr Pharm Des*, 15(30), 3464-3475.
- Koyama, M., M. Ito, J. Feng, T. Seko, K. Shiraki, K. Takase, D. J. Hartshorne and T. Nakano (2000), Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*, 475(3), 197-200.
- Krumenacker, J. S., K. A. Hanafy and F. Murad (2004), Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*, 62(6), 505-515.
- Kwan, H. Y., Y. Huang and X. Yao (2004), Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2625-2630.
- Lalli, M. J., S. Shimizu, R. L. Sutliff, E. G. Kranias and R. J. Paul (1999), $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 2), H963-970.
- Landgraf, W., R. Hullin, C. Gobel and F. Hofmann (1986), Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem*, 154(1), 113-117.
- Landgraf, W., S. Regulla, H. E. Meyer and F. Hofmann (1991), Oxidation of cysteines activates cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 266(25), 16305-16311.
- Landry, D. W. and J. A. Oliver (2001), The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*, 345(8), 588-595.
- Lavoie, J. L. and C. D. Sigmund (2003), Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*, 144(6), 2179-2183.

- Lee, M. R., L. Li and T. Kitazawa (1997), Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 272(8), 5063-5068.
- Lloyd-Jones, D. M. and K. D. Bloch (1996), The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*, 47, 365-375.
- Lopez, A., J. A. Lorente, J. Steingrub, J. Bakker, A. McLuckie, S. Willatts, M. Brockway, A. Anzueto, L. Holzapfel, D. Breen, M. S. Silverman, J. Takala, J. Donaldson, C. Arneson, G. Grove, S. Grossman and R. Grover (2004), Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*, 32(1), 21-30.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- MacDonald, J. A., M. Eto, M. A. Borman, D. L. Brautigan and T. A. Haystead (2001), Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett*, 493(2-3), 91-94.
- McDaniel, S. S., O. Platoshyn, J. Wang, Y. Yu, M. Sweeney, S. Krick, L. J. Rubin and J. X. Yuan (2001), Capacitative Ca^{2+} entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280(5), L870-880.
- Megson, I. L. and M. R. Miller (2009), NO and sGC-stimulating NO donors. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 247-276.
- Moosmang, S., V. Schulla, A. Welling, R. Feil, S. Feil, J. W. Wegener, F. Hofmann and N. Klugbauer (2003), Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J*, 22(22), 6027-6034.
- Muto, N., M. Kanoh and I. Yamamoto (1993), Cytidylate cyclase activity is stimulated via activation of a guanine nucleotide-binding protein. *Life Sci*, 52(1), 13-20.
- Nausch, L. W., J. Ledoux, A. D. Bonev, M. T. Nelson and W. R. Dostmann (2008), Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1), 365-370.
- Newton, R. P., S. G. Salih, B. J. Salvage and E. E. Kingston (1984), Extraction, purification and identification of cytidine 3',5'-cyclic monophosphate from rat tissues. *Biochem J*, 221(3), 665-673.
- Newton, R. P., B. J. Salvage and N. A. Hakeem (1990), Cytidylate cyclase: development of assay and determination of kinetic properties of a cytidine 3',5'-cyclic monophosphate-synthesizing enzyme. *Biochem J*, 265(2), 581-586.
- Pandey, R., W. Y. Quan, F. Hong and S. L. Jie (2009), Vaccine for hypertension: modulating the renin-angiotensin system. *Int J Cardiol*, 134(2), 160-168.
- Peterson, G. L. (1977), A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83(2), 346-356.
- Pfeifer, A., A. Aszodi, U. Seidler, P. Ruth, F. Hofmann and R. Fassler (1996), Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, 274(5295), 2082-2086.

- Pfeifer, A., P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G. X. Wang, M. Korth, A. Aszodi, K. E. Andersson, F. Krombach, A. Mayerhofer, P. Ruth, R. Fassler and F. Hofmann (1998), Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*, 17(11), 3045-3051.
- Pfeifer, A., P. Ruth, W. Dostmann, M. Sausbier, P. Klatt and F. Hofmann (1999), Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 135, 105-149.
- Pisarev, M. A. and D. L. de Pisarev (1977), Action of cyclic nucleotides on protein and RNA synthesis in the thyroid. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 84(2), 297-302.
- Pöhler, D., E. Butt, J. Meissner, S. Muller, M. Lohse, U. Walter, S. M. Lohmann and T. Jarchau (1995), Expression, purification, and characterization of the cGMP-dependent protein kinases I beta and II using the baculovirus system. *FEBS Lett*, 374(3), 419-425.
- Potter, L. R., A. R. Yoder, D. R. Flora, L. K. Antos and D. M. Dickey (2009), Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 341-366.
- Reinecke, D., P. Sandner, V. Kaefer, R. Seifert (2010), Analyse der Substratspezifität von Phosphodiesterasen. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, (381).
- Richie-Jannetta, R., J. L. Busch, K. A. Higgins, J. D. Corbin and S. H. Francis (2006), Isolated regulatory domains of cGMP-dependent protein kinase Ialpha and Ibeta retain dimerization and native cGMP-binding properties and undergo isoform-specific conformational changes. *J Biol Chem*, 281(11), 6977-6984.
- Roskoski, R., Jr. (1983), Assays of protein kinase. *Methods Enzymol*, 99, 3-6.
- Russell, J. A. (2006), Management of sepsis. *N Engl J Med*, 355(16), 1699-1713.
- Ruth, P., A. Pfeifer, S. Kamm, P. Klatt, W. R. Dostmann and F. Hofmann (1997), Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha. *J Biol Chem*, 272(16), 10522-10528.
- Rybalkin, S. D., C. Yan, K. E. Bornfeldt and J. A. Beavo (2003), Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*, 93(4), 280-291.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Sausbier, M., C. Arntz, I. Bucurenciu, H. Zhao, X. B. Zhou, U. Sausbier, S. Feil, S. Kamm, K. Essin, C. A. Sailer, U. Abdullah, P. Krippeit-Drews, R. Feil, F. Hofmann, H. G. Knaus, C. Kenyon, M. J. Shipston, J. F. Storm, W. Neuhuber, M. Korth, R. Schubert, M. Gollasch and P. Ruth (2005), Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation*, 112(1), 60-68.
- Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth and F. Hofmann (2000), Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, 87(9), 825-830.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann and P. Ruth (2000), Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, 404(6774), 197-201.

- Schlossmann, J. and M. Desch (2009), cGK substrates. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 163-193.
- Schlossmann, J., R. Feil and F. Hofmann (2003), Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, 35(1), 21-27.
- Schmidt, H. H., P. M. Schmidt and J. P. Stasch (2009), NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 309-339.
- Schouten, M., W. J. Wiersinga, M. Levi and T. van der Poll (2008), Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, 83(3), 536-545.
- Shesely, E. G., N. Maeda, H. S. Kim, K. M. Desai, J. H. Kregel, V. E. Laubach, P. A. Sherman, W. C. Sessa and O. Smithies (1996), Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13176-13181.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1998), From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand*, 164(4), 437-448.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2000), Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 522 Pt 2, 177-185.
- Sonnenburg, W. K. and J. A. Beavo (1994), Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, 26, 87-114.
- Spangler, C., D. Ladant, W.-J. Tang, V. Kaeffer, R. Seifert (2010), Nukleotidyl Zyklase Aktivität der Bakteriellen Endotoxine CyaA und EF und deren Einfluss auf Zelluläre Zyklische Nukleotidspiegel. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (381).
- Spiessberger, B., D. Bernhard, S. Herrmann, S. Feil, C. Werner, P. B. Lippa and F. Hofmann (2009), cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion. *FEBS J*, 276(4), 1007-1013.
- Stasch, J. P. and A. J. Hobbs (2009), NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 277-308.
- Stevenson, A. S., J. D. Matthew, M. Eto, S. Luo, A. P. Somlyo and A. V. Somlyo (2004), Uncoupling of GPCR and RhoA-induced Ca²⁺-sensitization of chicken amnion smooth muscle lacking CPI-17. *FEBS Lett*, 578(1-2), 73-79.
- Sugiura, T., H. Nakanishi and J. D. Roberts, Jr. (2008), Proteolytic processing of cGMP-dependent protein kinase I mediates nuclear cGMP signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 103(1), 53-60.
- Sun, X., K. M. Kaltenbronn, T. H. Steinberg and K. J. Blumer (2005), RGS2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling. *Mol Pharmacol*, 67(3), 631-639.
- Surks, H. K. and M. E. Mendelsohn (2003), Dimerization of cGMP-dependent protein kinase 1 α and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cell Signal*, 15(10), 937-944.
- Surks, H. K., N. Mochizuki, Y. Kasai, S. P. Georgescu, K. M. Tang, M. Ito, T. M. Lincoln and M. E. Mendelsohn (1999), Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase 1 α . *Science*, 286(5444), 1583-1587.

- Taira, N. (2006), [Nifedipine: a novel vasodilator]. *Drugs*, 66 Spec No 1, 1-3.
- Talts, J. F., A. Pfeifer, F. Hofmann, E. B. Hunziker, X. H. Zhou, A. Aszodi and R. Fassler (1998), Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 857, 74-85.
- Tang, K. M., G. R. Wang, P. Lu, R. H. Karas, M. Aronovitz, S. P. Heximer, K. M. Kaltenbronn, K. J. Blumer, D. P. Siderovski, Y. Zhu and M. E. Mendelsohn (2003), Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, 9(12), 1506-1512.
- Tasken, K., B. S. Skälhegg, K. A. Tasken, R. Solberg, H. K. Knutsen, F. O. Levy, M. Sandberg, S. Orstavik, T. Larsen, A. K. Johansen, T. Vang, H. P. Schrader, N. T. Reinton, K. M. Torgersen, V. Hansson and T. Jahnsen (1997), Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 31, 191-204.
- Taylor, S. S., C. Kim, C. Y. Cheng, S. H. Brown, J. Wu and N. Kannan (2008), Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta*, 1784(1), 16-26.
- Thiemermann, C. and J. Vane (1990), Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol*, 182(3), 591-595.
- Tiruppathi, C., R. D. Minshall, B. C. Paria, S. M. Vogel and A. B. Malik (2002), Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 39(4-5), 173-185.
- Ushio-Fukai, M., K. K. Griendling, M. Akers, P. R. Lyons and R. W. Alexander (1998), Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alpha11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*, 273(31), 19772-19777.
- Vaandrager, A. B., A. Smolenski, B. C. Tilly, A. B. Houtsmuller, E. M. Ehlert, A. G. Bot, M. Edixhoven, W. E. Boomaars, S. M. Lohmann and H. R. de Jonge (1998), Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4), 1466-1471.
- Van Hove, C. E., C. Van der Donckt, A. G. Herman, H. Bult and P. Fransen (2009), Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 158(3), 920-930.
- Van Vliet, B. N., L. L. Chafe, V. Antic, S. Schnyder-Candrian and J. P. Montani (2000), Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44(2), 361-373.
- Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins and P. McCawley (1977), The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13(4), 213-217.
- Venema, R. C., H. S. Sayegh, J. D. Kent and D. G. Harrison (1996), Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem*, 271(11), 6435-6440.

- Vincent, J. L., A. Yagushi and O. Pradier (2002), Platelet function in sepsis. *Crit Care Med*, 30(5 Suppl), S313-317.
- Vincent, J. L., H. Zhang, C. Szabo and J. C. Preiser (2000), Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(6), 1781-1785.
- Walford, G. and J. Loscalzo (2003), Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*, 1(10), 2112-2118.
- Walker, L. A., J. A. MacDonald, X. Liu, R. K. Nakamoto, T. A. Haystead, A. V. Somlyo and A. P. Somlyo (2001), Site-specific phosphorylation and point mutations of telokin modulate its Ca^{2+} -desensitizing effect in smooth muscle. *J Biol Chem*, 276(27), 24519-24524.
- Webb, R. C. (2003), Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, 27(1-4), 201-206.
- Weber, S., D. Bernhard, R. Lukowski, P. Weinmeister, R. Worner, J. W. Wegener, N. Valtcheva, S. Feil, J. Schlossmann, F. Hofmann and R. Feil (2007), Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res*, 101(11), 1096-1103.
- Wegener, J. W., V. Schulla, T. S. Lee, A. Koller, S. Feil, R. Feil, T. Kleppisch, N. Klugbauer, S. Moosmang, A. Welling and F. Hofmann (2004), An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J*, 18(10), 1159-1161.
- Werner, C., G. Raivich, M. Cowen, T. Strekalova, I. Sillaber, J. T. Buters, R. Spanagel and F. Hofmann (2004), Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci*, 20(12), 3498-3506.
- Werner, C. G., V. Godfrey, R. R. Arnold, G. L. Featherstone, D. Bender, J. Schlossmann, M. Schiemann, F. Hofmann and K. B. Pryzwansky (2005), Neutrophil dysfunction in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase I-deficient mice. *J Immunol*, 175(3), 1919-1929.
- Wernet, W., V. Flockerzi and F. Hofmann (1989), The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, 251(1-2), 191-196.
- Wimalawansa, S. J. (2008), Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin Pharmacother*, 9(11), 1935-1954.
- Wooldridge, A. A., C. N. Fortner, B. Lontay, T. Akimoto, R. L. Nepl, C. Facemire, M. B. Datto, A. Kwon, E. McCook, P. Li, S. Wang, R. J. Thresher, S. E. Miller, J. C. Perriard, T. P. Gavin, R. C. Hickner, T. M. Coffman, A. V. Somlyo, Z. Yan and T. A. Haystead (2008), Deletion of the protein kinase A/protein kinase G target SMTNL1 promotes an exercise-adapted phenotype in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, 283(17), 11850-11859.
- Wooldridge, A. A., J. A. MacDonald, F. Erdodi, C. Ma, M. A. Borman, D. J. Hartshorne and T. A. Haystead (2004), Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 279(33), 34496-34504.
- Worby, A., L. M. Mensah and K. J. Murray (1991), Identification of the novel rat liver IBMX-insensitive phosphodiesterase as a non-specific phosphodiesterase capable of hydrolysing cCMP. *Biochem Pharmacol*, 42(6), 1318-1321.

Wörner, R., R. Lukowski, F. Hofmann and J. W. Wegener (2007), cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(1), H237-244.

Xia, C., Z. Bao, C. Yue, B. M. Sanborn and M. Liu (2001), Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 276(23), 19770-19777.

Xiao, D., L. D. Longo and L. Zhang (2005), Alpha1-adrenoceptor-mediated phosphorylation of MYPT-1 and CPI-17 in the uterine artery: role of ERK/PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(6), H2828-2835.

Yang, L., G. Liu, S. I. Zakharov, A. M. Bellinger, M. Mongillo and S. O. Marx (2007), Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. *Circ Res*, 101(5), 465-474.

Zhang, T., S. Zhuang, D. E. Casteel, D. J. Looney, G. R. Boss and R. B. Pilz (2007), A cysteine-rich LIM-only protein mediates regulation of smooth muscle-specific gene expression by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 282(46), 33367-33380.

F.2. Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen

F.2.1. Abstracts

Sigl, K., Desch, M., Spiessberger, B., Bernhard, D., Jochim, A., Wegener, J.W., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2007), Analysis of smooth muscle function in IRAG knockout mice. *48. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Desch, M., Sigl, K., Spiessberger, B., Bernhard, D., Jochim, A., Weinmeister, P., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2007), Analysis of smooth muscle function in IRAG knockout mice. *3rd International Conference on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Dresden, Germany)*.

Desch, M., Schinner, E., Weinmeister, P., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2008), Cardiovascular function of IRAG. *Summerschool (Regensburg, Germany)*.

Desch, M., Schinner, E., Kees, F., Weinmeister, P., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2008), Analysis of smooth muscle and platelet function in IRAG knockout mice. *30. Jahrestagung der GDCh (Regensburg, Germany)*.

Desch, M., Schinner, E., Sigl, K., Wegener, J.W., Feil, R., Feil, S., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2009), Cardiovascular and gastrointestinal function of IRAG. *50. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Desch, M., Sigl, S., Wegener, J.W., Feil, R., Feil, S., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2009), Cardiovascular and gastrointestinal function of IRAG. *4th International Conference on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Regensburg, Germany)*.

Desch, M., Hieke, B., Bernhard, D., Hoecherl, K., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2010), The role of IRAG in blood pressure regulation under physiological and pathophysiological conditions. *51. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

F.2.2. Originalarbeiten

Desch, M., K. Sigl, B. Hieke, K. Salb, F. Kees, D. Bernhard, A. Jochim, B. Spiessberger, K. Hoehlerl, R. Feil, S. Feil, R. Lukowski, J. W. Wegener, F. Hofmann and J. Schlossmann (2010), IRAG determines NO- and ANP-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res (in press)*.

Schlossmann, J. and M. Desch (2009), cGK substrates. *Handb Exp Pharmacol*, (191), 163-193.

Desch, M., Schinner, E., Hofmann, F., Seifert, R., Schlossmann, J. (2010) Cyclic cytidine 3', 5'-monophosphate (cCMP) signals via cGMP kinase I. *(in preparation)*.

Bernhard, D., Desch, M., Sigl, K., Moosmang, S., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2010) NO-dependent relaxation of small arteries and blood pressure regulation by IRAG/IP₃RI. *(in preparation)*.

G. Anhang

G.1. Verwendete Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden in entsprechend genannten Verdünnungen in einer Lösung aus 1x TBST, 3 % BSA und 0.05 % NaN_3 bei 4°C aufbewahrt.

Tab. G.1.: Verwendete Antikörper

Antikörper	Referenz	Verdünnung	Herkunft (Spezies)
IRAG, gereinigt	Prof. Schlossmann	1:500	Kaninchen, polyklonal
cGKIc	Prof. Hofmann	1:200	Kaninchen, polyklonal
cGKI α	Prof. Schlossmann	1:80	Kaninchen, polyklonal
cGKI β	Prof. Schlossmann	1:1000	Kaninchen, polyklonal
IP ₃ RI	Santa Cruz	1:1000	Kaninchen, polyklonal
RGS2	Santa Cruz	1:5000	Kaninchen, polyklonal
MYPT1	Santa Cruz	1:2000	Schaf, polyklonal
NOS3 (eNOS)	Santa Cruz	1:500	Kaninchen, polyklonal
sGC- β 1	Santa Cruz	1:500	Kaninchen, polyklonal
(His) ₆	Abcam	1:5000	Maus, polyklonal
VASP _{gesamt}	Alexis	1:2500	Kaninchen, polyklonal
GAPDH	Biozol	1:2500	Kaninchen, polyklonal
β -Actin	Abcam	1:2500	Kaninchen, polyklonal
Anti-Kaninchen ¹	Dianova	1:50000	Esel, polyklonal
Anti-Schaf ¹	Dianova	1:50000	Esel, polyklonal
Anti-Maus ¹	Dianova	1:10000	Ziege, polyklonal

¹sekundär-Antikörper, Meerrettichperoxidase-konjugiert

G.2. Verwendete Restriktionsenzyme

Alle in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Die Inkubationszeit betrug durchschnittlich 2 Stunden.

Tab. G.2.: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	idealer Puffer	optimale Temperatur
AflII	5'-C/TTAAG-3'	2	37°C
Apal	5'GGGCC/C-3'	4	25°C
BamHI	5'-G/GATCC-3'	3	37°C
BlnI	5'-GC/TNAGC-3'	4	37°C
DpnI	5'-GA(Met)/TC-3'	4	37°C
EcoRI	5'-G/AATTC-3'	1-4	37°C
KpnI	5'-GGTAC/C-3'	1	37°C
MluI	5'-A/CGCGT-3'	3	37°C
NarI	5'-GG/CGCC-3'	1	37°C
NotI	5'-GC/GGCCGC-3'	3	37°C
PvuI	5'-CGAT/CG-3'	3	37°C
SmaI	5'-CCC/GGG-3'	4	25°C
XbaI	5'T/CTAGA-3'	2	37°C
XhoI	5'-C/TCGAG-3'	2	37°C

G.3. Verwendete Oligonukleotide

Alle in der Tabelle genannten Primer wurden von den Firmen MWG Biotech AG, Ebersberg und Entelechon, Regensburg synthetisiert. Die Buchstaben „r“ und „f“ stehen für „reverse“ bzw. „forward“. Die Buchstaben „L“ und „R“ stehen für „links“ bzw. für „rechts“. Für eine PCR waren die Primer auf 25 pmol/μl und für die Sequenzierung auf 0.8 pmol/μl eingestellt.

Tab. G.3.: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Bemerkung
MD3r	CTC CAG CTC TTT GAT CCT CT	Seq.-Primer cGKIα in pMT3
MD4f	CCC TGA GGA CAA TGA TGA AC	Seq.-Primer cGKIc in pMT3
MD5r	GCC TCA GCT CCT CGA TCT TC	Seq.-Primer cGKIβ in pMT3
MD6f	GGC CAT ACA CTT GAG TGA	Seq.-Primer cGKIα in pMT3
MD7r	GGG CAG CAC TGA CTG GCA TT	Seq.-Primer cGKIα in pMT3
MD16r	CCG GAA TTC TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GAA GTC TAT GTC CCA TCC TG	(His) ₆ -Primer cGKIc
MD17f	AAG GCT TAA GAA AAG GCA CCT TGA CAC	(His) ₆ -Primer cGKIc
cGKIαL	CGC CAG GCG TTC CGG AAG TT	cGKIα-Primer, RT-PCR
cGKIαR	GTG CAG AGC TTC ACG CCT T	cGKIα-Primer, RT-PCR
cGKIβL	GGA GAA GAT CGA GGA GCT GA	cGKIβ-Primer, RT-PCR
cGKIβR	TTC GTC CTT CTG ATC CAA CTC	cGKIβ-Primer, RT-PCR
MYPT1L	GCT GTT CCA GTG AGG AGG AC	MYPT1-Primer, RT-PCR
MYPT1R	GCC ATG GGC TTT GTC TTA TC	MYPT1-Primer, RT-PCR
sGCβ1L	AGG TGT GGG AAG ACA TCA AAA	sGCβ1-Primer, RT-PCR
sGCβ1R	TCT GAC AAG AAA CTG GCC TTC	sGCβ1-Primer, RT-PCR
RGS2L	GAG AAA ATG AAG CGG ACA CTC T	RGS2-Primer, RT-PCR
RGS2R	TTG CCA GTT TTG GGC TTC	RGS2-Primer, RT-PCR
AA36	TAT TGC TGC GCA AAC TTA GGG TT	IRAG-Primer, RT-PCR
AA38	CGC CGT TCG AGG AAC CCC GTC TT	IRAG-Primer, RT-PCR
NOS2L	CGG GAT CCG CTT AGA GAA CTC AAC CAC	NOS2-Primer, RT-PCR
NOS2R	GGA ATT CGC TGC CCT CGA AGG TGA GC	NOS2-Primer, RT-PCR
GAPDHL	TTC ATT GAC CTC AAC TAC AT	GAPDH-Primer, RT-PCR
GAPDHR	GAG GGG CCA TCC ACA GTC TT	GAPDH-Primer, RT-PCR

G.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die aufmerksame und stetige Betreuung sowie für Anregungen und Tipps, die entscheidend für den Fortgang der Arbeit waren.

Herrn Prof. Dr. Frieder Kees für die tatkräftige Unterstützung bei der cGMP-Analytik mittels HPLC.

Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz für die zu Beginn zur Verfügung gestellten Myographen in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Frank Schweda und Dr. Dominik Bernhard für die Einführung in die Telemetrie, für die Unterstützung bei der Auswertung, den zahlreichen Tipps und für die zur Verfügung gestellten Transmitter und Empfängerplatten.

Herrn PD Dr. Klaus Höcherl für die beratende Tätigkeit und für die Hilfestellung bei der Auswertung der Sepsis-Versuche.

Den „Schlossmännern“ und Kollegen Lisa, Katharina, Andrea und Petra für die lustigen Pausen und Blödeleien, für die jeder immer zu haben war und insbesondere Higgl für die fachlichen Diskussionen, Späße im Labor und Büro und das regelmässige gemeinsame Gewichtestemmen in den Abendstunden.

Allen technischen Assistenten, insbesondere Gertraud Wilberg, Katharina Wohlfarth und Maria Hirblinger für die tatkräftige Unterstützung bei Westernblots, Zellkultur, Genotypisieren und bei der Bestimmung der mRNA-Konzentrationen.

Allen Tierpflegern, die die zeitintensive Tierzucht möglich gemacht haben.

Allen Kollegen am Lehrstuhl Pharmakologie und Toxikologie für die fachlichen und weniger fachlichen, witzigen Gespräche.

Meinen Freunden und Musikkollegen Flo und Eddy sowie der „Wiener Truppe“ für entspannende Wochenenden und dem Spaß, der eine gelungene Alternative zum Arbeitsalltag war.

Ganz besonders meinen Eltern, die mir durch ihren Rückhalt, ihr Verständnis und ihre großzügige Unterstützung das Studium der Pharmazie und damit auch die Dissertation ermöglicht haben.

G.5. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)