

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

Funktion von cCMP und cCMP-spezifischen Signalwegen



DISSERTATION

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

**Vorgelegt von
Stefanie Wolfertstetter
aus Palling
im Jahr 2015**

Dissertation eingereicht: September 2015

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. phil. Dr. rer. nat. Wolfgang Wiegrebe

1. Gutachter (1. Prüfer): Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

2. Gutachter (2. Prüfer): Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ekkehard Haen

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. rer. nat. Frank-Michael Matysik

Meinen Eltern

“What we know is a drop, what we don’t know is an ocean”

Sir Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	5
A.1 DER NO/CGMP/CGK-SIGNALWEG	5
A.1.1 Pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten	7
A.2 DIE CGMP-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASEN	9
A.2.1 Struktur	10
A.2.2 Lokalisation und Substrate	11
A.2.3 cGK-KO Mausmodelle	12
A.3 DER cAMP-SIGNALWEG	12
A.4 ZYKLISCHE NUKLEOTIDE (cGMP)	13
A.5 DER MAP-KINASE-SIGNALWEG	15
A.6 SEPSIS UND DEREN EINFLUSS AUF DIE cNMP-VERMITTELTEN SIGNALWEGE	18
A.7 ZIELE DIESER ARBEIT	21
B. MATERIAL UND METHODEN	22
B.1 MATERIALIEN	22
B.1.1 Geräte	22
B.1.2 Verbrauchsmaterialien	24
B.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe und Kits	25
B.1.4 Antikörper	28
B.1.5 Software	29
B.1.6 Datenbanken	29
B.2 METHODEN	30
B.2.1 Versuchstiere	30
B.2.2 Molekularbiologische Methoden	31
B.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
B.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	31
B.2.3 Tierexperimente und physiologische Versuche	32
B.2.3.1 Gewinnung von Urinproben	32
B.2.3.2 Gewinnung von Serumproben	32
B.2.3.3 Isolierung von Lunge, Jejunum, Niere und Hirn	33
B.2.3.4 Retrograde Perfusion von Versuchstieren	33
B.2.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden	34
B.2.4.1 Gewinnung von Protein aus Mausgeweben	34
B.2.4.2 Proteinbestimmung mittels Qubit	35

B.2.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry	35
B.2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford	35
B.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
B.2.4.6 Coomassie-Färbung	37
B.2.4.7 Silber-Färbung	38
B.2.4.8 Western Blot	39
B.2.5 Affinitätschromatographie	42
B.2.5.1 Co-Immunpräzipitation	42
B.2.5.2 cNMP-Agarose-Fällung	43
B.2.6 Phosphorylierungsexperimente	45
B.2.6.1 Stimulation von Kinasen in Gewebelysaten	46
B.2.6.2 Detektion der Phosphorylierung	46
B.2.6.3 Densitometrische Auswertung und Berechnung der Stimulation	47
B.2.7 Phosphotransferaseassay	47
B.2.7.1 Standard-Test zum Nachweis von cG-Kinasen	49
B.2.7.2 Bestimmung der Aktivitätskonstanten für cNMPs (K_a -Wert)	52
B.2.7.3 Bestimmung der Aktivität endogener cG-Kinasen aus Gewebelysaten	52
B.2.8 Kultivierung und Stammhaltung von Sf9-Zellen	53
B.2.8.1 Nährmedium und Zusätze	53
B.2.8.2 Anzucht und Stammhaltung	53
B.2.8.3 Zählen von Sf9-Zellen	53
B.2.9 Expression von rekombinanten cG-Kinasen in Sf9-Zellen	53
B.2.9.1 Ernte und Aufarbeiten der Sf9-Zellen	54
B.2.9.2 Schnellnachweis von cG-Kinasen in Sf9-Zellen	55
B.2.9.3 Aufschluss der Sf9-Zellen	55
B.2.9.4 Aufreinigung der löslichen cG-Kinasen	55
B.2.9.5 Aufkonzentrierung von cG-Kinasen durch Ultrafiltration	56
B.2.10 Statistik	57
C. ERGEBNISSE	58
C.1 AKTIVIERUNG cNMP-ABHÄNGIGER KINASEN <i>IN VITRO</i> UND IN GEWEBELYSATEN	58
C.1.1 Expression und Aufreinigung von cGKI	58
C.1.2 Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Enzyme	60
C.1.3 Analyse von cNMPs mittels Phosphotransferaseassay	61
C.1.3.1 Aktivierung zyklisch-Nukleotid-abhängiger Kinasen <i>in vitro</i> durch cCMP	62
C.1.3.2 Aktivierung endogener Kinasen in Gewebelysaten durch cCMP	63

C.1.3.3 Aktivierung endogener Kinasen in Gewebelysaten durch cGMP und cAMP	66
C.2 IDENTIFIZIERUNG VON cCMP-BINDENDEN PROTEINEN	69
C.2.1 Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen mittels Affinitätschromatographie und Silberfärbung.....	69
C.2.2 Identifizierung cCMP-bindender Proteine mittels Affinitätschromatographie und Western Blot	70
C.2.3 Spezifität der cCMP-Affinitätschromatographie	73
C.3 INTERAKTION DER MAPK (ERK 1/2) MIT cGK- ALLGEMEINE BIOCHEMISCHE VERSUCHE .74	74
C.3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen MAPK und cCMP mittels cCMP-Affinitätschromatographie.....	74
C.3.2 Untersuchung der Interaktion zwischen MAPK und cGK mittels Co-Immunpräzipitation.....	77
C.3.3 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen MAPK und cGMP.....	78
C.4 INTERAKTION DER MAPK (ERK 1/2) MIT cGK- PHOSPHORYLIERUNGSVERSUCHE	79
C.4.1 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung.....	79
C.4.2 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung unter cAK-Blockade	83
C.4.3 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung unter PKC-Blockade.....	85
C.4.4 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung in KO-Gewebe	87
C.4.5 Stimulation der MAPK-Phosphorylierung durch andere zyklische Nukleotide	89
C.5 EFFEKTE EINER SCHWEREN, LPS-INDUZIERTEN SEPSIS.....	91
C.5.1 Bestimmung der cNMP-Spiegel im Urin während einer LPS-induzierten Sepsis	91
C.5.2 Änderung der MAPK-Phosphorylierung während einer LPS-induzierten Sepsis	93
D. DISKUSSION.....	95
D.1 cCMP ALS „SECOND MESSENGER“?.....	95
D.2 IDENTIFIZIERUNG VON cCMP-INTERAGIERENDEN PROTEINEN	99
D.3 INTERAKTION ZWISCHEN cCMP UND MAPK	103
D.4 cNMP-DETEKTION UND (PATHO)PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DES cCMPS IN DER SEPSIS?	106
E. ZUSAMMENFASSUNG.....	109
F. LITERATURVERZEICHNIS	111
F.1 ZITIERTER WISSENSCHAFTLICHER VERÖFFENTLICHUNGEN	111
F.2 EIGENE WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	124
F.2.1 Poster	124
F.2.2 Originalarbeiten.....	124

G. ANHANG	125
G.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	125
G.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	129
G.3 TABELLENVERZEICHNIS	130
G.4 FORMELVERZEICHNIS	130
G.5 WEITERE ANHÄNGE.....	131
G.5.1 PCR-Protokoll.....	131
G.5.2 Protokoll zur Herstellung von Agarose-Gelen	132
G.5.3 Verwendete Primer für die Genotypisierung	132
G.5.4 Massenspektrometrische Auswertung des Silbergels	132
G.6 DANKSAGUNG.....	134
G.7 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	135

A. Einleitung

Stickstoffmonoxid, kurz „NO“, spielt nicht nur im chemisch-technischen, sondern auch im medizinischen Bereich eine wichtige Rolle. Ende der 1970er Jahre entdeckte der Amerikaner Ferid Murad, dass NO eine vasodilatierende Wirkung aufweist [1]. Etwa zeitgleich postulierten die Arbeitsgruppen um die amerikanischen Forscher Furchgott und Ignarro die Existenz eines sogenannten EDRFs („endothelium derived relaxing factor“), welcher ebenfalls eine gefäßerweiternde Wirkung hatte [2, 3]. Später wurde festgestellt, dass die beiden Substanzen identisch sind [4]. Im Jahr 1998 wurde schließlich den drei Wissenschaftlern für ihre Arbeit der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Heutzutage wird eine Vielzahl von NO-freisetzenden Pharmaka zur Behandlung der Angina pectoris oder zur Herzinfarkt-Prophylaxe eingesetzt. Mittlerweile wurden auch die NO-vermittelten Signalwege intensiv erforscht (Abbildung 2).

Im Jahr 1958 wiesen Rall und Sutherland die Existenz von cAMP nach [5], einem zyklischen Nukleotid, welches in zahlreichen physiologischen Prozessen involviert ist. Dadurch wurde die Frage nach der Existenz anderer 3',5' zyklischen Nukleotiden und deren Wirkung bei der zellulären Regulation aufgeworfen. Einige Jahre später gelang es dann, cGMP und cCMP zu synthetisieren [6]. Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse über NO-vermittelte Signalwege bzw. zyklische Nukleotide gesammelt werden konnten, sind bis dato noch immer viele Punkte dahingehend ungeklärt.

A.1 Der NO/cGMP/cGK-Signalweg

In Eukaryoten katalysieren NO-Synthasen (NOS) die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin. Durch Oxidation des terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe wird L-Citrullin abgespalten [7]. Es existieren drei verschiedene Isoformen der NOS: die endotheliale NO-Synthase (lokalisiert in den Endothelzellen, eNOS), die neuronale NO-Synthase (im Gehirn, nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (z. B. in den Makrophagen, iNOS) (reviewed in [8]). Diese werden konstitutiv exprimiert, d. h. sie sind ständig vorhanden, mit Ausnahme der iNOS, die hauptsächlich durch Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) und Bakteriengifte (Lipopolysaccharide, LPS) induziert wird [9-11]. Die Regulation der Aktivität der konstitutiven NO-Synthasen (eNOS, nNOS) erfolgt über die intrazelluläre Calciumkonzentration, genauer gesagt über eine Bindung von Calcium/Calmodulin [12]. Zusätzlich kann eNOS in geringem Ausmaß durch Einwirkung mechanischer Kräfte aufs Gefäßendothel produziert werden (über eine Aktivierung der cAK). eNOS liegt erst dann in einer aktiven Form vor, wenn zwei Moleküle eNOS an zwei Calcium/Calmodulin-Komplexen binden. Ein wichtiger Schritt bei dieser Aktivierung ist u. a. die Phosphorylierung von Ser1177 durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) oder auch durch die cAMP-abhängige Proteinkinase

(cAK). iNOS hingegen wird nicht über Calcium reguliert, sondern durch immunstimulierende Substanzen [13]. Die Synthese dient dem Schutz des Körpers, da es im Falle einer Expression (z. B. durch Endotoxine) zu einem starken und langanhaltenden Anstieg der iNOS-Konzentration kommt. Die NO-Synthese kann dadurch um das über 1000-fache gesteigert werden, wodurch wiederum Bakterien und Zellen abgetötet werden können (siehe auch A.6 Sepsis und deren Einfluss auf die cNMP-vermittelten Signalwege) [14].

Das so gebildete NO ist relativ kurzlebig und kann schnell durch Zellmembranen diffundieren, um im Zytosol über eine Häm-Gruppe die lösliche Guanylylzyklase (sGC für „soluble guanylyl cyclase“) zu aktivieren [15]. sGC ist ein Heterodimer und besteht aus einer

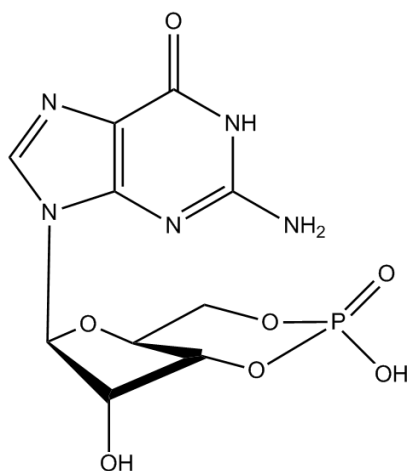


Abbildung 1: Strukturformel cGMP

α - (entweder α_1 oder α_2) und einer β -Untereinheit (entweder β_1 oder β_2). Nur heterodimere Enzyme sind aktiv. Andernfalls kommt keine katalytische Aktivität zustande [16-19]. Jede Untereinheit der sGC besteht aus drei funktionalen Domänen: die Häm-, Dimerisierungs- und katalytische Domäne, wobei die Häm-Domäne N-terminal und die katalytische Domäne C-terminal liegt [20].

Die lösliche Guanylylzyklase katalysiert, bei erfolgter Stimulation durch NO, die Umwandlung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) (Abbildung 1). Es existiert aber

noch eine andere Guanylylzyklase, die in der Lage ist, cGMP zu generieren, nämlich die pGC, die partikuläre Guanylylzyklase. Bei der pGC handelt es sich um einen membrangebundenen Rezeptor, der aktiviert wird, sobald Liganden an die extrazellulären Domänen binden. Bisher wurden in Säugetieren sieben pGC-Isoformen (pGC-A bis pGC-G) identifiziert. An die pGC-A und die pGC-B können natriuretische Peptide (NPs) agonistisch binden. Hier spielen besonders ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP („brain derived natriuretic peptide“) und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid) eine Rolle. pGC-C wird hauptsächlich im intestinalen Epithel exprimiert und bindet Guanyline [21, 22].

Sowohl die Bindung von NPs an die pGC, als auch die Bindung von NO an den „NO-Rezeptor“ sGC führt zu einer cGMP-Synthese. cGMP ist ein „second messenger“ und wirkt als Botenstoff in den Zellen, indem es an verschiedene Zielproteine bindet und somit Signale weiterleitet [23-25]. Diese Zielproteine kann man in drei große Gruppen unterteilen, die cNMP-regulierende Phosphodiesterasen (PDEs) [26], zyklisch-Nukleotid aktivierte Kationenkanäle (CNGs) [27] und cNMP-abhängige Proteinkinasen (z. B. cGK, cAK) [28, 29]. Zwischen cGMP und cAMP kann zudem eine „Crossreaktion“ auftreten, d. h. beide zyklische Nukleotide treten mit denselben Proteinen (z. B. PDEs) in Interaktion. Beispielsweise kann

es durch cGMP zu einer Aktivierung des cAMP-Signalwegs kommen, indem Phosphodiesterasen (cAMP- und cGMP-abbauend) durch cGMP gehemmt werden. Dadurch steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel an, was wiederum die cAK vermehrt aktivieren kann [30, 31].

PDEs wurden 1962 erstmals entdeckt [32]. Bis zum heutigen Tage konnten in Säugetieren elf verschiedene PDE-Familien identifiziert werden. PDEs sind Dimere mit einer C-terminal gelegenen katalytischen Domäne, die für die Spaltung der Phosphodiesterbindung verantwortlich ist. Somit katalysieren Phosphodiesterasen die Hydrolyse von 3',5'-zyklischen Nukleotiden in die entsprechenden 5'-Monophosphate. Man unterscheidet PDE-Familien, die ausschließlich cAMP oder cGMP spalten gegenüber PDE-Familien, die eine geringere Spezifität zeigen und somit cGMP, cAMP und auch andere zyklische Nukleotide hydrolysieren [33, 34].

cGMP wird zusätzlich durch sogenannte „multidrug resistance protein“ Transporter (MRP), auch als ABC-Transporter bezeichnet, aus der Zelle befördert [35]. Sie zählen zur Familie der Plasmamembrantransporter. Besonders MRP4, 5 und 8 sind an dem Transport des nicht membrangängigen cGMPs beteiligt. Die MRPs können durch Probenecid, einem Arzneistoff zur Behandlung der Gicht, gehemmt werden.

Bei den zyklisch-Nukleotid aktivierten Kationenkanälen (CNGs) handelt es sich um spannungsabhängige Kationenkanäle, die durch cAMP bzw. cGMP aktiviert werden können. CNGs bestehen aus vier Untereinheiten und transportieren Na^+ , K^+ und Ca^{2+} [36]. Sie spielen besonders in der Signaltransduktion von Photorezeptoren eine wichtige Rolle [37].

A.1.1 Pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten

Pharmakologisch und medizinisch nutzt man den NO/cGMP/cGK-Signalweg schon seit ca. 100 Jahren. NO war das erste Gas, das als Arzneimittel von der EMA (European Medicines Agency) zugelassen wurde. Es wirkt gefäßerweiternd und relaxierend auf die glatte Muskulatur [38]. Außerdem wird es bei Neugeborenen bei Lungenversagen [25] eingesetzt. Wird dieser Signalweg aktiviert, weiten sich die Gefäße und der Blutdruck sinkt, was bezüglich einer Thrombose bzw. Artherosklerose vorbeugend wirkt. Zusätzlich setzt man NO-Donoren ein. Organische Nitrate kann man zur Behandlung und Prophylaxe von Angina pectoris und Myokardinfarkt verwenden. Glyceroltrinitrat („GTN“, Nitrolingual[®]) wirkt sehr schnell und wird daher bei einem akuten Angina pectoris Anfall als Spray verabreicht. Ein langsamer wirkendes organisches Nitrat stellt ISMN (Isosorbidmononitrat) dar, welches daher nur zur Therapie, nicht im Akutfall, eingesetzt werden kann. NO wird enzymatisch aus ISMN und GTN freigesetzt. Daher besteht hier auch die Gefahr einer sogenannten „Nitrat-

Toleranz“, weshalb man vermehrt nicht-enzymatisch wirkende NO-Donoren wie Molsidomin einsetzt [25].

Seit Januar 2014 ist auf dem europäischen Markt der NO-unabhängige und Häm-abhängige sGC-Stimulator Riociguat erhältlich. Dieser wird zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie (PH) verwendet [39]. Aktuell laufen hierzu mehrere Phase III Studien. Cinaciguat und Ataciguat sind weitere sGC-Aktivatoren, die momentan klinisch geprüft werden. Sie sind NO- und Häm-unabhängig und sollen bei PH, Myokardinfarkt und Hypertonie eine positive Wirkung ausüben [23, 40].

Zusätzlich kann der cGMP-Abbau durch Hemmung der PDEs blockiert werden. Im Jahr 1998 wurde beispielsweise Sildenafil (Viagra[®]) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion des Mannes zugelassen. Durch Inhibition der PDE5 (cGMP-spezifisch) steigt der intrazelluläre cGMP-Spiegel im Corpus cavernosum an. Es kommt dadurch zu einer Vasodilatation und daraufhin zu einer Erektion. Weitere PDE-Hemmstoffe sind u. a. Cilostazol (PDE3-Hemmer) zur Therapie der akuten Herzinsuffizienz, Dipyridamol (PDE6-Hemmer) zur Thrombozytenaggregationshemmung und Roflumilast (PDE4-Hemmer) zur Behandlung der COPD [41]. Weitere Untersuchungen zu den PDE4-Inhibitoren deuten darauf hin, dass diese antientzündlich bei Autoimmunerkrankungen (z. B. Multiple Sklerose) [42] und antipsychotisch wirken [43, 44].

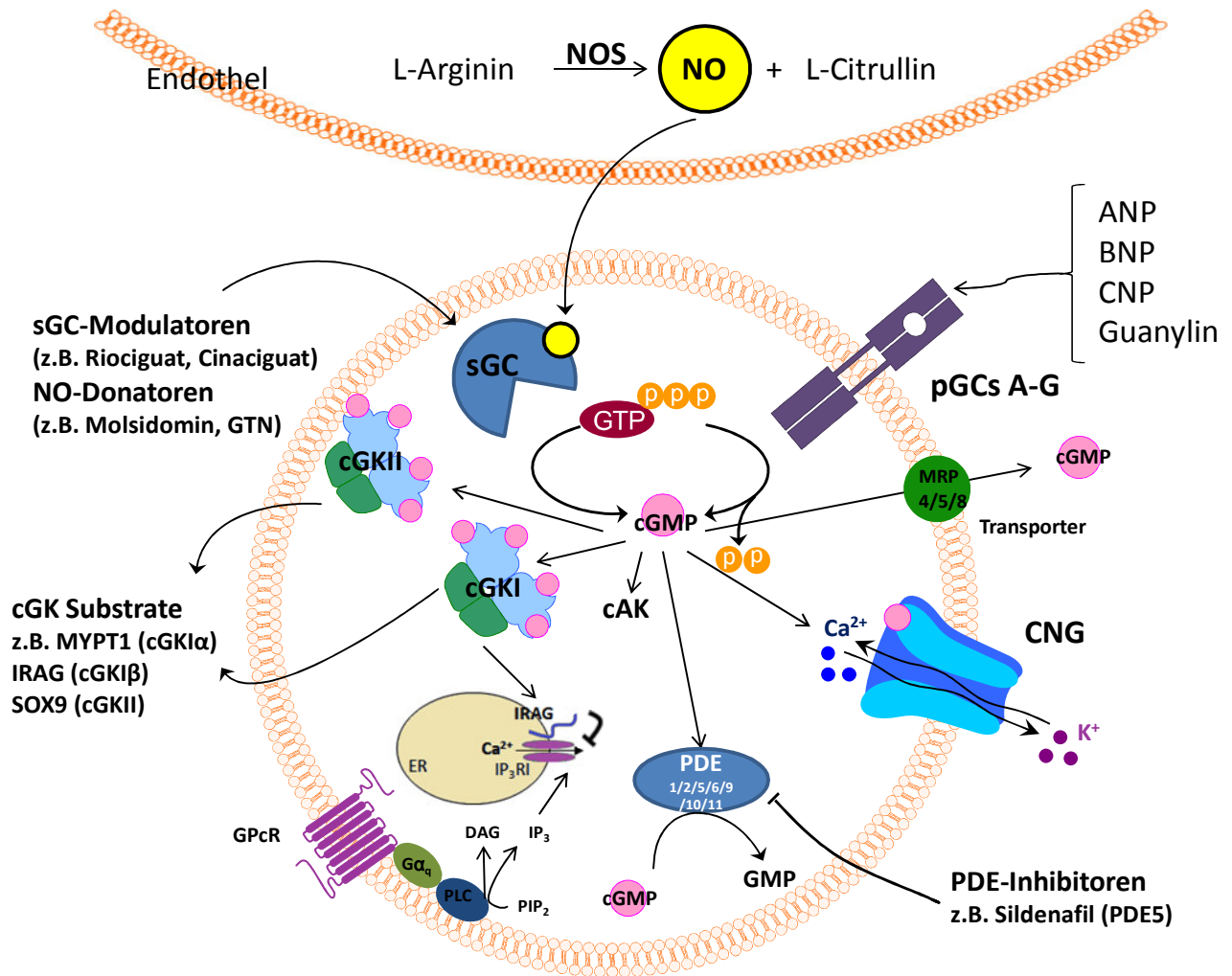


Abbildung 2: Modell des NO/cGMP/cGK-Signalwegs. NOS katalysiert die Umwandlung von L-Arginin in NO, welches die sGC aktivieren kann. Dadurch kommt es zur Bildung von cGMP aus GTP. Diese Umwandlung kann auch durch pGC (nach Aktivierung durch ANP, BNP/CNP/Guanylin) katalysiert werden. cGMP wirkt als „second messenger“ in der Zelle auf seine Targets (PDE, CNGs, cGK).

A.2 Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, die die Übertragung eines Phosphats (meist aus ATP stammend) auf die Hydroxy-Gruppe einer Aminosäure katalysieren. cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK oder auch PKG) zählen zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und sind in Eukaryoten weit verbreitet [45].

A.2.1 Struktur

Es existieren zwei Gene: *prkg1* codiert für cGKI α (671 AS) bzw. cGKI β (686 AS) und *prkg2*, welches für cGKII (762 AS) codiert [46, 47]. Der N-Terminus der cGKI wird von zwei verschiedenen Exons codiert. Durch alternatives Spleißen entstehen die beiden cGKI Isoformen cGKI α und cGKI β . Somit unterscheiden sich diese Kinasen ausschließlich in ihrer N-terminalen Domäne bzw. in ihrem Leuzin-Zipper (Abbildung 3), welche besonders für die Homodimerisierung und die spezifische Substratbindung verantwortlich sind. Im inaktiven Zustand werden die Homodimere mittels Leuzin-Zipper im N-Terminus zusammengehalten. Die Masse der cGKI α beträgt ca. 76 kDa, die der cGKI β wird mit ca. 78 kDa angegeben und die Masse der cGKII beträgt ca. 87 kDa [29]. cGKI ist im Zytosol lokalisiert, wohingegen cGKII myristoyliert (am N-terminalen Gly2 Rest) vorliegt und dadurch mit der Zellmembran verankert ist. Die cGMP-abhängigen Kinasen sind Homodimere mit jeweils zwei funktionalen Domänen, einer regulatorischen (R) und einer katalytischen Domäne (C), wobei die regulatorische Domäne weiter in N-terminale Domäne und cGMP-Bindungsdomäne unterteilt werden kann. cG-Kinasen sind folgendermaßen aufgebaut:

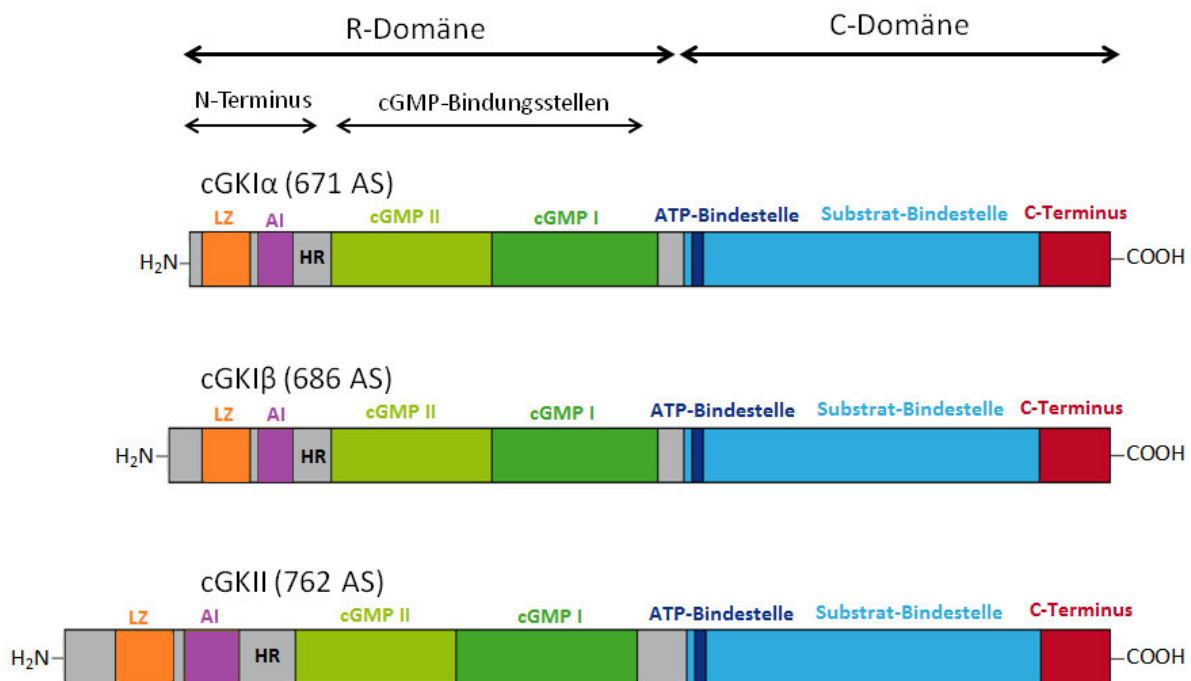


Abbildung 3: Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Details siehe Text. HR: Hinge-Region, AI: Autoinhibitorische Domäne, LZ: Leuzin-Zipper, AS: Aminosäure

Die cGKs weisen jeweils eine cGMP-Bindungsstelle auf, die in eine hoch-affine (cGMP I) und eine niedrig-affine (cGMP II) Bindungstasche eingeteilt werden kann [29]. Binden zwei cGMP-Moleküle an die Bindungsstellen, kommt es zu einer Änderung in der

Sekundärstruktur [48], woraufhin die katalytische Domäne nicht weiter von der autoinhibitorischen Domäne (AI) blockiert und somit das Enzym aktiviert wird. Die AI wirkt im nicht aktivierten Zustand wie ein Substrat. Deshalb wird dieser Abschnitt auch Pseudosubstrat-Domäne genannt. Die katalytische Domäne beinhaltet die Mg^{2+}/ATP - und die Substrat-Bindestellen. Bei Aktivierung des Enzyms kommt es hier zu einem Transfer des γ -Phosphats des ATPs auf ein Serin/Threonin-Motiv des gebundenen Substrats, welches somit phosphoryliert wird [45]. Der phosphorylierte Aminosäurerest weist üblicherweise die typische Konsensussequenz RRXS/TX bzw. RKXS/TX auf, wobei N-terminal auf einen Argininrest, ein Arginin bzw. ein Lysin folgt. X steht für eine beliebige Aminosäure, worauf sich ein Serin-/Threoninrest anschließt. Die meisten der bisher analysierten cGK-Substrate weisen eine übereinstimmende Phosphorylierungskonsensussequenz auf [49, 50]. Das Enzym kann, wie bereits erwähnt, durch Autophosphorylierung seine Konformation ändern. Diese tritt, nach cGMP-Bindung, bei cGKI α an Thr-59 und bei cGKI β an Ser-64 und Ser-80 auf. Die α -Isoform der cGK ist gegenüber cGMP um das 10fache sensitiver als cGKI β , d. h. cGKI α wird bei deutlich niedrigeren cGMP-Konzentrationen ($K_a=0.1\mu M$) aktiviert als cGKI β ($K_a=1-1.2\mu M$) [51-53]. Die Unterschiede in den K_a -Werten resultieren aus den Unterschieden im Leuzin-Zipper, der AI-Domäne und der Hinge-Region (HR) [29].

A.2.2 Lokalisation und Substrate

Bisher wurden zahlreiche Substrate identifiziert, die *in vivo* durch cGKI bzw. cGKII phosphoryliert werden. Viele dieser Substrate beeinflussen nach ihrer Phosphorylierung wieder andere Signalwege und Zellstrukturen, z. B. Ionenkanäle oder G-Proteine. Beispielsweise ist MYPT1 („myosin phosphatase targeting subunit 1“) ein cGKI α -spezifisches Substrat [54] und stellt die Untereinheit der Myosin Phosphatase dar, welche die Interaktion zwischen Aktin und Myosin reguliert. IRAG („IP₃RI-associated cGMP kinase substrate“) hingegen interagiert mit dem N-Terminus der cGKI β . Wird IRAG phosphoryliert, kommt es zu einer verminderten Ca^{2+} -Freisetzung aus IP₃ sensitiven Resorts [55, 56] (Abbildung 2). VASP (Vasodilatator-stimuliertes-Phosphoprotein) ist ein Substrat beider cGKI-Isoformen [57] und wird spezifisch am Ser-293 phosphoryliert, wobei neuere Erkenntnisse darauf hindeuten, dass diese Stelle auch von cGKII phosphoryliert werden kann [58]. Es handelt sich um ein Aktin-bindendes Protein, welches in hohen Konzentrationen in Thrombozyten enthalten ist. Auch Phospholamban stellt ein Substrat der cGKI dar und steuert im Herzmuskel die Aufnahme von Calcium ins sarkoplasmatische Retikulum [59]. Ein cGKII spezifisches Substrat ist z. B. der Transkriptionsfaktor SOX9. SOX9 hemmt in Chondrozyten die hypertrophische Differenzierung und eine Phosphorylierung dieses Substrates bewirkt eine Ausdifferenzierung der Chondrozyten [60, 61].

cGMP-abhängige Proteinkinasen sind im Körper in hohen Konzentrationen ($>0.1\mu\text{M}$) anzutreffen. cGKI α wird besonders in Lunge, Herz, Spinalganglien und Cerebellum in hohen Konzentrationen exprimiert. Zusammen mit cGKI α wird cGKI β in Glattmuskelzellen (Uterus, Gefäße, Darm und Luftröhre) gebildet [56, 62]. Desweiteren ist hauptsächlich cGKI β in Thrombozyten, Neuronen des Hippocampus und im *Bulbus olfactorius* anzutreffen [29, 56]. cGKII ist in einigen Bereichen des Gehirns, der Niere, der Lunge und in Chondrozyten lokalisiert [61, 63-65]. cGKII ist auch in der Darmmucosa exprimiert und spielt bei der gastrointestinalen Chlorid- und Wasser-Sekretion in das Lumen eine wichtige Rolle, indem sie den CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) phosphoryliert [66].

A.2.3 cGK-KO Mausmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurde zur funktionellen Analyse der cGKI und cGKII mit Knockout-Mäusen (KO bzw. cGKI $^{-/-}$, cGKII $^{-/-}$) gearbeitet. Die Generierung und Charakterisierung dieser Tiere erfolgte bereits in früheren Arbeiten von Andreas Pfeifer, wie in [61, 67] beschrieben. Um cGKI-KO-Mäuse zu erhalten, wurde das Exon 10, welches in der ATP-Bindungsdomäne liegt, deletiert (siehe Doktorarbeit Dr. Wiebke Wolfsgruber). Dadurch wurden beide Isoformen der cGKI „ausgeschaltet“, auf die Expression von cGKII und cAK hatte das keinen Effekt. Dies hat eine extrem reduzierte Lebenserwartung der KO-Tiere zur Folge, nach ca. 8 Wochen sind 79% der Tiere bereits verstorben [67]. Die cGKI-KO-Tiere zeigen darüber hinaus kardiovaskuläre und gastrointestinale Defekte [68, 69] und waren somit für bestimmte, in dieser Arbeit durchgeführte Experimente, nicht geeignet. Phänotypisch unterscheiden sich cGKII-KO-Mäuse deutlich von cGKI $^{-/-}$ - und WT-Versuchstieren. Sie weisen eine verminderte Körpergröße, einen gedrungenen Körperbau und einen kürzeren Schwanz auf [61]. Allerdings gleicht die Lebenserwartung der cGKII $^{-/-}$ -Tiere der der WT-Mäuse, daher konnten diese KO-Mäuse auch bei längerandauernden Versuchen eingesetzt werden. Die Generierung erfolgte hier durch Deletion eines Fragments, bestehend aus Exon 2 und dem darauffolgenden Intron, wobei das deletierte Exon für den ersten Teil der cGMP-Bindungstasche kodiert.

A.3 Der cAMP-Signalweg

Im Jahr 1958 wurde das zyklische Adenosinmonophosphat als erstes zyklisches Nukleotid identifiziert [5]. cAMP ist ein „second messenger“ [70] und an zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen, u. a. an der Neurotransmission und Zelldifferenzierung beteiligt. Bei Säugetieren wird cAMP (Abbildung 4) aus ATP durch membranständige (mAC, 9 Isoformen) und eine lösliche Adenylzyklase (sAC) generiert. Die sAC wird durch Bicarbonate aktiviert [71], die membranständigen ACs 1-8 können spezifisch durch Forskolin

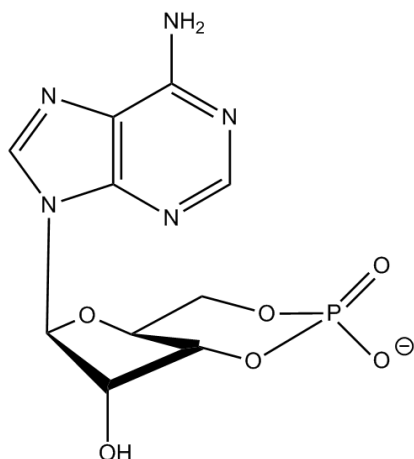


Abbildung 4: Strukturformel cAMP

stimuliert werden [72]. G_s-gekoppelte Rezeptoren stimulieren und G_i-gekoppelte Rezeptoren hemmen die ACs. Zielstrukturen für cAMP sind die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAK), PDEs, CNGs, Raf (Abbildung 6) und EPACs („exchange proteins activated by cAMP“) [73]. Die cAK besteht aus 2 regulatorischen (R) und 2 katalytischen (C) Untereinheiten, die sich noch weiter unterteilen lassen (RI α , RI β , RII α , RII β und C α , C β , C γ). In der R-Domäne befinden sich zwei cAMP-Bindungsstellen, eine autoinhibitorische Domäne und ein Abschnitt, der mit der C-Domäne interagieren kann. Diese enthält wiederum die Bindungsstellen für ATP und

das Substrat [74]. Bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, kommt es zu einer Dissoziation der katalytischen Untereinheiten von den regulatorischen. Die C-Untereinheiten phosphorylieren Substratproteine an der Konsensussequenz RRXS/T. Bekannte cAK-Substrate sind der Transkriptionsfaktor CREB („cAMP response element-binding protein“) [73], Ca²⁺-Kanäle und die MLCK („myosin-light-chain-kinase“). Auch der MAPK („mitogen-activated protein kinase“)-Signalweg wird durch cAK reguliert [75].

A.4 Zyklische Nukleotide (cCMP)

Die purinen zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP (oder auch kanonische cNMPs) wurden in den letzten Jahrzehnten ausgiebig beforscht. Über die pyrimidinen zyklischen Nukleotide

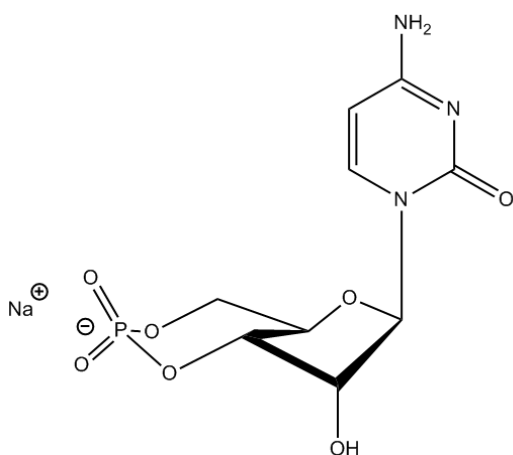


Abbildung 5: Strukturformel cCMP

hingegen, wie Cytidin-3',5'-monophosphat (cCMP) oder Uridin-3',5'-monophosphat (cUMP), ist bis heute nur sehr wenig bekannt.

Lange Zeit wurde deren Existenz bzw. deren physiologische Relevanz angezweifelt. Analytische Methoden zur cNMP-Bestimmung waren nicht verfügbar bzw. waren zu unsensitiv. Eine Verbesserung der Methoden zum cNMP-Nachweis war somit zwingend erforderlich. Im Gegensatz zu cAMP und cGMP steht bis heute kein ELISA-Kit zur Detektion der cCMP-Spiegel zur Verfügung. Grund

hierfür ist zum einen die zu geringe Sensitivität der Verfahren, da die Konzentration für cCMP in Zellen im nanomolaren Bereich bzw. in Gewebe im picomolaren Bereich liegt. Zum anderen wurde auf diesem Gebiet lange Zeit nur wenig geforscht. Große Firmen sahen

keinen Nutzen in der Entwicklung von spezifischen Kits. Vor einigen Jahren konnten cCMP (Abbildung 5) und cUMP (auch als nicht-kanonische cNMPs bezeichnet) nun mittels hochsensitiver massenspektrometrischer Methoden nachgewiesen werden [76] und auch erste Funktionen bzw. interagierende Proteine wurden entdeckt [77, 78]. Nach wie vor ist es jedoch schwierig cCMP nachzuweisen. Weiterhin ist nicht klar, ob diese neuartigen zyklischen Nukleotide als „second messenger“ agieren bzw. ob sie, aufgrund der extrem niedrigen Konzentrationen *in vivo*, bei (patho)physiologischen Prozessen eine Rolle spielen. Unter einem „second messenger“ versteht man einen intrazellulären Botenstoff, der ein extrazelluläres Signal von einem „first messenger“ (z. B. ein Neurotransmitter) ins Zytosol weiterträgt. Kriterien für einen solchen Botenstoff sind [70, 79]:

- Bildung durch ein Enzym, das von einem „first messenger“ reguliert wird
- Abbau durch ein definiertes Enzym
- Interaktion mit Effektor-Proteinen
- Relevanz für (patho)physiologische Prozesse
- Membrängängige cNMP-Analoga ahmen die Effekte der zyklischen Nukleotide nach
- Bakterielle Toxine ahmen die cNMP-Effekte nach bzw. verstärken deren Effekte

Im Jahr 1977 wurde von Cech und Ignarro [80] die Existenz einer Cytidylzyklase beschrieben, die cCMP aus CTP generiert. Später wurde entdeckt, dass es sich bei dieser Zykase nur um ein Artefakt handelte [81]. Die Methoden zur eindeutigen Identifizierung des cCMPs waren zu dieser Zeit auch zu unspezifisch. Besonders die angewendete Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie war nicht sensitiv genug [82]. Rund 35 Jahre später konnte gezeigt werden, dass die AC Toxine CyaA (aus *Bordetella pertussis*) und EF (Endema Faktor, aus *Bacillus anthracis*) cCMP produzieren können [83]. Indem die Detektionsmethoden verfeinert wurden, konnte cCMP auch in verschiedenen Zelllinien und Geweben nachgewiesen werden. Hohe Konzentrationen des zyklischen Nukleotids konnten in HEK293 Zellen, Neuroblastom-Zellen, Astrozyten und in einigen Epithelzelllinien detektiert werden [84]. cCMP wird, neuen Ergebnissen zufolge, nicht von einer CC sondern von sAC und sGC generiert [85, 86]. Membranständige Zykassen sind an der Bildung nicht beteiligt [85]. Bisher identifizierte Proteine, die mit cCMP interagieren, sind cAK II α /I α reg [87] und cGKI α [88, 89]. Kommt es zu einer cCMP-vermittelten cGK-Stimulation, resultiert das in einer Vasodilatation und einer Hemmung der Thrombozytenaggregation [89]. Weitere cCMP-Targets sind die HCN-Kanäle 2 und 4 [90], Epac („cAMP-activated guanine exchange factor“) [91] und der MRP5 („multidrug-resistance protein“) [92]. Verglichen mit den etablierten zyklischen Nukleotiden, cAMP und cGMP, aktiviert cCMP diese Targets erst bei höheren Konzentrationen, d. h. die K_a -Werte sind höher. Der Unterschied lässt sich hier u. a.

damit erklären, dass pyrimidine cNMPs kleiner sind und daher weniger H-H-Brücken für die Interaktion mit der Bindungstasche aufweisen. Andererseits können diese nicht-kanonischen cNMPs aufgrund ihrer geringeren Größe leichter in den Bindungstaschen Platz finden [79]. Lange Zeit war unklar, wie und ob cCMP abgebaut wird. Vor kurzem wurde jedoch die PDE7A1 als cCMP-hydrolysierendes Enzym identifiziert. Aus cCMP entsteht hier CMP [93]. Ob nun cCMP auch eine relevante Rolle in (patho)physiologischen Prozessen spielt, ist jedoch weiter unklar. Ervens postulierte 1991 eine mögliche Funktion von cCMP bei der Immunantwort. DB-cCMP soll hier die NADPH-Oxidase katalysierte Bildung der Superoxidanionen in Neutrophilen beeinflussen [94, 95]. Außerdem wurden in murinem Hirn-Gewebe Proteine identifiziert, die spezifisch mit cCMP interagieren [96, 97]. Desweiteren soll cCMP die Spermienmotilität hemmen [98] bzw. das Zellwachstum anregen [77], was eine mögliche Rolle des cCMPs bei der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation bzw. der Apoptose nahe legt.

A.5 Der MAP-Kinase-Signalweg

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) zählen zu den Serin/Threonin-Kinasen und spielen bei zahlreichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Die MAP-Kinase-Signalwege, die mehrstufig sind, sind besonders an der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und generell am Zellwachstum beteiligt. Daher sind die MAPKs besonders in der Tumorforschung von größter Bedeutung. Bei 30 % aller Krebsarten ist der p44/p42 MAPK-Signalweg überexprimiert [99]. Es existieren 14 verschiedene MAPKs, die man in verschiedene Gruppen einteilt. Neben den, durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 (oder auch p44/p42 MAPK genannt), existieren weiterhin die JNK 1/2/3 (c-Jun N-terminale Kinasen), die p38 Isoformen und andere atypische MAPKs. Bei jeder dieser MAPK-Gruppen läuft in der Signalkaskade eine Aktivierung über drei Kinasen ab, die eigentliche MAPK, eine MAPK Kinase (MAPKK) und eine MAPK Kinase Kinase (MAPKKK). MAPKKK (z. B. Raf, Abbildung 6) werden meist zu Beginn der Kaskade durch kleine G-Proteine, wie Ras, aktiviert [100]. Dadurch kann die nachgeschaltete Kinase (MAPKK, z. B. MEK 1/2, JKK 1/2) phosphoryliert werden.

Wachstumsfaktoren (z. B. EGF, PDGF), sogenannte „growth factors“ (GFs), binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und aktivieren diese. Eine solche RTK ist beispielsweise der EGFR („epidermal growth factor receptor“), der durch EGF („epidermal growth factor“) aktiviert werden kann [101]. Es kommt zu einer Rezeptordimerisierung und zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors [100]. An die phosphorylierten Tyrosine des RTKs kann nun das Adapterprotein Grb-2 („growth factor receptor-bound protein 2“) binden, welches mit dem Ras GEF/SOS („Ras Guanine-nucleotide exchange factor/ Son of

sevenless“) Komplex interagiert. Ras ist ein kleines G-Protein, dessen Namen von *Rat sarcoma* abgeleitet ist und ein wichtiges Onkogen ist. Durch diese Interaktion wird das inaktive GDP-bindende Ras aktiviert, indem ein Austausch des GDPs mit GTP erfolgt. Liegt Ras in aktivierter Form vor, kann Raf gebunden werden. Raf ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase. Es existieren drei Raf Isoformen, A-Raf, B-Raf und C-Raf (auch als Raf-1 bezeichnet). Interessanterweise ist bei vielen Krebserkrankungen B-Raf, jedoch nicht die beiden anderen Isoformen, mutiert [99, 102]. In B-Raf-defizienten Zellen wird zudem die ERK-Phosphorylierung vermindert, wodurch B-Raf eine Schlüsselrolle in der Proliferation und der Krebsentstehung einnimmt [103]. Raf kann MEK 1/2 phosphorylieren, was wiederum die p44/p42 MAPK an Tyrosin und Threonin phosphoryliert [104]. ERK 1 und ERK 2 werden in allen Geweben exprimiert, sind aber besonders im Gehirn, Skelettmuskel, Thymus und Herz in hoher Konzentration anzutreffen [105]. Substrate der ERK 1/2 sind z. B. Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, und dem MAPK-Signalweg nachgeschaltete Proteinkinasen, wie MNK (MAPK-interagierende Kinase) oder MSK (Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase) [100], durch die die Proliferation und Differenzierung begünstigt werden. Zusätzlich zum p44/p42 MAPK-Signalweg existiert noch der p38-Signalweg, der hauptsächlich durch Stress (oxidativer Stress, Hypoxie), Zytokine (TNF- α , IL-1) oder bakterielle Toxine (z. B. LPS) aktiviert wird [106]. Somit ist p38 v.a. für die Immunantwort und bei Entzündungsprozessen wichtig, hat jedoch auch auf die Zellproliferation und auf die Apoptose einen Effekt. Der JNK-Signalweg wird, ähnlich dem p38-Signalweg, hauptsächlich als Antwort auf Stress und Zytokine aktiviert [107] und fördert die Proliferation bzw. die Apoptose. MSK-1 und MSK-2 stellen Substrate des p44/p42 MAPK und auch des p38-Signalwegs dar. Beide Kinasen sind ubiquitär exprimiert, sind aber besonders im Gehirn, Herz und Skelettmuskel anzutreffen [108] und regulieren neben zellulären/nukleären Prozessen [109] auch die zelluläre Lokalisation der vorgeschalteten Kinasen [110]. MSK phosphoryliert nach der Aktivierung Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CREB („cAMP response element-binding protein“) (Abbildung 6). Weiterhin aktiviert und phosphoryliert die PKC direkt Raf-1 und somit auch indirekt den p44/p42 MAPK-Signalweg [111]. Nach wie vor ist nicht genau geklärt, wie andere Signalwege (z. B. der cAMP- oder der cGMP-Signalweg) mit dem MAPK-Signalweg interagieren. cAMP kann beispielsweise den Transkriptionsfaktor Elk-1 über die MAPK-Kaskade aktivieren [112]. cAMP greift an die B-Raf-Kinase bzw. interagiert mit dem kleinen G-Protein Rap1 (über Epac), welches von der cAK aktiviert wird. Rap1 wiederum aktiviert die B-Raf und inhibiert die Raf-1 [112, 113]. Somit wirkt cAMP sowohl proliferativ (über B-Raf), als auch antiproliferativ (über Raf-1) [114]. Über das Zusammenspiel MAPK- und cGK-Signalweg ist noch weniger bekannt. Es gilt jedoch als sicher, dass einige NO-Effekte (u. a. Apoptose) über den MAPK-Signalweg vermittelt

werden. Allerdings wird dieses Forschungsgebiet kontrovers diskutiert. NO aktiviert beispielsweise den p38-Signalweg in Neutrophilen und Fibroblasten [115, 116]. Durch einen cGK-Inhibitor konnte diese Aktivierung blockiert werden, was die Vermutung nahe legt, dass cGK essentiell für das Zusammenspiel der beiden Signalwege ist. Andererseits phosphoryliert cGK Raf-1 und hemmt dadurch die MAPK-Aktivierung [117]. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob neben cGMP, auch cCMP einen Effekt auf den MAPK-Signalweg und somit auch die Proliferation hat.

Pharmakologisch wird der MAPK-Signalweg erst seit einigen Jahren genutzt, wobei die Hauptangriffspunkte für Medikamente bzw. für die Forschung Ras, Raf und die MEKs darstellen. Der Tyrosinkinase- und Raf-Kinase-Inhibitor Sorafenib ist seit 2006 als Orphan-Arzneimittel zur Behandlung von fortgeschrittenem Nierenkrebs, Schilddrüsenkrebs und HCC (hepatozelluläres Karzinom) zugelassen. Vielversprechende klinische Studien werden momentan mit p38-Inhibitoren (z. B. Dilmapiomod) zur COPD-Behandlung durchgeführt. Selektive MEK 1/2-Inhibitoren werden bisher, mit Ausnahme des Trametinib [118], nur *in vitro* eingesetzt. In klinischen Studien zeigten diese z. T. eine antikanzerogene Wirkung [119].

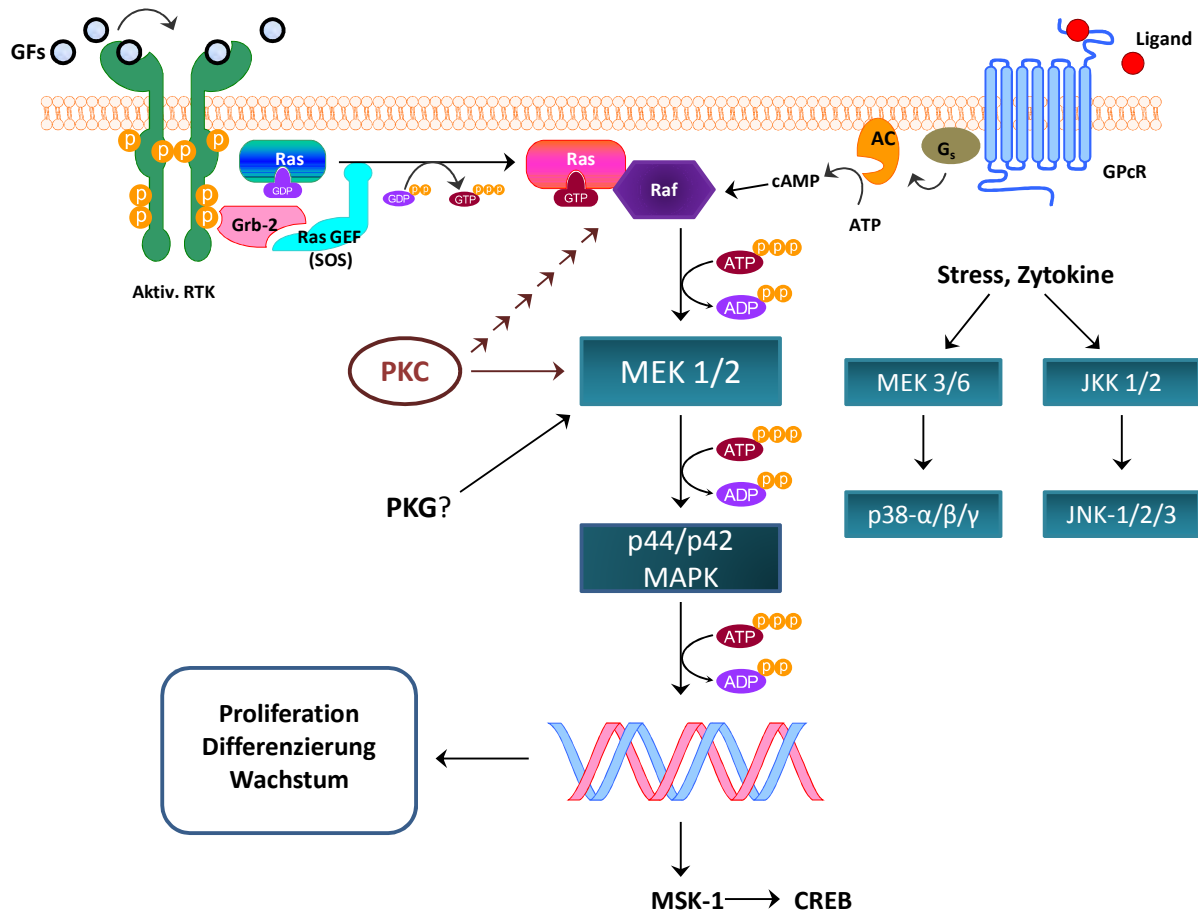


Abbildung 6: Modell des MAPK-Signalwegs. Wachstumsfaktoren (GFs) aktivieren Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), die über Ras/Raf die MAPK stimulieren und somit einen Einfluss auf Proliferation und Zellwachstum haben.

A.6 Sepsis und deren Einfluss auf die cNMP-vermittelten Signalwege

In Deutschland erkranken jedes Jahr rund 150.000 Menschen an einer Sepsis [120], umgangssprachlich auch Blutvergiftung genannt. Definitionsgemäß versteht man darunter ein Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut. Nach wie vor endet diese bei 30-50% aller Patienten, meist aufgrund eines Multiorganversagens, tödlich. Damit stellt die Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland nach Myokardinfarkt und Tumorerkrankungen dar [121]. Bei der Sepsis handelt es sich um eine akute systemische Entzündungsreaktion als Antwort auf eine Infektion mit Bakterien oder anderen körperfremden Stoffen. Im Falle eines funktionierenden Immunsystems kann der Erreger schnell und vollständig eliminiert werden. Ist die Abwehr aber bereits eingeschränkt oder der Keim z. B. zu aggressiv, kann es

zu einem Versagen des Abwehrsystems kommen und im weiteren Verlauf zu einer Sepsis. Der Erreger wird hier über den Blutkreislauf im Körper verbreitet und es kommt zu einer überschießenden Immunantwort und dadurch zu starken systemischen Entzündungen. Trotz intensiver Forschung ist der genaue Ablauf einer Sepsis noch nicht komplett bekannt. Als gesichert gilt bislang, dass zu Beginn einer Blutvergiftung Leukozyten aktiviert werden, die zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (TNF α , IL-1) und Lipidmediatoren (PGs, LTs, PAF, Thromboxan) führen. Zusätzlich kommt es aber auch zu einer antiinflammatorischen Reaktion und Freisetzung von IL-4, IL-10, IL-1, Rezeptorantagonisten und von löslichen TNF α -Rezeptoren. Das Gerinnungssystem wird durch den „tissue factor“ aktiviert und körpereigene Antikoagulantien werden gehemmt. Dadurch entstehen Thrombozytopenien und es entwickeln sich eine gestörte Thrombenbildung oder andere hämorrhagische Störungen [122]. Auch Endothelzellschäden können während einer Sepsis auftreten, wodurch es zu Mikrozirkulationsstörungen und Volumenmangelzuständen kommen kann [123]. Durch Zytokine wird weiterhin die iNOS (induzierbare NO-Synthase) z.B. in Makrophagen stimuliert, wodurch vermehrt NO gebildet wird. NO wirkt in hoher Konzentration toxisch auf die Erreger, vasodilatierend und bewirkt während der Sepsis einen starken Blutdruckabfall [124]. Sinkt der arterielle Blutdruck unter 90mmHg und liegen charakteristische Infektionsmerkmale (z. B. Schwankung der Körpertemperatur) bzw. Organfehlfunktionen vor, so spricht man von einem septischen Schock. Therapeutisch werden hier Antibiotika eingesetzt. Zur Blutdruckstabilisierung wird eine Volumensubstitution präferiert und zusätzlich kann Vasopressin oder Noradrenalin gegeben werden. Forschungen zeigen, dass aber auch durch eine Blockade der NO/sGC Signalkaskade der Blutdruck während einer Sepsis positiv moduliert werden kann [125-127]. So hätten möglicherweise iNOS-Inhibitoren einen hohen therapeutischen Nutzen zur Behandlung des septischen Schocks [126]. Allerdings ist hier die fehlende Selektivität der untersuchten Substanzen ein entscheidender Nachteil, da es beispielsweise bei gleichzeitiger eNOS-Hemmung zu einer starken Vasokonstriktion kommen würde. Der therapeutische Einsatz von Hemmstoffen der iNOS-Expression wurde auch diskutiert, ist jedoch nicht praxisrelevant, da hier eine Gabe schon vor der Infektion erforderlich wäre [128].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sepsis in den Versuchstieren mit *E.coli* Lipopolysaccharid (LPS) induziert. Lipopolysaccharide sind in der äußeren Zellmembran von gramnegativen Zellen (in diesem Fall *E.coli*) enthalten. Gelangen diese in den Blutkreislauf, werden sie an LPS-bindende Proteine (LBP) gebunden und können so an die CD14 Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen andocken. Das Signal wird über „toll-like Rezeptoren“ (TLRs) in die Zelle weitergeleitet, der Rezeptor für LPS ist TLR4 [123]. CD14 und MD2 (Myeloid Differenzierungsprotein) stellen somit „Corezeptoren“ dar. Kommt es zu

einer Aktivierung des TLR, werden wiederum verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt (z. B. der MAPK-Signalweg), wobei u. a. über NF- κ B (ein Transkriptionsfaktor) vermehrt TNF und Interleukine freigesetzt werden. Zusätzlich induziert NF- κ B die iNOS und dadurch die Freisetzung von NO [129] (Abbildung 7). Welche Rolle die zyklischen Nukleotide (z. B. auch cCMP) genau bei der Sepsis spielen, ist aber immer noch unklar.

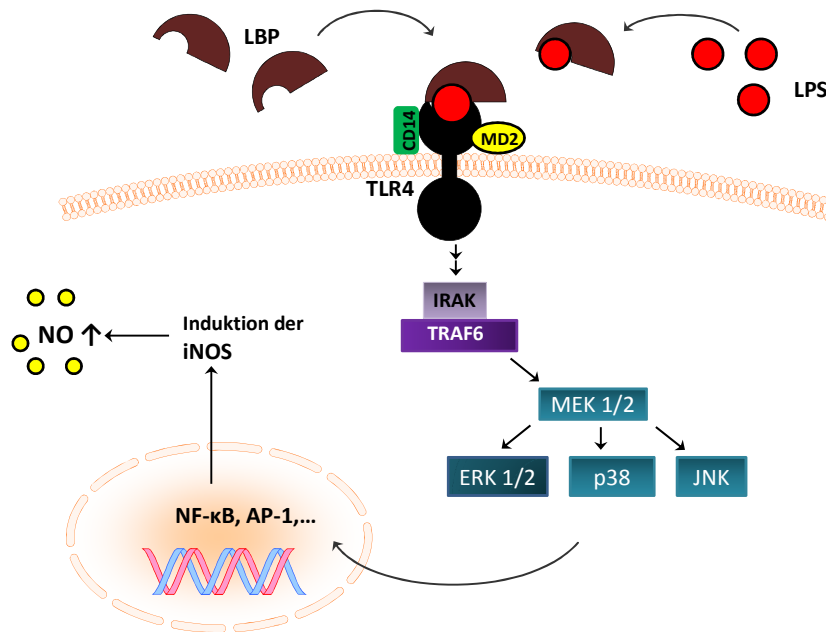


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Toll-like Rezeptor (TLR4)-Signalwegs. LPS interagiert mit dem LPS-Bindeprotein (LBP) und bindet an den TLR4. CD14 und MD2 (Myeloid Differenzierungsprotein) stellen „Co-Rezeptoren“ des TLR4 dar. Über IRAK (Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase) und das TRAF6 Protein wird der MAPK Signalweg aktiviert, worauf Zytokine und Transkriptionsfaktoren gebildet werden (z. B. NF- κ B). Diese induzieren die iNOS und bewirken eine vermehrte NO-Freisetzung.

A.7 Ziele dieser Arbeit

1971 schrieb Earl Sutherland in seiner Nobelpreisrede zum Thema cAMP und cGMP folgendes: „Then (cAMP implizierend) we had a function, and found a nucleotide; now (cGMP implizierend) we have a nucleotide, and are trying to discover its function“ [130]. Mit diesem Ausspruch lässt sich das Ziel der vorliegenden Arbeit gut beschreiben - mit der einzigen Ausnahme, dass nicht cGMP, sondern cCMP näher erforscht werden soll. Das Feld der pyrimidinen zyklischen Nucleotide ist ein relativ junges Forschungsthema und so wurde in den letzten Jahren vermehrt versucht, Methoden zum Nachweis von cCMP bzw. von Interaktionspartnern zu entwickeln. cGMP und cAMP sind etablierte „second messenger“ und spielen bei vielen (patho)physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Die entsprechenden Signalwege können heutzutage von zahlreichen Arzneistoffen moduliert werden. Anwendungsgebiete sind hier z. B. die pulmonale arterielle Hypertonie, erektile Dysfunktion oder Angina pectoris. Vor einiger Zeit konnte nun die Existenz von cCMP durch sensitivere Methoden verifiziert werden. Daher lag es nahe, auch andere zyklische Nucleotide, wie cCMP, auf ihre „second messenger“ Funktion zu untersuchen. Hierzu sollen zuerst cCMP-bindende Proteine identifiziert werden und untersucht werden, ob sich diese mit cCMP stimulieren lassen. Auch eine mögliche (patho)physiologische Bedeutung des cCMP soll anhand einer mit LPS-induzierten Sepsis analysiert werden.

B. Material und Methoden

B.1 Materialien

B.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
β-Zähler	TriCarb 2800TR Liquid Scintillation Analyser™, Perkin Elmer, Rodgau, D
Absaugapparatur	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, D
Absaugpumpe	ECOM-P 4153, Eppendorf, Hamburg, D
Autoklav	Varioklav H+P, Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
Blotting-Apparatur	Semi-Dry-Elektroblotter, VWR International, Darmstadt, D
Chirurgische Instrumente	FST, Bad Oeynhausen, D
Eismaschine	AF100, Scotsman, Mailand, IT
Elektrophoresekammern	Mini Protean Tetracell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D Casting System Compact Biometra, Biometra, Göttingen, D
Geltrockner/Heizplatte	Gel Dryer GD4534, Scie-Plas Ltd., Cambridge, UK
Heizblock	Digital Heatblock V1, VWR International, Darmstadt, D
HPLC-System	UltiMate® 3000 Nano, Dionex GmbH, Idstein, D Detektor: QTOF MS, QStar XL, Applied Biosystems, Darmstadt, D
Imaging-System	ChemiDoc MP System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Inkubatoren	Excella E24, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, D/FMI, Seeheim, D
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD, Zeiss, Jena, D
Kamera	Polaroid GelCam, Polaroid GmbH, Offenbach, D
Kontaminationsmonitor	Berthold LB122, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, D Mini-Monitor Series 900, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, D
Kreisschüttler	IKA®KS 260 Basic, IKA Werke, Staufen, D Rotamax 120, Heidolph Instruments, Schwabach, D

	Thermomixer compact und comfort, Eppendorf, Hamburg, D Überkopfschüttler M2000, Sarstedt, Nümbrecht, D
Leuchtplatte	Slimlite LED, Kaiser Fototechnik GmbH.&.Co. KG, Buchen, D
Magnetrührer	Heidolph MR 3000, Heidolph Instruments, Schwabach, D
Mikrowelle	Micromaxx, Medion, Essen, D
Multipette	Multipette plus, Eppendorf, Hamburg, D
Peristaltikpumpe	ISM843C, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim, D
PCR-Thermocycler	Biometra T1 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, D
pH-Meter	pH 526, WTW, Weilheim, D
Photometer (zur Proteinkonzentrationsbestimmung)	Biophotometer plus, Eppendorf, Hamburg, D Qubit [®] System 2.0, Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, D Tecan Sunrise Microplate Reader, Crailsheim, D
Pipetten	Rainin Pipet Lite Classic, Mettler-Toledo, Gießen, D
Stereo-Mikroskope	Stemi DV-4 Spot, Zeiss, Jena, D
Sterilbank	Safeflow 1.2, BioAir, Nunc GmbH, Langenselbold, D
Stromquellen	Electrophoresis Power Supply-EPS 1001, Amersham Pharmacia Biotech, Wien, AUT Power Pac 200, BioRad, München, D
Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen, D
UV-Beleuchtungen	TI1BDA Digital, Biometra GmbH, Göttingen, D UV-Transilluminator, Ultra Violet Products, Cambridge, UK
Vortexer	Reax-Mixer 2000, Heidolph Instruments, Schwabach, D VWR International, Darmstadt, D
Waagen	Sartorius BP 211D (Analysenwaage), Sartorius, Göttingen, D Sartorius Extend (Feinwaage), Sartorius, Göttingen, D
Wärmesystem für chirurgische Eingriffe	T/Pump, Gaymar Industries Inc., New York, USA TP22G T/PAD [®] , Gaymar Industries Inc., New York, USA
Wasseraufbereitung	Arium [®] basic, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
Wasserbad	VWR Mod 1112A, VWR International, Darmstadt, D

Zählkammer für Zellen	Neubauer Zählkammer, Superior, Marienfeld, D
Zentrifugen	Centrifuge 5424, 5417R und 5415D, Eppendorf, Hamburg, D Jouan GR4i Centrifuge, Thermo Scientific, Karlsruhe, D Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D Sorvall Super T21, Thermo Scientific, Karlsruhe, D Tischzentrifuge Centrifuge&Vortex, Neolab, Heidelberg, D Tischzentrifuge, Sarstedt, Nümbrecht, D

Tabelle 1: Verwendete Geräte

B.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezeichnung/Hersteller
120-Well Platte	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Combitips	Combitips plus 1.0ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalhandschuhe, Latex	Rotiprotect, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Falcon-Tubes	15ml/50ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterpapier	GB001 Gel blotting Papier, Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Heparinisierte Kapillaren (retrobulbäre Blutabnahme)	Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, Na-hep, Brand GmbH, Wertheim, D
Insulinspritzen	U40 BD Micro-Fine +, BD, Heidelberg, D
Kanülen	0.4 x 19mm, BD, Heidelberg, D 0.7 x 30mm, BD, Heidelberg, D 0.9 x 40mm, BD, Heidelberg, D
Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Nistmaterial	Nestlets, Esicon, Forstinning, D
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Transferpipette 3.5ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Phosphocellulosepapier	P81, Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Pipettenspitzen	10µl/200µl/1000µl, Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Qubit [®] Assay Tubes 500µl	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

Reagiergefäße	1.5ml/2.0ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Silkpflaster	3M Durapore, 3M Deutschland GmbH, Neuss, D
Spritzen	1/2/5ml, BD, Heidelberg, D
Szintillationsgefäße	20ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Ultrafiltrationsgefäße	Vivaspin 20, MWCO 30000, Sartorius, Göttingen, D
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flask 25 und 75, Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber	BD Falcon cell scraper, BD Biosciences Europe, B

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

B.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe und Kits

Produkt	Hersteller
2'-AHC-cCMP-Agarose	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
3',5'-cAMP (cAMP)	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
3',5'-cCMP (cCMP)	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
3',5'-cGMP (cGMP)	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
4-AH-cCMP-Agarose	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
6-Aminohexansäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
8-AEA-cAMP-Agarose	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
8-AET-cGMP-Agarose	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
8-pCPT-cGMP	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
N ⁴ , 2'-O-Dibutyryl-cCMP (DB-cCMP)	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
SP-5,6-DCI-cBIMPS	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid/Bisacrylamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Agarose	Saekem LE, Biozym, Oldendorf, D
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, D
APS	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
ATP [γ - ³² P] 500 μ Ci	Perkin-Elmer, Rodgau, D
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Bio-Rad Dc Protein Assay Kit (Lowry)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Bio-Rad Protein Assay Konzentrat (Bradford)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Brilliant Blue G (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Brilliant Blue R (Coomassie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
cAK-Inhibitor AS ₅₋₂₄	Calbiochem/Merck, Darmstadt, D
DNA-Größenstandard	Gene Ruler, 100bp, Fermentas, St. Leon-Rot, D Gene Ruler, 1kb, Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA-Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
ECL Detection Kit	Amersham, München, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
EGTA	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
EtOH-NH-Agarose	Biolog Life Science Institute, Bremen, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Gentamicin-Sulfat	Bio Whittaker®, Lonza, Köln, D
Glycerol, 87%	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff (Urea)	Merck, Darmstadt, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Natrium, 25.000	Ratiopharm, Ulm, D
IBMX	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
IRAGtide	Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim a. Rhein, D / Panatecs, Heilbronn, D
Isofluran	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D

KCL	Merck, Darmstadt, D
KEMPTide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
LPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lubrol (Nonaethyleneglycol monododecyl ether)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Luminolreagenzien (1+2)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg, D
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
MES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
NaCl	VWR International, Darmstadt, D
NaCl, 0.9%	Braun, Melsungen, D
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaN ₃	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
ODQ	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ortho-Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt, D
PhosStop	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
PKC-Inhibitor myr-psi PKC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein-Größenmarker	Page Ruler Plus Prestained und Unstained Standard, Thermo Scientific, Rockford, USA
ProteoSilver Stain Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Qubit [®] Protein Assay Kit	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
SDS	Merck, Darmstadt, D

Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint®)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris	USB Corporation, Cleveland, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
VASPtide	Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim a. Rhein, D / Panatecs, Heilbronn, D

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Arzneistoffe und Kits

B.1.4 Antikörper

Antikörper	Art	Tier	Verdünnung (WB)	Herkunft
cAK Iα/Iβ reg	primär	rabbit, polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
cGKIc	primär	rabbit, polyklonal	1:200	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKIα	primär	rabbit, polyklonal	1:80	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKIβ	primär	rabbit, polyklonal	1:1000	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKII	primär	rabbit, polyklonal	1:1000	Prof. Dr. Peter Ruth, Tübingen, D
Beta-Aktin	primär	rabbit, polyklonal	1:2500	Abcam, Cambridge, UK
p44/42 MAPK	primär	rabbit, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
P-p44/42 MAPK	primär	rabbit, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
P-VASP	primär	mouse, monoklonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Mouse IgG HRP-conjugated	sekundär	goat, polyklonal	1:10000	Dianova GmbH, Hamburg, D
Rabbit IgG HRP-conjugated	sekundär	goat, polyklonal	1:50000	Dianova GmbH, Hamburg, D

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

B.1.5 Software

Für diese Arbeit wurde neben Windows-Programmen und Microsoft Office, sofern nicht anders angegeben, mit folgender Software gearbeitet:

Software	Hersteller	Verwendung
Biomedical PPT-Toolkit-Suite	Motifolio, Maryland, USA	Abbildungen in der Arbeit (PowerPoint Vorlagen)
ChemDraw	Cambridgesoft/Perkin Elmer, Rodgau, D	Zeichnen von Strukturformeln
DNAMAN 6.0	Lynnon Biosoft, Kalifornien, USA	Sequenzanalyse
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, Kalifornien, USA	Graphische Auswertung, Signifikanzanalysen
IdentiLab 1.0	Brady, Egelsbach, D	Etikettiersoftware
Image Lab	Bio-Rad, München, D	Densitometrie; Western Blot und Gel Analyse
Magellan 5	Tecan, Crailsheim, D	Bestimmung der Absorption (Zellaufschluss)
QuantaSmart 2.02	Perkin Elmer, Rodgau, D	Auswertung der Phosphotransferase-Assays

Tabelle 5: Verwendete Software

B.1.6 Datenbanken

Literatur	Pubmed des NCBI, US
Sequenzen	Gene- und Protein-Datenbank des NCBI, US Ensembl des EMBL-EBI, UK

Tabelle 6: Verwendete Datenbanken

B.2 Methoden

B.2.1 Versuchstiere

Alle verwendeten Versuchstiere wurden unter dem genetischen Hintergrund 129/Sv generiert und stammten aus dem Zentralen Tierlaboratorium (ZTL) der Universität Regensburg. Zucht und Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Licht-Dunkel-Rhythmus (12 h Rhythmus) und *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter (Pellets mit 0.24% Natrium-Gehalt, Ssniff, Soest, D). Autoklavierte Späne und „Nestlets“ dienten als Einstreu bzw. Nistmaterial. Maximal 5 erwachsene Tiere wurden in Makrolon Typ II Käfigen und maximal 12 adulte Tiere in Makrolon Typ III Käfigen geschlechtergetrennt gehalten. Zur Zucht wurden jeweils 2 Weibchen im paarungsfähigen Alter (12-30 Wochen) und 1 zuchtfähiges Männchen (mindestens 8 Wochen alt) via Heterozygoten-Kreuzung miteinander verpaart, wobei die F₁-Generation hierbei aus 25% Kontrolltieren (Wildtyp-Mäuse), 50% Heterozygoten und 25% genetisch veränderten Versuchstieren (KO-Mäuse) bestand. Die Charakterisierung der Genotypen erfolgte kurz nach der Geburt anhand PCR aus Schwanz- bzw. Pfotenbiopsien. Einen Rückschluss auf den Genotyp erlaubte bei einigen Linien jedoch auch der Phänotyp. Nach maximal 4 Wochen wurden die Nachkommen von der Mutter getrennt und geschlechter- bzw. genotypengerecht auf verschiedene Käfige aufgeteilt. Für Versuche wurden beide Geschlechter verwendet, wobei darauf geachtet wurde, dass WT- und KO-Tiere idealerweise aus derselben Verpaarung stammten („litter-matched controls“) bzw. altersgleich waren. Versuchstiere wiesen ein Mindestalter von 8 Wochen auf, mit Ausnahme der cGKI-KO-Mäuse, die aufgrund der geringen Überlebensrate adulter Tiere bereits ab 4 Wochen für Versuche eingesetzt wurden. Es wurden sowohl Tiere aus der konventionellen Haltung, als auch aus der Barrierehaltung (SPF) verwendet. Für Experimente wurden folgende Mauslinien eingesetzt:

- cGKI^{-/-} Linie (ubiquitäres Fehlen von cGKI α und cGKI β)
- cGKII^{-/-} Linie (ubiquitäres Fehlen von cGKII)

Die Generierung und Charakterisierung der cGKII^{-/-} bzw. cGKI^{-/-} Tiere wurde bereits beschrieben [61, 67].

Alle Experimente wurden auf deutsche Tierschutzbestimmungen/FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) abgestimmt und von der lokalen zuständigen Behörde (Regierung der Oberpfalz) genehmigt. Anästhesie-pflichtige Versuche wurden unter Betäubung der Tiere (2% Isofluran in Sauerstoff) durchgeführt.

B.2.2 Molekularbiologische Methoden

B.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase chain reaction) herangezogen. Hierbei wird DNA *in vitro* durch eine DNA-Polymerase in einer zyklisch ablaufenden Kettenreaktion exponentiell vervielfältigt. Folgende Komponenten wurden für eine korrekt ablaufende PCR benötigt:

- DNA-Vorlage („Template“, Matrize), welche vervielfältigt werden sollte
- Hitzestabile DNA-Polymerase (für die Amplifikation zuständig)
- 2 gegenläufige Oligonukleotid-Primer (reverse „r“ und forward „f“), die den Startpunkt der DNA-Synthese festlegten und somit die zu vervielfältigende DNA-Sequenz begrenzten
- Nukleinsäurengemisch „dNTPs“, welches die Bausteine für die neu synthetisierte DNA stellte
- Mg^{2+} -Ionen (meist $MgCl_2$) waren essentiell für die Polymerase Funktion

Die eigentliche Reaktion fand in einem Thermocycler statt, welcher die Proben in 20-40 Zyklen, à drei Reaktionsschritte, erhitze und kühlte. Zuerst erfolgte ein initialer Denaturierungsschritt (94°C) bei dem die Ausgangs-DNA in 2 Einzelstränge getrennt wurden. Es schloß sich ein Primerhybridisierungsschritt (50-68°C, Primer-spezifisch) und ein Elongationsschritt (68-72°C, Polymerase-spezifisch) an, bei dem die Primer verlängert wurden. Pro Zyklus erhielt man somit die doppelte Menge an eingesetzter DNA. Primer wurden bei MWG Biotech, Ebersberg und Entelechon in Regensburg synthetisiert. Die dNTP Lösungen wurden von Fermentas bezogen. Der Mg^{2+} -freie Puffer (Thermophilic DNA Polymerase 10 x Puffer) stammte von Promega. Ein Protokoll zur Durchführung der PCR und eine Tabelle mit sämtlichen verwendeten Primern (inkl. deren Konzentration im PCR-Ansatz) befinden sich im Anhang.

B.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung einer gelungenen PCR und zur Größenbestimmung der Fragmente wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wird zunächst ein Agarosegel mit einer 2%igen Gelkonzentration hergestellt. Je höher die Agarosekonzentration desto kleiner sind die Gelporen und desto langsamer diffundieren größere Moleküle durchs Gel. Durch Anlegen von Spannung kann die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zum Pluspol wandern. Moleküle werden nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei das Bandenmuster anschließend durch Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht wird.

Der Farbstoff interkaliert in DNA, wodurch die Fluoreszenz-Emission der Moleküle bei Anregung steigt und Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar werden. Ein Protokoll zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese befindet sich im Anhang.

B.2.3 Tierexperimente und physiologische Versuche

B.2.3.1 Gewinnung von Urinproben

Zur Untersuchung von cNMP-Konzentrationen wurde über einen Zeitraum von 24h der Urin von Versuchstieren gesammelt. Die Tiere befanden sich während des gesamten Experiments in Einzelhaltung in Plastikboxen ohne Einstreu mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Die Tiere wurden einen Tag vor Versuchsbeginn bereits an die neuen Umgebungsbedingungen gewöhnt, um Stress-induzierte Schwankungen der Ergebnisse zu minimieren. Im Anschluss an die Eingewöhnung wurde über 24h der Urin von behandelten Versuchstieren und nicht-behandelten Kontrolltieren gesammelt. Hierzu wurde jeweils der Urin zu Versuchsbeginn und von 0-1h, 1-3h, 3-5h und von 5-10h gesammelt und gepoolt (Proben 0, 1, 3, 5, 10). Der 24h Wert (Probe 24) wurde am nächsten Tag gesammelt. Zusätzlich zu basalen Experimenten wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen den Versuchstieren i. p. 10mg/kg KG *E.coli* LPS gespritzt wurde, um einen septischen Schock zu induzieren. Zusätzlich wurde noch mit einem sGC-Inhibitor (ODQ) gearbeitet. 1h vor LPS-Injektion wurde den Versuchstieren 20 mg/kg KG ODQ i. p. gespritzt. Dies soll zeigen, ob cCMP über die sGC synthetisiert wird. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Weiterführende Analysen erfolgten an der ZFA Metabolomics der Medizinischen Hochschule Hannover unter Verwendung der LC-MS/MS- Methodik.

B.2.3.2 Gewinnung von Serumproben

Zur Bestimmung der cNMP-Konzentrationen in Versuchstieren wurde zusätzlich zu den Urinproben auch Serum gesammelt. Hierzu wurden die Mäuse zuerst mit Isofluran anästhesiert und mit einer Heparin-beschichteten Kapillare (Innen-Ø: 1.15±0.05mm) wurde aus dem retrobulbären Plexus Blut abgenommen und in ein Reagiergefäß überführt. Im Anschluss an eine 30 minütige Lagerung auf Eis wurden die Proben bei 4°C zentrifugiert (5min, 4000 x g). Zelluläre Bestandteile lagern sich aufgrund des höheren Gewichts am Gefäßboden ab. Das Serum kann als Überstand abpipettiert werden. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

B.2.3.3 Isolierung von Lunge, Jejunum, Niere und Hirn

Versuchstiere wurden durch transzervikale Dislokation getötet, mit Silkpflaster oder Kanülen fixiert und das Abdomen bzw. der Thorax wurde geöffnet. Der Darm wurde herausgenommen, das Jejunum von den übrigen Darmabschnitten abgetrennt und in eine, mit eiskaltem PBS-Puffer gefüllte Petrischale überführt. Reste von geronnenem Blut und Faecesreste, die sich noch im Darm befanden, wurden durch „Ausstreichen“ (mit Pinzetten) und Spülen (2ml Spritze mit aufgesetzter 200µl Pipettenspitze) entfernt. Fett- und Bindegewebe wurde vorsichtig mit einer Pinzette abgezupft. Beide Nieren und die Lungenflügel wurden herauspräpariert und von anhaftendem Gewebe befreit. Zur Gewinnung von Hirngewebe wurde die Schädeldecke der Maus mit einer Schere vorsichtig aufgeschnitten und mit einer Pinzette das Gewebe vorsichtig aus dem Schädel geholt. Erfolgte keine sofortige Weiterverarbeitung, wurde das Gewebe bei -80°C eingefroren.

PBS-Puffer pH 7.4	(in g)
NaCl	7.89
KCl	0.22
Na ₂ HPO ₄	2.87
KH ₂ PO ₄	0.27
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

B.2.3.4 Retrograde Perfusion von Versuchstieren

Für einige Versuche war es notwendig, die Organe von Blutzellen und anderen Bestandteilen zu befreien. Dazu wurden die Tiere mittels Inhalationsanästhesie betäubt und auf einer Wärmematte mit Silkpflaster fixiert. Anschließend wurde das Abdomen mit einer chirurgischen Schere geöffnet und die Bauchaorta freipräpariert. Diese wurde unterhalb zu den Abgängen der *Arteriae renalis* abgeklemmt und distal der Klemme mit der Augenschere angeritzt. In das so entstandene Loch konnte ein Perfusionskatheter retrograd eingeführt und mit einer zweiten feineren Klemme fixiert werden. Nun wurde die erste Klemme entfernt und die *Vena cava* mit einem Schnitt geöffnet, sodass die Perfusionsflüssigkeit abfließen konnte. Zum Spülen wurden ca. 15ml isotone NaCl-Lösung, versetzt mit 10 I.E./ml Heparin, verwendet. Die Flussrate betrug 15ml/min. Die Organe wurden unmittelbar danach entnommen, in eine Petrischale mit eiskalter PBS-Lösung überführt, gesäubert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

B.2.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

B.2.4.1 Gewinnung von Protein aus Mausgeweben

Nach transzervikaler Dislokation der Versuchstiere wurden die gewünschten Organe bzw. Gewebe entnommen, in eine Petrischale mit eiskaltem PBS-Puffer überführt, gesäubert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Proteolyse möglichst zu unterbinden. Nun wurde das gefrorene Gewebe zunächst mechanisch zerkleinert. Hierfür wurde ein selbstgebauter Metallhomogenisator mit Pistill verwendet, der mit Flüssig-Stickstoff vorgekühlt wurde. Das zerkleinerte Gewebepellet wurde anschließend in ein Röhrchen überführt und mit jeweils 3-4ml je 1g Organgewicht Aufschlusspuffer versetzt. Als Puffer diente hier meist 2 x Lubrolpuffer, versetzt mit Proteaseinhibitoren und PhosStop. In Einzelfällen wurde statt des Lubrolpuffers auf Extraktionspuffer zurückgegriffen, da Lubrol als Detergens in vielen weiterführenden Experimenten (wie z. B. Proteinbestimmungen) störte und die Ergebnisse verfälschte. Die Proben wurden mit einem Ultra-Turrax homogenisiert (3 x 15s auf Eis, dazwischen ca. 20s Pause) und daraufhin für 10min bei 4°C und 18000 x g zentrifugiert. Nicht homogenisierte Zellen und „Zellschrott“ lagerten sich am Boden des Gefäßes ab; der Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und auf Eis gelagert. Direkt im Anschluss erfolgten meist eine Proteinbestimmung, sowie weitere Analysen der Lysate (SDS-PAGE, Fällungen,...).

Lubrol-Puffer 2% (für den Gewebeaufschluss)	pH 8.0
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
Lubrol (Nonaethylenglycol-Monododecyl-Ether)	2%

Extraktionspuffer (ohne Detergens)	pH 8.0
Tris-HCl	20 mM
NaCl	100 mM

Proteaseinhibitoren (PI)	Stammlösung	Endkonzentration
Benzamidin	100mM ^{1,3}	1mM
Leupeptin	1mg/ml ^{2,4}	0.5µl/ml
PMSF	200mM ^{2,4}	300µM

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

Tabelle 7: Verwendete Proteaseinhibitoren (Aufschluss)

B.2.4.2 Proteinbestimmung mittels Qubit

Um Proteine schnell, einfach und genau zu bestimmen, wurde mit dem Qubit Fluorometer gearbeitet. Hierzu wurde das Gerät zuerst mit BSA in unterschiedlichen Konzentrationen kalibriert und eine Standardgerade erstellt. Anschließend wurden die Proben mit Qubit Working Solution (bestehend aus Fluoreszenzfarbstoff und Protein Puffer, Qubit Protein Assay Kit) gemäß Herstellervorschrift verdünnt. Um im Bereich der Konzentrationen der BSA-Standard-Gerade zu liegen, war es z. T. nötig die Proteinproben vorzuverdünnen. Nach einer Inkubationsdauer von 15min bei Raumtemperatur wurden die Proben gevortext und im Anschluss direkt im Fluorometer vermessen, wobei die Konzentration direkt abgelesen werden konnte. Leider ist das Qubit-Photometer empfindlich gegenüber Detergenzien, wie Lubrol oder SDS, sodass für die Proteinbestimmung einiger Proben weiterhin die etablierten Methoden nach Lowry und Bradford angewandt wurden.

B.2.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Dieses Verfahren zur Proteinbestimmung hat den entscheidenden Vorteil, dass es gegenüber größeren Mengen an Detergenz (z. B. Lubrol, SDS) weitestgehend unempfindlich ist. Das Verfahren wurde von Oliver Lowry 1951 entwickelt [131] und beruht auf zwei Reaktionen. Zuerst erfolgt während einer Biuret-Reaktion die Bildung eines blau-violetten Cu^{2+} -Protein-Komplexes in alkalischem Milieu; im Anschluss wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, welches wiederum den gelben Folin-Ciocalteau-Phenol-Farbstoff (Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure) zu Molybdänblau reduziert. Der entstandene blaue Farbstoff kann nun photometrisch bei 500-800 nm auf einer 120-Well Platte unter Zuhilfenahme der Magellan Software ausgewertet werden. Es wurde das Bio-Rad Dc Protein Assay Kit verwendet. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, musste vorher eine Kalibriergerade mit BSA erstellt werden. Es wurden jeweils 20 μl Probe (in einer passenden Verdünnung), BSA-Standard (Verdünnungsreihe: 0.125/0.25/0.5/0.75/1/1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA + $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Blank-Wert) mit 100 μl Reagenz A` (A`:20 μl Reagenz S + 1ml Reagenz A) und 800 μl Lösung B versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion vermessen. Dieses Verfahren wurde hauptsächlich zur Proteinbestimmung von Gewebelysaten eingesetzt, die mit Lubrol-Puffer aufgeschlossen wurden.

B.2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die dem Verfahren zugrunde liegende Reaktion läuft, im Gegensatz zur Lowry Methode, im sauren Milieu ab. Hier können Anionen des Coomassie Brilliant Blue G-250 Farbstoffes an positiv geladene Protein-Aminogruppen binden, wodurch es zur Bildung eines blauen

Farbstoffes und zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm auf 595nm kommt [132] [132]. Hierbei muss wieder eine Standardreihe mit verschiedenen BSA-Verdünnungen (10/20/40/60/80/100µg/ml BSA + H₂O_{bidest}) angefertigt werden, um anschließend Rückschlüsse auf die gesuchte Proteinkonzentration ziehen zu können. Zur Bestimmung wurden jeweils 100µl Proteinlösung, BSA-Standard oder H₂O_{bidest} (Blank-Wert) mit 1000µl Bradfordkonzentrat gemischt und 5 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte bei 595nm an einem eppendorf Biophotometer. Da dieses Verfahren zwar sehr sensitiv, aber auch störanfällig ist (störende Substanzen sind Detergenzien, Denaturierungsmittel und Reduktionsmittel), wurde hiermit hauptsächlich die Proteinbestimmung von aufgereinigten Enzymen durchgeführt.

B.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem von Ulrich Laemmli entwickelten Verfahren handelt es sich um eine analytische Methode zur Trennung von Proteingemischen nach ihrer Größe [133]. Proteine mit Molekülmassen zwischen 5kDa und 250kDa können mit diesem diskontinuierlichen, elektrophoretischen System erfasst werden. Als Trennmatrix dient ein Polyacrylamidgel, bestehend aus 2 Schichten. Das Sammelgel befindet sich über dem Trenngel und weist einen neutralen pH auf. Es dient hauptsächlich der Aufkonzentrierung und dem Sammeln der Proteinproben. Im Trenngel findet dann die eigentliche Auftrennung der Proben nach Größe statt. Es herrscht ein basischer pH und die Porengröße ist engmaschiger. Durch Änderung des Vernetzungsgrades von Acrylamid (AA) mit Bisacrylamid (BA) lassen sich hier sehr gut die Trenneigenschaften variieren. Größere bzw. längere Proteinketten werden im Trenngel zurückgehalten, wohingegen kleinere Proteine leichter durch die Maschen des Gitters wandern können und deshalb nach dem Trennungsvorgang näher am Pluspol (Anode) zu finden sind. Zusätzlich wird SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Detergens, im Überschuss zugegeben, um die Eigenladung der Proteine zu maskieren und eine negative Ladung der Proteine zu erzeugen, sodass es zu einer Wanderung im elektrischen Feld kommt. Zusammen mit der Hitzedenaturierung der Proteinproben sorgt SDS auch für eine Linearisierung der Proteinketten: H-H-Brückenbindungen werden gespalten, wodurch die Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört wird. Das in den Gelen enthaltene APS dient als Radikalstarter, TEMED wird als Polymerisierungskatalysator eingesetzt. Zu Beginn einer jeden SDS-Page wurden 11.5% Trenn- und 5% Sammelgele frisch hergestellt. Hierzu wurde zuerst das Trenngel bis ca. 2cm unter den oberen Rand in spezielle Gießvorrichtungen gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Der Isopropanol sorgte hier für eine Glättung der Gelkante und schirmte das Gel vor Luftsauerstoff ab. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels (ca. 1.5h) wurde der Isopropanol abgesaugt und Sammelgel bis zum oberen

Rand aufgefüllt. Sofort im Anschluss wurde ein Kamm zur Erzeugung von Taschen eingeführt und die Gele bis zur vollständigen Aushärtung und weiteren Verwendung in den Gießvorrichtungen belassen. Zwischenzeitlich wurden die Proteinproben (ca. 50 bis 100µg aus Gewebelysaten, ca. 1 bis 100ng aufgereinigte Enzyme) mit 2fach Laemmli-Puffer versetzt und 3min bei 95°C denaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene DTT dient als Reduktionsmittel und spaltet Disulfidbrücken. Glycerol bewirkte ein besseres Einsinken in die Geltaschen. Die Gele wurden aus den Gießvorrichtungen entnommen, von den Kämmen befreit und in die Mini-Protean-System Kammern der Firma Bio-Rad eingespannt. In die Taschen wurden nun entweder Proteinstandard (prestained oder unstained Standard, je 7µl) oder Proben (zwischen 15µl und 20µl) eingefüllt, die Kammer mit 1 x Running Buffer gefüllt und anschließend Spannung angelegt (150 Volt, ca. 1h). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele entweder auf eine PVDF-Membran transferiert (Western-Blot, B.2.4.8), mit Coomassie eingefärbt (Coomassie-Färbung, B.2.4.6) oder mit dem ProteoSilver Stain Kit behandelt (Silber-Färbung, B.2.4.7). Für sämtliche Färbungen wurde immer der unstained Standard verwendet; für Western Blot Versuche wurde der prestained Standard genutzt.

4 x Laemmli-Puffer	pH 6.8		10 x Running Buffer	pH 8.3	
Tris-HCl	240	mM	Tris-HCl	250	mM
DTT	200	mM	Glycin	1.92	M
SDS	8%	(w/v)		1%	(w/v)
Glycerol	40%	(w/v)			
Bromphenolblau	0.004%	(w/v)			

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (für 4 Gele):

11.5% Trenngel	pH 8.8		5% Sammelgel	pH 6.8	
1.8M Tris-HCl	3.6	ml	0.6M Tris-HCl	0.5	ml
AA 30% / BA 0.2%	6.5	ml	AA 30% / BA 0.2%	0.83	ml
SDS 10%	167	µl	SDS 10%	50	µl
APS 10%	200	µl	APS 10%	50	µl
TEMED	20	µl	TEMED	10	µl
H ₂ O _{bidest}	6.5	ml	H ₂ O _{bidest}	3.6	ml

B.2.4.6 Coomassie-Färbung

Zur genaueren Charakterisierung der mit der SDS-Page (B.2.4.5) aufgetrennten Proben kann man Proteine unspezifisch mit Coomassie-Brilliant-Blue anfärben. Die Blaufärbung der Proteine resultiert aus einer Anlagerung des Farbstoffes an die basischen Seitenketten von Aminosäuren. Für die Färbelösung wurde sowohl R-250 (geringere Nachweisgrenze) als

auch G-250 (schnelleres Anfärben) verwendet. Hierzu wurde die SDS-Page ca. 30 min bei ständigem Schwenken in Coomassie-Färbelösung (1:1 Mischung aus R-250 und G-250) eingelegt. Anschließend wurde mit einem Entfärber, der alle 15min gewechselt wurde, die Hintergrundfärbung gewaschen. Dieses Verfahren konnte durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle beschleunigt werden. Die Gele wurden bis zur genaueren Analyse eingeschweißt und im Kühlschrank gelagert.

Coomassie Färbelösung R-250

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

Coomassie Färbelösung G-250

Coomassie Blau G-250	0.66 g
Methanol	340 ml
Phosphorsäure	23.5 ml
Ammoniumsulfat	170 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

Entfärber

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

B.2.4.7 Silber-Färbung

Diese Färbung basiert auf der Entwicklung von Fotografien und beruht auf einem Verfahren, das 1973 von Kerenyi und Gallyas [134] publiziert wurde. Es wurde mit dem ProteoSilver Stain Kit von Sigma-Aldrich gearbeitet. Im Vergleich zur Coomassie-Färbung (Nachweisgrenze bei 10ng [135]) ist die Silber-Färbung sensitiver. Die Nachweisgrenze liegt bei weniger als 1ng Protein pro Bande [135]; allerdings ist sie auch schlechter reproduzierbar und störanfälliger. Gemäß Herstellerangaben wurden die Gele zuerst mit einer EtOH/Eisessig-Lösung mind. 20min / max. ü. N. bei RT auf einem Kreisschüttler fixiert. Es erfolgte eine Denaturierung der Proteine und SDS wurde entfernt. Im Anschluß an mehrere Waschschriffe (mit 30% EtOH und H₂O_{bidest}) wurde das Gel 10min in einer Sensitizer-Lösung inkubiert. Nach weiteren Waschschriffen mit H₂O_{bidest} wurde eine Silber-Lösung zugegeben. Die Silber-Ionen lagern sich hierbei an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine an. Diesem Schritt folgte ein weiterer Waschschriff (60 bis 90 Sekunden) mit Wasser. Sofort danach wurde die Entwicklerlösung zugegeben, wodurch Silber-Ionen zu elementarem Silber reduziert wurden und die Schwarzfärbung der Proteinbanden entstand. Nach einigen Minuten wurde die Reaktion mit der ProteoSilver Stop Solution abgestoppt, das Gel gewaschen und eingeschweißt. Zur weiteren Analyse wurden die Proteinbanden, die identifiziert werden sollten, am Institut für funktionelle Genomik (Arbeitsgruppe Dr. Jörg

Reinders) aus dem Gel geschnitten und weiter aufbereitet. Abschließend wurden die aus dem Gel gewonnenen Peptide mittels nano-LC-MS/MS charakterisiert. Es wurde ein Ultimate 3000 nano-HPLC-System (Dionex GmbH, Idstein, D), gekoppelt mit einem QTOF Massenspektrometer (QStar XL, Applied Biosystems, Darmstadt, D) verwendet. Das MS-Spektrum wurde mit einer Datenbank abgeglichen.

Fixierlösung

Eisessig	10 ml
Ethanol	50 ml
H ₂ O _{bidest}	40 ml

Sensitizer

ProteoSilver Sensitizer	1 ml
H ₂ O _{bidest}	99 ml

Silber-Lösung

ProteoSilver Silver	1 ml
H ₂ O _{bidest}	99 ml

Entwickler

ProteoSilver Developer 1	5 ml
ProteoSilver Developer 2	0.1 ml
H ₂ O _{bidest}	95 ml

B.2.4.8 Western Blot

An die SDS-PAGE (B.2.4.5) schloss sich in den meisten Fällen direkt ein Western Blot, auch Immunoblot genannt, an, mit dem eine qualitative und quantitative Analyse von bestimmten Proteinen aus Gewebelysaten oder von überexprimierten Proteinen möglich war. Im ersten Schritt erfolgte mittels Elektrophorese die Übertragung (das „Blotten“) der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Transfermatrix aus Polyvinylidenfluorid). Diese konnte anschließend mit Ponceau Rot angefärbt, geschnitten, mit Milchpulver blockiert und mit den gewünschten primären Antikörpern inkubiert werden. Nachfolgend wurde die Membran mit den passenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern behandelt, was eine photochemische Detektion der gesuchten Proteine mittels Chemolumineszenz ermöglichte (siehe unten). Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 4 genauer beschrieben.

Proteintransfer mittels Semidry-Verfahren

Die zuvor per Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 60mA pro Gel (0.8mA/cm²) für 60min auf die Transfermatrix geblottet. Hierfür wurden zuerst spezielle Filterpapiere und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, in verschiedene Puffer bzw. Methanol eingelegt und in folgender Reihenfolge, beginnend bei der Anode (unten), in die Blotting Apparatur gelegt (Abbildung 8):

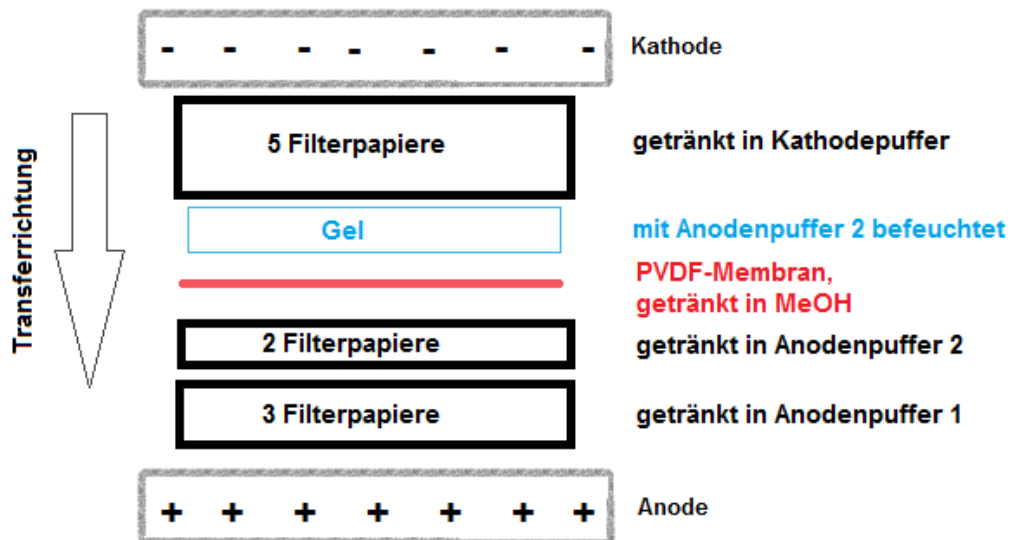


Abbildung 8: Proteintransfer mittels Semidry-Verfahren

Anodenpuffer 1		Anodenpuffer 2	
	pH 10.4		pH 10.4
Tris	36.3 g	Tris	3.6 g
Methanol	200 ml	Methanol	200 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l	H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

Kathodenpuffer

Tris	3 g
6-Aminohexansäure	5.8 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1.0 l

Ponceau S-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Membran meist in mehrere Streifen unterteilt, die dann gleichzeitig in verschiedene, passende Antikörperlösungen eingelegt wurden. Um festzustellen auf welcher Höhe man die Membranen schneiden musste, wurden die geblotteten Proteine zuvor reversibel rot eingefärbt. Bei Ponceau S handelt es sich um einen Azofarbstoff, der reversibel an die positiv geladenen Aminosäuren der Proteine bindet und diese somit auf der PVDF-Membran sichtbar macht. Der Farbstoff kann durch Waschen mit demineralisiertem Wasser wieder vollständig entfernt werden.

Ponceau S Färbelösung

Ponceau S	0.2% (w/v)
Trichloressigsäure	2% (w/v)
H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml

Immundetektion

Nach dem Proteintransfer bzw. nach der Ponceau S Färbung wird der Blot für 1-1.5h in Magermilchpulver (5% in TBST) gelegt (RT, auf dem Kreisschüttler). Dadurch werden noch freie, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Nach drei Waschschrritten mit 1 x TBST (à 5min), wurde ü. N. mit dem gewünschten primären Antikörper (Verdünnung mit „Antikörper-Stammlösung“, Tabelle 4) inkubiert. Dieser bindet nun spezifisch an die geblotteten Proteine. Am nächsten Tag wurde 3 x je 5min mit 1% Magermilchpulver (in TBST) gewaschen und anschließend für 2h im sekundären Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 4) inkubiert. Abhängig vom Spenderorganismus des Primär-Antikörpers wurde ein passender Sekundär-Antikörper verwendet, der nun spezifisch an die Fc-Region des ersten Antikörpers bindet. Kurz vor der Entwicklung wurde nochmals 1 x mit 1% Milchpulver und zweimal mit 1 x TBST gespült. Um die geblotteten Proteine bzw. die HRP-gekoppelten sekundären Antikörper sichtbar zu machen, wurde eine Chemolumineszenz-Reaktion ausgenutzt. Es wurde mit dem Clarity ECL Western Blotting Substrat Kit (Bio-Rad) gearbeitet. Für gestrippte Blots (siehe unten) und Antikörper, die aufgrund von längerer Lagerung an Sensitivität verloren haben, wurde das Enhanced ECL Detection Kit (Amersham) verwendet. Die Membran wurde zu gleichen Teilen (500µl) mit dem Detection Reagent 1 (Wasserstoffperoxid-Lösung) und mit dem Detection Reagent 2 (Luminol) inkubiert (1-3min, je nach verwendetem Kit). Hierdurch reagierte die HRP (horseradish peroxidase, gekoppelt mit sek. Antikörper) als Katalysator und oxidierte Luminol in Anwesenheit von H₂O₂, wobei Chemolumineszenz entstand. Die Luminol-getränkte Membran wurde nun zwischen zwei Kopierfolien gelegt (möglichst frei von Luftblasen) und mit dem ChemiDoc System von Bio-Rad entwickelt. Hierbei konnte die Belichtungszeit individuell gewählt werden (abhängig von verwendetem Kit, Antikörper und Proteinmenge).

TBS Puffer 10 x		pH 8.0	TBST Puffer 1 x	
Tris	10	mM	TBS 10 x	50 ml
NaCl	150	mM	Tween 20	0.1% (w/v)
H ₂ O _{bidest}	ad 800 ml		H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml

Antikörper-Stammlösung		in TBST
BSA	3% (w/v)	
NaN ₃	0.05% (w/v)	

Strippen

In einigen Fällen war es notwendig sämtliche Antikörper von der Membran zu entfernen und diese erneut mit primären und sekundären Antikörpern zu behandeln. Dieser Vorgang (das sogenannte „Strippen“) musste u. a. durchgeführt werden, wenn Proteine ähnliche molekulare Größen aufwiesen und somit eine gleichzeitige Detektion nicht möglich war. Die Membran wurde dazu 15min bei RT auf dem Kreisschüttler mit der Stripping-Lösung inkubiert und anschließend zweimal mit 1 x TBST gewaschen. Nun erfolgte wiederum eine einstündige Inkubation in 5% Magermilchpulver. Die nächsten Schritte waren identisch mit denen der ersten Immundetektion.

Stripping Lösung		
NaOH 1M	20	ml
DTT	1	mg
SDS	4	mg
H ₂ O _{bidest}	ad	200 ml

B.2.5 Affinitätschromatographie

B.2.5.1 Co-Immunpräzipitation

Um cNMP-abhängige Protein-Komplexe und Protein-Protein-Wechselwirkungen zu detektieren, kann man das Verfahren der Co-Immunpräzipitation anwenden. Dabei nutzt man eine Antigen-Antikörper-Reaktion aus. Der Antikörper gegen ein bestimmtes Protein wird an eine feste stationäre Phase gekoppelt und bindet das Antigen aus einem Proteingemisch oder Gewebelysat. Zusätzlich werden auch sämtliche Interaktionspartner des Antigens gefällt, die sogenannten Copräzipitate. Als stationäre Phase wurden Sepharose Beads verwendet; diese sind mit Protein A beschichtet. Protein A wird aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* gewonnen und bindet gut an den Fc-Teil von Human-IgG, ist aber auch für sämtliche Kaninchen-Antikörper geeignet. Die Co-Immunpräzipitation wurde ausschließlich unter nicht-denaturierenden Bedingungen, unter Anwesenheit von Lubrol (Nonaethyleneglycolmonododecylether) durchgeführt. Dieses Detergenz war sowohl im Wasch-, als auch im Fällungspuffer enthalten. Beide Puffer wiesen allerdings eine unterschiedliche Salzkonzentration auf, je höher die Salzmenge im Puffer, desto spezifischer die Bindung.

Lubrol-Fällungspuffer	pH 8.0		Lubrol-Waschpuffer	pH 8.0	
Tris	20	mM	Tris	20	mM
Lubrol PX	2%	(v/v)	Lubrol PX	0.4%	(v/v)
NaCl	150-300	mM	NaCl	150	mM
+ Proteaseinhibitoren (siehe Tabelle 7)					

Zu Beginn wurden jeweils 30µl Protein A Sepharose (PAS) mit dem Lubrol-Waschpuffer gespült, dazwischen abzentrifugiert und mit einer 3% BSA Lösung (in Lubrol-Waschpuffer, jeweils 500µl) für 30min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Lubrolpuffer (3 x, je 500µl, 5 min, RT) wurde pro Cup jeweils 10µl des primären Antikörpers (p44/p42 MAPK) und 100µl Lubrol-Fällungspuffer zugegeben und 1-4h im Kühlraum (4°C) auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Idealerweise wurde der primäre Antikörper gegen das Protein, das gefällt werden sollte, in dieser Zeit an die stationäre Phase gebunden. Währenddessen wurde das zu analysierende Gewebe mit 2 x Lubrolpuffer aufgeschlossen (B.2.4.1), verdünnt (mit Lubrolfällungspuffer + PI) und auf die Sepharose pipettiert. Das Lysat wurde 30min auf Eis inkubiert, die Cups wurden alle 5min leicht gemischt und anschließend zentrifugiert (20000 x g, 4°C, 10min). Es wurden ca. 700µg Protein pro Fällung eingesetzt. Zusätzlich wurde pro Cup 1mM DTT zugegeben, um die Oxidation von -SH-Gruppen zu verhindern. Die Ansätze wurden nun ü. N., bei 4°C unter Verwendung eines Überkopfschüttlers gemischt und am nächsten Tag wieder 3 x mit Lubrolpuffer gewaschen bzw. vorsichtig zentrifugiert (7000 x g, 5min, 4°C), damit der Überstand gut abzunehmen war. Die überstehende Lösung wurde verworfen und die an die Matrix gebundenen Proteine wurden mit 2 x Laemmli-Puffer (20µl je Cup, 1:1 Verdünnung des 4 x Laemmli-Puffers) eluiert. Anschließend wurde 3 min bei 95°C denaturiert und kurz abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun direkt via SDS-PAGE (B.2.4.5) aufgetrennt und analysiert werden.

B.2.5.2 cNMP-Agarose-Fällung

Zur Identifizierung von cNMP-bindenden Proteinen aus Gewebelysaten wurde mit Agarosen gearbeitet, die über Linker (Ethanolamin) mit zyklischen Nukleotiden (cNMPs) gekoppelt wurden (z. T. kostenlos von Biolog zur Verfügung gestellt). Folgende Agarosen wurden verwendet:

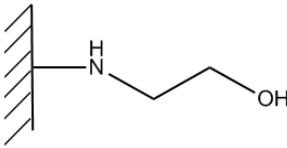
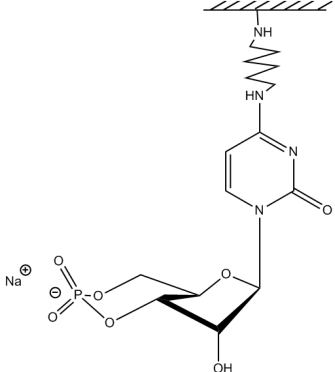
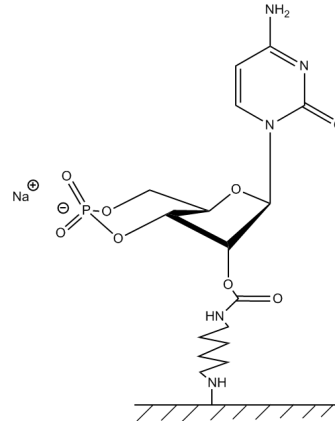
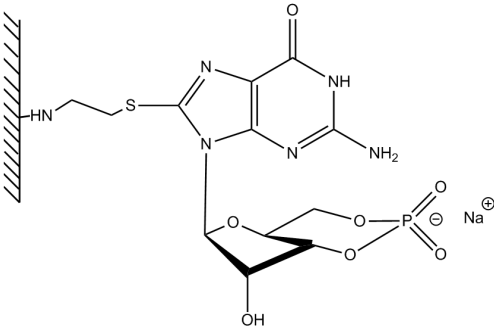
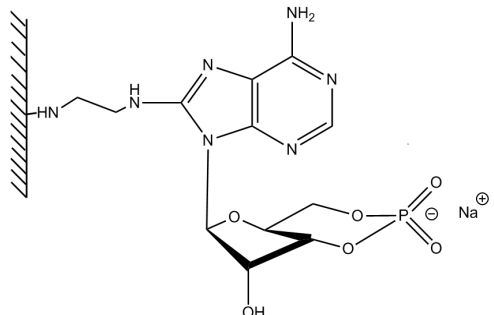
Agarose	IUPAC-Nomenklatur	Struktur
EtOH-NH-Agarose	Ethanolamin-Agarose (Kontroll-Agarose)	
4-AH-cCMP-Agarose	N ⁴ - (6-aminohexyl)cytidine-3',5'-cyclic monophosphate-Agarose	
2'-AHC-cCMP-Agarose	2'-O-(2-Aminoethylcarbamoyl)cytidine-3',5'-cyclic monophosphate-Agarose	
8-AET-cGMP-Agarose	8-(2-Aminoethylthio)guanosine-3',5'-cyclic monophosphate-Agarose	
8-AEA-cAMP-Agarose	8-(2-Aminoethylamino)adenosine-3',5'-cyclic monophosphate-Agarose	

Tabelle 8: Verwendete cNMP-/ Kontroll-Agarosen

Das Prinzip ist ähnlich der Affinitätschromatographie, mit der Ausnahme, dass bei der cNMP-Fällung immer zusätzlich eine Konkurrenz, also eine Verdrängungsreaktion, durchgeführt wurde. An die mit cNMP gekoppelte Matrix können Proteine unspezifisch oder spezifisch binden. Durch eine Vorinkubation mit einer BSA-Lösung können diese unspezifischen Bindungen minimiert werden. Der Matrix wird anschließend das zu untersuchende Lysat zugesetzt. Gibt man einen Überschuss an cNMP zu, lösen sich die spezifischen Bindungen und binden an das „freie“ cNMP. Die spezifisch bindenden Proteine befinden sich nun im Überstand und können abgetrennt werden. Beim anschließenden Eluieren mit 2fach Laemmli-Puffer lösen sich somit nur noch unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix. Die spezifisch gebundenen cNMP-interagierenden Proteine sind meist in geringer Konzentration im Lysat zu finden, daher ist eine Aufkonzentrierung von Vorteil [136]. Idealerweise kommt es zu einer Aufkonzentrierung der spezifisch gebundenen Proteine im Eluat. Als Negativkontrolle (Ctrl.) wurde Ethanolamin-Agarose eingesetzt. Die Versuchsdurchführung war analog zu den Ansätzen mit cNMP-Agarose. Alle Agarosen stammten von der Firma Biolog und wurden kommerziell erworben bzw. gratis zur Verfügung gestellt. Die Ligandendichte betrug für alle Agarosen $\sim 6.5\mu\text{mol/ml}$.

Der Gewebeaufschluss erfolgte mit Lubrolpuffer (B.2.4.1) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (siehe Tabelle 7). Pro Präzipitation wurden $700\mu\text{g}$ Protein eingesetzt, verdünnt wurde mit 20mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 7.4) auf $100\mu\text{l}$ und anschließend mit zweifach Lubrol-Puffer (+PI) auf $500\mu\text{l}$. Die Proben wurden nun 20min auf Eis gestellt und alle 5min wurden diese gemischt. Zwischenzeitlich wurde (analog B.2.5.1) die Agarose 3 x gewaschen und 1:1 mit Lubrol-Fällungspuffer gemischt. Die Gewebeproben wurden 15min, bei 4°C und $24000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand wurde auf jeweils $30\mu\text{l}$ Agarose (1:1 mit Lubrol-Fällungspuffer verdünnt, cNMP und Ctrl.) pipettiert. Nach Zugabe von $100\mu\text{M}$ IBMX und 1mM DTT wurden die Proben ü. N. bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Bei einigen Proben (Konkurrenzexperimente, gekennzeichnet mit „+“) wurde zusätzlich noch $200\mu\text{M}$ bzw. 2mM cNMP zugesetzt. Am nächsten Tag wurde 3min bei 4°C und $20000 \times g$ abzentrifugiert, sodass die Beads am Boden des Reagiergefäßes sedimentiert waren, 3 x mit Lubrolpuffer gewaschen und die Agarose am Ende trocken gesaugt. Die noch gebundenen Proteine wurden mit 2 x Laemmli Puffer eluiert, 3 min bei 95°C denaturiert und konnten mittels SDS-Page und Western Blot genauer analysiert werden.

B.2.6 Phosphorylierungsexperimente

Um den stimulierenden Effekt zyklischer Nukleotide auf Kinasen nachzuweisen, bedient man sich dem Verfahren der Phosphorylierung. Hierbei wird eine Phosphatgruppe (meist aus ATP stammend) reversibel an einen Aminosäurerest eines Proteins gebunden. Phosphatasen

entfernen wiederum die angehefteten Phosphatgruppen und wurden daher in diesen Experimenten gehemmt. Um diesen Phosphat-Transfer sichtbar zu machen, kann man entweder auf allgemeine biochemische (Western Blot und Phospho-Antikörper), aber auch auf Isotopen-basierte Modelle (B.2.7) zurückgreifen.

B.2.6.1 Stimulation von Kinasen in Gewebelysaten

Die Versuchstiere (WT, cGKI-KO und cGKII-KO) wurden mittels retrograder Perfusion euthanisiert. Anschließend erfolgte ein Gewebeaufschluss mit Lubrolpuffer (B.6.1.) unter Zugabe von Protease- („PI“, B.2.4.1, Tabelle 7) und Phosphataseinhibitoren (PhosStop, Herstellung nach Gebrauchsanweisung). Die Stimulation erfolgte direkt in 1.5ml Reagiergefäßen bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer compact unter ständigem Schütteln (300rpm, Stimulationsdauer 15/30/60min). Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 x Laemmli-Puffer zugegeben und die Proteine mit Hitze (95 °C) denaturiert. Mit Kontrollproben („us“, unstimulated) wurde analog verfahren. Statt dem Stimulans wurde hier Wasser zugefügt.

Stimulationsansatz:

Gewebeprotein	100	µg
MES 5 x	3.6	µl
ATP 10 mM	3.6	µl
PhosStop 10 x	3.6	µl
Stimulans (cNMP)/ H ₂ O	3.6	µl
Inhibitor/ H ₂ O	3.6	µl
H ₂ O mit PI	ad 40	µl

Als Stimulantien wurden folgende cNMPs bzw. cNMP-Analoga (Konzentration 100µM im Ansatz) eingesetzt:

- DB-cCMP / cCMP
- 8-pCPT-cGMP / cGMP
- SP-5,6-DCI-cBIMPS / cAMP

Als Inhibitoren wurden folgende Substanzen verwendet:

- cAK-Inhibitor AS₅₋₂₄ (H-TTYADFIASGRTGRRNAIHD, Konzentration 10µM im Ansatz)
- PKC-Inhibitor myr-psi PKC (Myr-RFARKGALRQKNV, Konzentration 50µM in Ansatz)

B.2.6.2 Detektion der Phosphorylierung

Hierfür wurden Phospho-Antikörper verwendet, welche, als Antwort auf eine Stimulation mit z. B. cNMPs, phosphorylierte Proteine an den Aminosäuren Threonin, Serin und/oder Tyrosin spezifisch detektieren können. Zur Kontrolle der Phosphorylierung wurde mit

Vasodilatator- stimuliertem Phosphoprotein gearbeitet. VASP ist ein Substrat der cAK und auch der cGK und kann an drei Stellen phosphoryliert werden: Ser157, Ser239 und Thr278. Ser157 wird bevorzugt von cAK phosphoryliert, wohingegen Ser239 (*in vitro*) und Thr278 (*in vivo*) vorzugsweise von cGK phosphoryliert wird. Wird VASP an der Position Ser157 phosphoryliert, kommt es zu einem sogenannten „mobility shift“ bei der SDS-PAGE von 46 kDa auf 50 kDa [137]. In dieser Arbeit wurde mit folgenden Phospho-Antikörpern gearbeitet (Phosphorylierungsstellen sind in Klammern angegeben):

- Phospho-p44/p42 MAPK (ERK 1/2, Thr202/Tyr204)
- Phospho-VASP (Ser239)

B.2.6.3 Densitometrische Auswertung und Berechnung der Stimulation

Die densitometrische und quantitative Auswertung erfolgte mit dem ChemiDoc System und der ImageLab Software von Bio-Rad. Mithilfe der Software konnten die Gel-Banden der phosphorylierten Proteine eingegrenzt und markiert werden. Anschließend wurde die Intensität (Volume OD/mm²) einer jeden einzelnen Bande bestimmt, wobei der Hintergrund automatisch abgezogen wurde. Die Zunahme der Phosphorylierung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zunahme der Phosphorylierung} = \frac{\frac{\text{Intensität } \textit{stimulierte Probe}}{\text{Intensität } \textit{unstimulierte Probe}} (\textit{Phospho - AK})}{\frac{\text{Intensität } \textit{stimulierte Probe}}{\text{Intensität } \textit{unstimulierte Probe}} (\textit{Gesamt - AK})}$$

Formel 1: Zunahme der Phosphorylierung

War der Quotient aus „Intensität stimulierte Probe“ und „Intensität unstimulierte Probe“ beim Phospho-Antikörper größer als 1 hatte eine Phosphorylierung stattgefunden. Zusätzlich wurde der Gehalt an Gesamtprotein einberechnet, auch um etwaige Pipettierfehler auszuschließen. Dazu musste der Western Blot gestrippt (B.2.4.8) und erneut mit dem Gesamt-Antikörper inkubiert werden. Die Banden des Gesamt-AK wurden, wie oben beschrieben, analysiert.

B.2.7 Phosphotransferaseassay

Proteinkinasen zählt man zur Klasse der Transferasen. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sie den Transfer von endständigen (γ)-Phosphatgruppen (meist von ATP) auf die Aminosäure-Seitenketten-Hydroxylgruppen geeigneter Substratproteine katalysiert. Die meisten Proteinkinasen, wie cAK und cGK, werden zu der Familie der Serin/Threonin-

Kinasen gezählt. Da bei diesen nur Serin und Threonin in der Lage sind, dieses Phosphat aufzunehmen, sollte das Substrat das Aminosäuresequenzmotiv K/R K/R X **S/T** aufweisen, wobei das X für eine variable Aminosäure steht und **S/T** die Phosphorylierungsstelle darstellt. Ein Transfer kann jedoch nur dann ablaufen, wenn ausreichend cNMP vorhanden ist, das die Bindungsstellen der Kinasen besetzen kann. Um die katalytische Aktivität der Proteinkinasen zu bestimmen, wurde ein (γ - ^{32}P)-ATP-Kinase-Assay durchgeführt, wobei die endständige Phosphatgruppe radioaktiv mit ^{32}P , einem β -Strahler mit einer HWZ von 14.29 Tagen, markiert wurde. Dadurch lässt sich, in Abhängigkeit der Konzentration an zyklischen Nukleotiden, die Umsatzrate von Proteinkinasen für ATP bestimmen. Umgesetzte basische Substratpeptide werden dadurch radioaktiv markiert. Bei saurem pH binden die markierten, positiv geladenen Substratpeptide an Phosphocellulose-Filter. Die freie Radioaktivität kann dadurch abgetrennt werden und geht somit nicht in die Berechnung der Umsatzrate mit ein [138]. Der Transferaseassay wurde sowohl mit cG-Kinasen, als auch mit cAK durchgeführt. Außerdem gab es Variationsmöglichkeiten bei der Auswahl der zyklischen Nukleotide (cAMP, cCMP, cGMP). Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Zu Beginn der Experimente wurde ausschließlich mit aufgereinigten Kinasen gearbeitet, die entweder kommerziell erworben wurden oder aus lehrstuhlinterner Herstellung stammten. Bei späteren Versuchen konnte der Assay auch für Gewebelysate angewandt werden. Hierzu war eine geringe Modifikation der Methode notwendig.

B.2.7.1 Standard-Test zum Nachweis von cG-Kinasen

Allgemeiner Ansatz/Reaktionsgemisch:

20 µl	5 x MES ¹
10 µl	100 mM DTT
10 µl	10 mg/ml (= 1%) BSA
10 µl	10 µM cAK-Inhibitorpeptid ² (AS ₅₋₂₄ , PKA, nur bei ZE-Proben)
10 µl	400 µM cGKI Substratpeptid ³ (ca. 0.4mg/ml)
10 µl	1 mM (γ- ³² P)-ATP (ca. 100cpm/pmol) ⁴
10 µl	H ₂ O (falls kein cAK-Inhibitorpeptid verwendet wurde)
<hr/>	
70 µl	Reaktionsgemisch
+ 10µl	H ₂ O (-cNMP) bzw. 100µM cNMP (+cNMP)
+ 20µl	gereinigtes Protein (ca. 20ng Protein)
<hr/>	
100 µl	Gesamt pro Ansatz
5 min	Bei 30°C inkubieren
50 µl	des Ansatzes (entspricht 10ng Enzym oder 50ng Zellextrakt) auf Filter geben und Reaktion in 75mM H ₃ PO ₄ abstoppen

1

5 x MES-Puffer	pH 6.9
MES 250mM	250 mM
EGTA	2 mM
Mg(OAc) ₂	5 mM
NaCl	50 mM

² hemmt die Aktivität der cAK [139]; Zugabe war notwendig, um eine cAK-vermittelte Phosphorylierung ausschließen zu können

³ es wurden 3 verschiedene Substratpeptide verwendet, alle wurden durch Festphasensynthese von der Firma Coring hergestellt

- VASPtide, Sequenz: **RRKVS**KQE
- KEMPtide, Sequenz: **LRRAS**LG
- IRAGtide, Sequenz: **RRRV**SVAV

⁴ durch Zugabe von (γ-³²P)-ATP („ATP hot“) zu „kaltem“ (nicht-radioaktiv markiertem) ATP. Berechnung der Aktivität erfolgte am Versuchstag nach dem Zerfallsgesetz $A_t = A_0 / e^{0.05 \cdot t}$, abhängig von der Probenzahl

Vorbereitung der Proben und Durchführung des Assays:

Für jede Proteinprobe wurde die Kinase-Aktivität einmal in Abwesenheit von cNMP (-cNMP, Basalaktivität) und einmal in Anwesenheit von 10µM (+cNMP) bestimmt (jeweils Doppelbestimmung, also 4 Ansätze pro Probe).

Proteinproben wurde mit Verdünnungspuffer auf folgende Konzentrationen gebracht (20µl pro Ansatz) und auf Eis inkubieren:

- Zellextrakt: 5.0ng/µl
- Aufgereinigtes Enzym: 1.0ng/µl

Verdünnungspuffer

MES 5 x	1	ml
DTT	1	mM
BSA	1	%
H ₂ O _{bidest}	ad	5 ml

- Zur Korrektur der unspezifischen Aktivität wurden die entsprechenden Leerwerte bestimmt (Verdünnungspuffer bzw. Proteinprobe \triangleq Negativkontrolle). Als Positivkontrolle wurden gereinigte cG-Kinasen verwendet, von denen die Aktivität bereits bekannt war.
- Das Reaktionsgemisch (mit „ATP hot“, pro Ansatz jeweils 70µl, s.o.) wurde für alle Ansätze gemeinsam vorbereitet.
- Die entsprechende Anzahl an Reagiergefäßen und Phosphocellulosefilter (P-81, 2.1cm Rundfilter, Whatman) wurden vorbereitet und Cups beschriftet. Die Filter wurden eingeknickt und mit Bleistift nummeriert.
- Je 10µl H₂O bzw. 100µM cNMP wurde in den Reagiergefäßen vorlegt und 70µl Reaktionsgemisch zugegeben.
- Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20µl Proteinprobe (zeitlich versetzt alle 30sec). Der Ansatz wurde kurz gevortext und 5min bei 30°C inkubiert.
- Die Proben wurden nach dem Inkubieren kurz gemischt und jeweils 50µl aus den Cups auf Phosphocellulosefilter pipettiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Filter in ein H₃PO₄-Bad (75mM, ca. 200ml) gegeben.
- Die Filter wurden 4 x 2min mit 75mM H₃PO₄ und 1 x 5min mit Aceton gewaschen und anschließend auf der Heizplatte (Scie-Plas Gel DryerTM GD4534) bei 42°C getrocknet.
- Die Szintillationsgefäße wurden beschriftet, mit jeweils 10ml Szintillationslösung (Rotiszint®, Carl Roth) befüllt und die trockenen Filter dazugegeben.
- 10µl des Reaktionsgemisches (enthält 1430pmol ATP) wurde auf einen Filter pipettiert und ebenfalls in ein, mit Rotiszint® gefülltes Gefäß, gegeben. Dadurch wurde die spezifische Aktivität des ATP bestimmt und der Zerfall der Radioaktivität

berücksichtigt (sA_{ATP} , Dreifachbestimmung), die etwa 80-120cpm/pmol ATP betragen sollte.

- Die Zählrate (cpm) der Proben wurde im β -Zähler (TriCarb 2800TR Liquid Scintillation AnalyzerTM, Perkin Elmer) vermessen, Mittelwerte wurden berechnet und entsprechende Leerwerte abgezogen (= cpm_{korrr}).

Auswertung:

Gehalt an Kinase in unbekannter Probe:

$$\text{Gehalt (\%)} = \frac{cpm_{korrr}/\mu g (\text{Probe})}{cpm_{korrr}/\mu g (\text{gereinigte Kinase})} \quad (\text{cpm-Werte aus Ansätzen + cNMP})$$

Formel 2: Gehalt an Kinase

Faktor für maximale cNMP-Stimulation:

$$\frac{cpm_{korrr} (+cNMP)}{cpm_{korrr} (-cNMP)}$$

Formel 3: Faktor für maximale cNMP-Stimulation

Maximale Umsatzrate (v_{max}):

$$v_{max} (\mu mol * mg^{-1} * min^{-1}) = \frac{cpm_{korrr} (+cNMP) / sA_{ATP} \left(\frac{cpm}{pmol} \right)}{ng (\text{Protein auf Filter}) * 5 min}$$

Formel 4: Max. Umsatzrate

B.2.7.2 Bestimmung der Aktivitätskonstanten für cNMPs (K_a -Wert)

Zur Ermittlung der Aktivitätskonstanten von Proteinkinasen, in Abhängigkeit von verschiedenen zyklischen Nukleotiden wurde das in B.2.7.1 beschriebene Verfahren angewandt. Allerdings wurde die katalytische Aktivität der Kinasen hier in Gegenwart von steigenden cNMP-Konzentrationen gemessen.

- Anstelle von 100µM cNMP wurden in die Reagiergefäße jeweils 10µl folgender cNMP-Verdünnungen vorgelegt:
 - cGMP: 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} , 2×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} [M]
 - cCMP: 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} , 2×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 5×10^{-2} [M]
 - cAMP: 1×10^{-9} , 5×10^{-8} , 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 5×10^{-2} [M]
- Die Umsatzrate (v_{\max}) wurde für jede cNMP-Konzentration gesondert berechnet. Anschließend wurden v_{\max} (y-Achse) gegen \log [cNMP] (x-Achse) aufgetragen. Der K_a -Wert entsprach der cNMP-Konzentration bei halbmaximaler Umsatzrate.

B.2.7.3 Bestimmung der Aktivität endogener cG-Kinasen aus Gewebelysaten

Die Aktivität endogener Kinasen ließ sich analog B.2.7.1 bestimmen. Es wurden allerdings folgende Modifikationen vorgenommen:

- Retrograde Perfusion der Versuchstiere (WT und cGKI KO) und Entnahme der Gewebe (Lunge, Jejunum, Niere) (siehe B.2.3.3, B.2.3.4).
- Gewebeaufschluss mit Extraktionspuffer (ohne Detergens), Proteinbestimmung nach Bradford bzw. am Qubit (B.2.4.1, B.2.4.4, B.2.4.2).
- Zugabe von 10µl 20µM cAK-Inhibitorpeptid (AS₅₋₂₄), um eine cAK-vermittelte Phosphorylierung auszuschließen.
- Anstatt aufgereinigtem Enzym wurde 20µl Gewebelysat zu 80µl Reaktionsgemisch gegeben.
- Auswertung: Durch Auftragen von v_{\max} (Ordinate) gegen \log [cNMP] (Abszisse) ließ sich K_a ermitteln, zusätzlich wurde die Stimulation (x-fach zur Kontrolle) gegen die Konzentration (cNMP) aufgetragen. Hierbei wurden pro cNMP jeweils 2 repräsentative, dem K_a -Wert entsprechende Konzentrationen ausgewählt:

- 5µM/100µM cCMP
- 50nM/5µM cGMP
- 500nM/100µM cAMP

B.2.8 Kultivierung und Stammhaltung von Sf9-Zellen

Sf9 ist eine Insektenzelllinie, gewonnen aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda* Larven (eine Mottenart) und ein Subklon der Linie IPLB-SF-21AE [140]. Sie ist relativ robust und wächst schnell in Suspension und adhärent als Monolayer. Diese Zelllinie wurde zur Produktion von rekombinanten cG-Kinasen verwendet, wobei der Umstand genutzt wurde, dass Sf9-Zellen einfach mit Baculoviren infiziert werden können.

B.2.8.1 Nährmedium und Zusätze

Die Sf9-Zelllinie wurde auf serumfreiem Insect Xpress™ Medium kultiviert. Kurz vor Verwendung wurde 10% fetales Kälberserum (FCS) und ein Antibiotikum (Gentamicin-Sulfat, 100µg/ml) zugegeben und im Wasserbad (28°C) erwärmt.

B.2.8.2 Anzucht und Stammhaltung

Die Anzucht der Sf9-Zellen erfolgte in Glas-Erlenmeyerkolben im Inkubator unter ständigem Schütteln (28°C, 150rpm). Die Zellen wurden alle 2 Tage gezählt (B.2.8.3) und schließlich bei 1000rpm für 5min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte unter der Sterilbank eine Resuspension in frischem Medium.

B.2.8.3 Zählen von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurden 50µl der Zellsuspension 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt, die Zellkammer befüllt und die 4 Großquadrate ausgezählt. Da jedes Quadrat eine Fläche von 1mm² aufweist und die Kammerhöhe 0.1mm misst, ergibt sich ein Volumen von 0.1µl je Quadrat (≙ Verdünnungsfaktor 10). Die Zellzahl lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} * 10 * 10000$$

Formel 5: Zellzahl pro ml

B.2.9 Expression von rekombinanten cG-Kinasen in Sf9-Zellen

In Vorversuchen am Lehrstuhl wurden Sf9-Zellen kultiviert und mit Baculoviren infiziert, welche als Expressionsvektor für heterologe Proteine benutzt werden. Durch Transfektions-,

Inkubations- und Zentrifugationsschritte wurden mehrere Virenüberstände gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der Virussuspension P3 gearbeitet, welche eine Expression von rekombinanten cG-Kinasen bewirkt. Hierzu wurden je Enzym ca. 300 Millionen Sf9-Zellen (1Mio/ml) 1:100 mit funktionalem Baculovirus („P3-Überstand“) infiziert. Zusätzlich wurde immer eine Expressionskontrolle mit einem Aliquot der Zellkultur durchgeführt.

B.2.9.1 Ernte und Aufarbeiten der Sf9-Zellen

Sämtliche Puffer und Verbrauchsmaterialien wurden im Vorfeld autoklaviert.

Vorgehen:

- Sf9-Zellen wurden ca. 60h (sobald der Zellrasen dicht angewachsen ist) durch Zentrifugation (1000 x g, 10min, 4°C) geerntet.
- Die Zellen wurden anschließend mit 0.5 Kulturvolumen PBS-Puffer + 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail zweimal gewaschen.
- Zellsuspension wurde mit wenig TN-Puffer (ca. 50µl pro ml Kultur) + 25 x Cocktail hergestellt.
- Expressionskontrolle: Aliquot der Suspension wurde 1:5 mit TN-Puffer verdünnt.
- Lagerung: -80°C bis zur weiteren Verwendung.

TN-Puffer (bei 4°C)	pH 8.0
Tris	20 mM
NaCl	100 mM
H ₂ O _{bideest}	ad 1 l

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration	
		25 x Cocktail	1 x Cocktail
DTT	100mM	2.5mM	0.1mM
EDTA	500mM	2.5mM	0.1mM
Benzamidin	200mM	2.5mM	0.1mM
Leupeptin	1mg/ml (in Isopropanol)	1µg/ml	0.1µg/ml
PMSF	100mM (in Isopropanol)	2.5mM	0.1mM

Tabelle 9: Verwendete Proteaseinhibitoren (Sf9-Zellaufschluss)

B.2.9.2 Schnelldachweis von cG-Kinasen in Sf9-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Transfektion mittels Baculoviren erfolgreich war und cG-Kinasen exprimiert wurden, ging man folgendermaßen vor:

- Die eingefrorene Zellsuspension wurde bei RT auftaut und ins Eisbad gestellt.
- Zur Homogenisation wurde die Suspension 10 x mit einer 1ml Spritze durch eine Kanüle (0.4 x 19mm) gepresst und zentrifugiert (15000 x g, 15min, 4°C).
- Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung (B.2.4.5/B.2.4.6) auf Anwesenheit von cG-Kinasen geprüft.

B.2.9.3 Aufschluss der Sf9-Zellen

Um cG-Kinasen aus den infizierten Zellen zu gewinnen, wendete man folgendes Verfahren an:

- Die eingefrorene Suspension wurde bei RT auftaut und auf Eis gestellt.
- Die Homogenisation erfolgte mit einem Ultra-Turrax (3 x 15s auf Eis, dazwischen ca. 20s Pause).
- Zentrifugation bei 18000rpm, 4°C und 30min.
- Der Überstand wurde abgenommen (enthielt lösliche cG-Kinasen), 20% Glycerol und 25 x Cocktail zugegeben.

B.2.9.4 Aufreinigung der löslichen cG-Kinasen

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden die Zellextrakte mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dieses Verfahren ermöglicht es bestimmte Enzyme spezifisch aus einem Proteingemisch zu isolieren, indem es zu einer Interaktion zwischen aufzureinigendem Protein und dessen Ligand kommt, der an eine feste Matrix gekoppelt ist. Als stationäre Phase wurde mit einer 8-AEA-cAMP-Agarose Säule (6ml, Ligandendichte ~6µmol/ml) gearbeitet, als Eluent wurde cGMP verwendet. cG-Kinasen binden an cAMP, welches fest mit der Säule gekoppelt ist. cAMP bindet mit einer 100fach geringeren Affinität an cGK als cGMP [141]. Die Zugabe einer geringen cGMP Konzentration bewirkt bereits ein vollständiges Eluieren der cG-Kinasen von der Matrix. Die Durchführung des Versuches erfolgte mit einer Machery-Nagel-Absaugapparatur bei RT, um die Trennzeit (Viskosität des Glycerols bei 4°C höher) zu verkürzen. Es wurden ausschließlich die beiden cGKI-Isoenzyme (cGKI α /cGKI β) aufgereinigt. Dafür wurden jeweils 2 separate cAMP-Agarose Säulen verwendet.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Die 8-AEA-cAMP-Agarose Säulen (6ml) wurden auf die Absaugapparatur geschraubt, die Wasserstrahlpumpe angeschlossen und mit 100ml Puffer A äquilibriert (Flußrate 2ml/min).
- 1-5g Zellextrakt (B.2.9.3) wurden auf die Säule pipettiert und durchgesaugt.
- Mit 10fachem Säulenvolumen (= 6ml) von Puffer A wurde gespült.
- Die Elution erfolgte mit Puffer B, 6 Fraktionen je 3ml wurden gesammelt und auf Eis gelagert.
- Die Kontrollen wurden gesammelt: Totvolumen, „Flow through“, Waschflüssigkeit.
- Die Regeneration der Säule erfolgte mit 100ml Puffer C.
- Zur Reinigung der Säule wurde 8M Harnstoff verwendet.
- Lagerung bei 4°C in Puffer A unter Zusatz von 0.05% NaN₃.

Puffer A: TN-Puffer + 20% Glycerol + 1 x Cocktail

Puffer B: Puffer A + 20µM cGMP

Puffer C: Puffer A + 1M NaCl

Die löslichen cG-Kinasen wurden üblicherweise schon zu Beginn der Elution mit cGMP (Puffer B) von der festen Matrix gelöst und befanden sich demnach in den ersten Elutionsfraktionen. Der Gehalt an cG-Kinase nahm mit steigender Zahl der Fraktionen ab. Das Totvolumen betrug ca. 6ml und wird als das Volumen an mobiler Phase definiert, welches benötigt wird, um alle Poren und Zwischenräume der Säule zu füllen. Sowohl die Waschflüssigkeit (Punkt 3, Spülen mit Puffer A) als auch die Durchlaufflüssigkeit („Flow through“, Regeneration mit Puffer C) wurden auf Anwesenheit von cG-Kinasen kontrolliert. Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf Gehalt und Reinheit der cG-Kinasen ziehen. War eine ausreichende Reinheit der Lösungen nicht gewährleistet (Auftreten von zu vielen Nebenbanden), wurden die Proben ein zweites Mal aufgereinigt. Elutionsfraktionen mit hohem Kinasegehalt wurden gepoolt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

B.2.9.5 Aufkonzentrierung von cG-Kinasen durch Ultrafiltration

Durch Membranfiltration der Eluate wurden die Proteinlösungen aufkonzentriert; größere Moleküle (Proteine) wurden dabei zurückgehalten. Durch Diafiltration (eine Anwendung der Ultrafiltration) konnte die Suspension umgepuffert und deren Salzkonzentration geändert werden. Dazu wurden die Proben kontinuierlich aufkonzentriert und neuer Puffer zugeführt. Zur Aufkonzentrierung wurden Vivaspin 20 Konzentratoren (MWCO 30.000, Sartorius) mit einer Trenngrenze von 30kDa verwendet. Die Ultrafiltration wurde 3 x für je 2h bei 4°C und

5000 x g durchgeführt. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde das Volumen der eingengten Elutionsfraktionen mit Puffer A (1 x Cocktail ohne Leupeptin) wieder auf den Ausgangswert gebracht. Die Endlösung wurde mit 50% Glycerol versetzt und bei -4°C gelagert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der Stock-Lösung mittels Bradford bestimmt (B.2.4.4). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anschließend mittels Phosphotransferaseassay (B.2.7). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Chargen an cGK exprimiert und aufgereinigt. Der Vorgang war jeweils identisch.

B.2.10 Statistik

Alle Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben. Fehlerbalken in den Abbildungen sind Visualisierungen der Schätzintervalle der Mittelwerte. Für die Signifikanzberechnung zwischen zwei Gruppen wurde der Student's unpaired t-test (Konfidenzintervall 95%), für den Vergleich von drei oder mehreren Gruppen eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-post-Test durchgeführt. Die p-Werte wurden folgendermaßen angegeben: $p < 0.05 \triangleq$ statistisch signifikant (*), $p < 0.01 \triangleq$ statistisch hoch signifikant (**), $p < 0.001 \triangleq$ statistisch höchst signifikant (***) und $p > 0.05 \triangleq$ nicht statistisch signifikant (n.s.). Die Anzahl der Experimente wurde mit „n“ angegeben.

C. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich an der Aufklärung der funktionellen Rolle von cCMP (einem zyklischen Nukleotid mit Pyrimidin-Struktur) unter Zuhilfenahme von verschiedenen Mausmodellen gearbeitet. Dabei wurden zunächst ein möglicher, stimulatorischer Effekt von cCMP auf Kinasen *in vitro* untersucht und cCMP-bindende Proteine identifiziert. Ein weiterer Schwerpunkt lag im weiteren Verlauf der Arbeit auf der Aufklärung einer möglichen Interaktion zwischen p44/p42 MAPK (ERK1/2), cGK und cNMPs. Außerdem wurde versucht, die Rolle von cCMP in (patho)physiologischen Prozessen, z. B. in der Sepsis, *in vivo* aufzuklären.

C.1 Aktivierung cNMP-abhängiger Kinasen *in vitro* und in Gewebelysaten

cAMP und cGMP sind etablierte „second messenger“, die an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind, u. a. an der Aktivierung von cAK bzw. cGK. Vor Kurzem konnte die Existenz von zyklischem Cytidin-3',5'-monophosphat (cCMP) und mögliche Funktionen von cCMP nachgewiesen werden. Nach wie vor ist aber noch unklar, ob cCMP auch eine „second messenger“ Funktion aufweist. Um dies genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente mit gereinigten Enzymen und mit Gewebelysaten (cGK-KO und WT) durchgeführt.

C.1.1 Expression und Aufreinigung von cGKI

Um für spätere Versuche (Phosphotransferaseassay, Western Blot) ausreichend cGMP-abhängige Kinase (cGKI α , cGKI β) vorrätig zu haben, musste diese zuerst in Insektenzellen überexprimiert und aufgereinigt werden (B.10.). Hierfür wurde mit Sf9-Zellen gearbeitet, da diese leicht mit Baculoviren infiziert werden konnten (Vorarbeit von Dr. Matthias Desch). Vor dem eigentlichen Zellaufschluss und der Aufreinigung wurde ein Schnellnachweis (basierend auf SDS-PAGE und Coomassie-Färbung) auf Anwesenheit von cGKs in der Zellsuspension durchgeführt (Abbildung 9). Hierbei wurde die Zellsuspension 10 x mit einer Spritze durch eine Kanüle gepresst, anschließend zentrifugiert und die Konzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass die Expression von cGK in Sf9-Zellen erfolgreich war. Im Protokoll konnte wie in B.2.9.4/B.2.9.5 beschrieben, fortgeföhren werden.

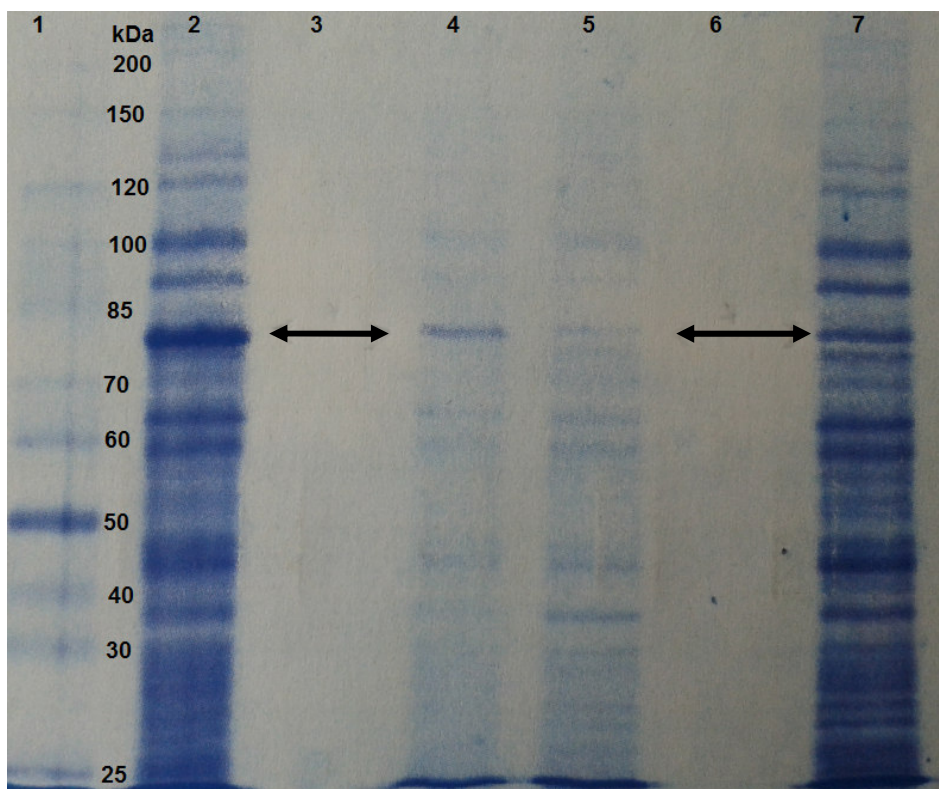


Abbildung 9: Schnelldurchweis auf Anwesenheit von cGKI α / β in der Sf9-Zellsuspension mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Als Standard wurde Unstained Standard (7 μ l, Lane 1) verwendet, die Zellsuspensionen (ZS) wurden verdünnt und jeweils 10 μ g bzw. 5 μ g aufgetragen. Lane 2: ZS cGKI α (10 μ g), Lane 4: ZS cGKI α (5 μ g), Lane 5: ZS cGKI β (5 μ g), Lane 7: ZS cGKI β 10 μ g. In Lane 3 und 6 wurde Laemmli-Puffer aufgetragen.

Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit 8-AEA-cAMP-Agarose. Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht darauf, dass cGKI (in der Zellsuspension enthalten) an die cAMP-gekoppelte Matrix bindet. Durch Zugabe eines Elutionspuffers, der cGMP enthält, werden die Kinasen von der Säule verdrängt. Während der Aufreinigung wurden die verschiedenen Durchlauf- und Elutionsfraktionen gesammelt und zusammen mit einer Kontrolle (zu einem früheren Zeitpunkt am Lehrstuhl aufgereinigte cGKs bzw. kommerziell erworben) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung mit Coomassie Färbelösung behandelt. Dadurch ließ sich quantitativ und qualitativ die Reinheit der cGKs ermitteln. Pro Lane wurden 15 μ l der entsprechenden Elutionen aufgetragen; Kontrollen wurden auf 50ng/ μ l verdünnt (Abbildung 10).

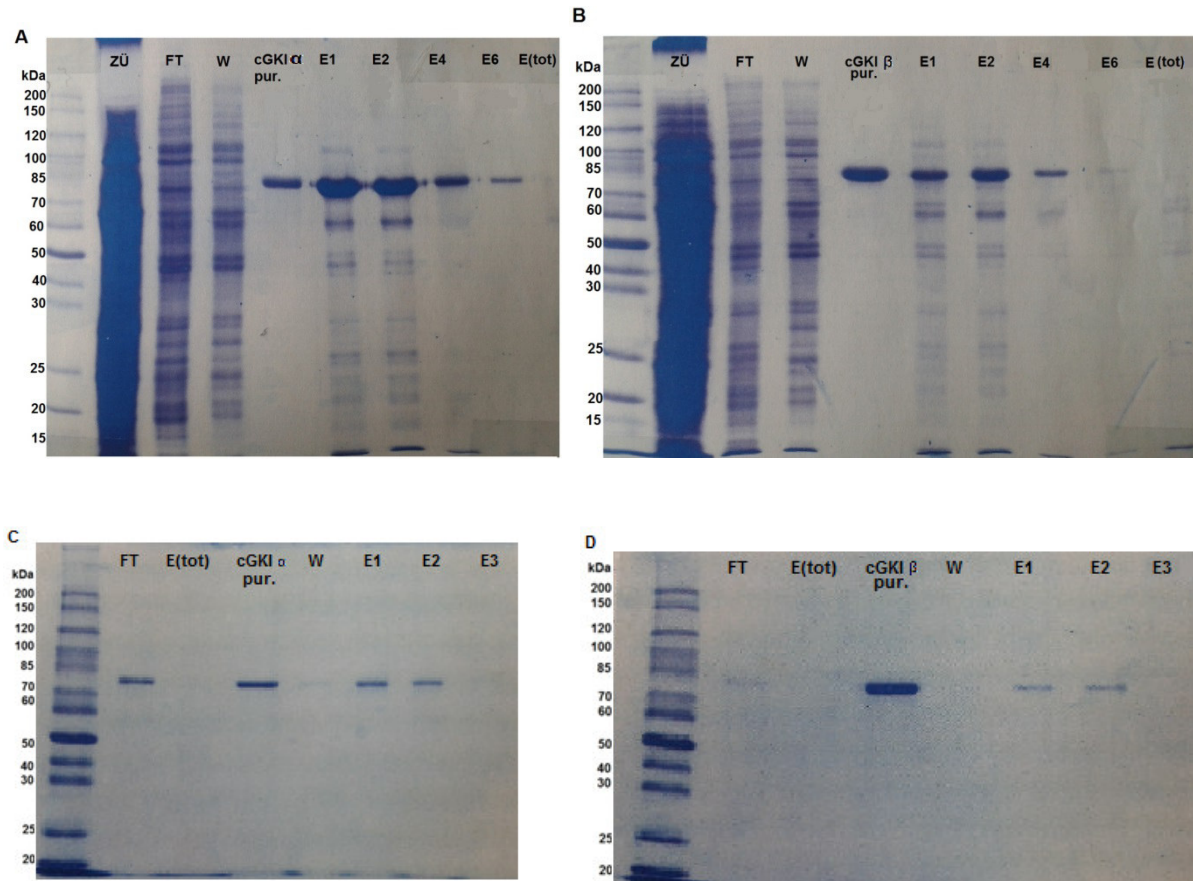
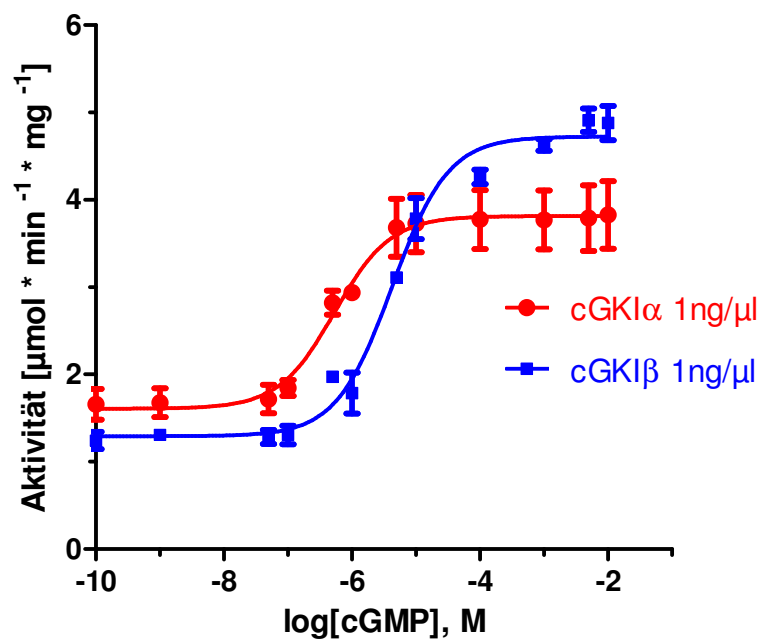


Abbildung 10: Analyse der aufgereinigten Kinasen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. (A) Coomassiegel einer cGKI α -Expression, 1. Aufreinigung, als Standard wurde Unstained Standard (7 μ l) verwendet. ZÜ: Zellüberstand, FT: Flow through (Durchlauf fraktion), W: Waschflüssigkeit, cGKI α (ctrl): Kontrolle, E1-6: Elutionsfraktionen, E (tot): Totvolumen der Säule. Es wurden jeweils 15 μ l pro Elutionsfraktion, 15 μ l der verdünnten Kontrolle (50ng/ μ l) und jeweils 5 μ l von ZÜ, FT und W aufgetragen. (B) Coomassiegel einer cGKI β -Expression, 1. Aufreinigung. (C) Coomassiegel der 2. Aufreinigung der Elutionen (cGKI α -Expression). (D) Coomassiegel der 2. Aufreinigung der Elutionen (cGKI β -Expression).

Der Großteil des aufgereinigten Enzyms wurde bereits während der ersten 4 Fraktionen eluiert. Die Elutionsfraktionen 7-10 enthielten kein Enzym mehr und wurden somit verworfen (Abbildung 10A/B). Da besonders in den ersten Elutionsfraktionen viele Nebenbanden auftauchten, wurden die Proben erneut aufgereinigt (Abbildung 10C/D). Die Reinheit wurde schlussendlich auf > 95% geschätzt.

C.1.2 Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Enzyme

Im Anschluss an die Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration wurde die Aktivität der aufgereinigten Enzyme mittels Phosphotransferaseassay unter Zugabe von cGMP (in steigenden Konzentrationen) bestimmt (Abbildung 11).



- cGKIα: $K_a(\text{cGMP}) = 0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$
- cGKIβ: $K_a(\text{cGMP}) = 4.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$

Abbildung 11: *In vitro*-Aktivierung von aufgereinigten Kinasen durch cGMP unter Verwendung des Substratpeptides VASPTide. (A) Konzentrationswirkungskurven von cGKIα und cGKIβ. Die Daten stammen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die Aktivität war im Vergleich zu bereits vorliegenden Daten [51, 68, 89] geringfügig schwächer, konnte aber trotzdem hinreichend nachgewiesen werden. Als Substratpeptid wurde VASPTide (400μM) verwendet. Die K_a Werte für cGKIα lagen bei ca. 0.5μM und für cGKIβ im Mittel bei ca. 4.3μM. cGKIβ wird also verhältnismäßig schwächer von cGMP aktiviert als cGKIα. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ausschließlich mit diesen aufgereinigten cGKI-Enzymen gearbeitet.

C.1.3 Analyse von cNMPs mittels Phosphotransferaseassay

„Second messenger“ sind definiert als intrazelluläre Botenstoffe, deren Konzentration als Antwort auf eine primäre Reaktion (z. B. Bindung einer Substanz an einen Rezeptor) verändert werden kann. Hierdurch werden extrazelluläre Signale umgesetzt und intrazellulär weitergeleitet. cAMP und cGMP sind zyklische Nukleotide mit einer Purinstruktur, welche eine „second messenger“ Funktion aufweisen. Sie können cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinasen aktivieren, wodurch wiederum weitere, nachfolgende Schritte in den Signalkaskaden stimuliert werden. Weiterhin ist jedoch unklar, ob zyklische Nukleotide mit

Pyrimidinstruktur (z. B. cCMP) auch eine Rolle in physiologischen Prozessen bzw. als „second messenger“ spielen. Aufgrund der Strukturähnlichkeit und der zyklischen-Nukleotid-Eigenschaft lag die Vermutung nahe, dass auch cCMP ähnlich wie die purinen cNMPs reagieren kann. Um dies zu klären, wurden aufgereinigte Enzyme direkt mit cCMP stimuliert und anschließend deren katalytische Aktivität mittels (γ - ^{32}P)-ATP-Kinase-Assay bestimmt.

C.1.3.1 Aktivierung zyklisch-Nukleotid-abhängiger Kinasen in vitro durch cCMP

Es wurden ausschließlich die nach C.1.1 aufgereinigten cGMP-abhängigen Kinasen verwendet. cAK wurde kommerziell bei Sigma Aldrich erworben und cGKII stammte aus lehrstuhlinterne Vorräten bzw. wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Ruth (Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. In früheren Arbeiten am Lehrstuhl konnte bereits gezeigt werden, dass cCMP, unter Zugabe des Substratpeptids VASPtide in der Lage ist cAK, cGKI und cGKII zu stimulieren [89]. Basierend auf diesen Studien wurde das etablierte Substratpeptid VASPtide (RRKVSKQE) für Versuche mit Gewebelysaten eingesetzt. Zusätzlich wurde IRAGtide (RRRVSVAV) als ein neuartiges Substrat verwendet und für Versuche mit aufgereinigten Enzymen eingesetzt, um aufzuklären, ob die Stimulation Substrat-unabhängig abläuft. IRAGtide enthält das Serin 696 Motiv, die cGKI β Phosphorylierungsstelle von IRAG [142], und wurde via Festphasensynthese in Zusammenarbeit mit der Firma Coring synthetisiert. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass cAK, cGKII und beide cGKI Isoformen von cCMP unter Verwendung von IRAGtide aktiviert werden konnten. Die Stimulation stieg mit zunehmender cCMP-Konzentration an, die $K_a(\text{cCMP})$ Werte für cGKI α und cGKI β lagen im Mittel bei $26\pm 6\mu\text{M}$ bzw. $70\pm 5\mu\text{M}$, für cGKII bei $110\pm 8\mu\text{M}$ und für cAK bei $71\pm 11\mu\text{M}$. Somit stimulierte cCMP (analog cGMP) cGKI α stärker als cGKI β . cAK hingegen wurde von cCMP unter Verwendung von IRAGtide um den Faktor 1.5 stärker stimuliert (bei Vergleich der K_a -Werte) als unter Verwendung von VASPtide ($K_a(\text{cCMP})$: $106\pm 10\mu\text{M}$) [89]. Auch aufgereinigte cGKII war unter Verwendung von IRAGtide deutlich sensitiver gegenüber cCMP (Faktor 1.5). Diese Ergebnisse verdeutlichen desweiteren, dass cCMP, unter Verwendung der drei getesteten Substrate (VASPtide, IRAGtide und KEMPtide)cAK, cGKI und cGKII aktivieren kann. Die jeweilige Zunahme der Aktivität und somit die entsprechende Aktivitätskonstante hängen aber vom verwendeten Substratpeptid ab (Abbildung 14). Somit sind beide Substratpeptide für diese Art der Kinasen-Aktivitätsbestimmung gut geeignete „Tools“. Interessanterweise weichen die K_a -Werte, die man unter Verwendung von IRAGtide erhält, von den Literaturwerten (bestimmt unter Verwendung von VASPtide) leicht ab. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Substratspezifität für diese Kinasen durch Peptidsequenzen

vermittelt wird, die nicht in der übereinstimmenden Phosphorylierungssequenz enthalten sind.

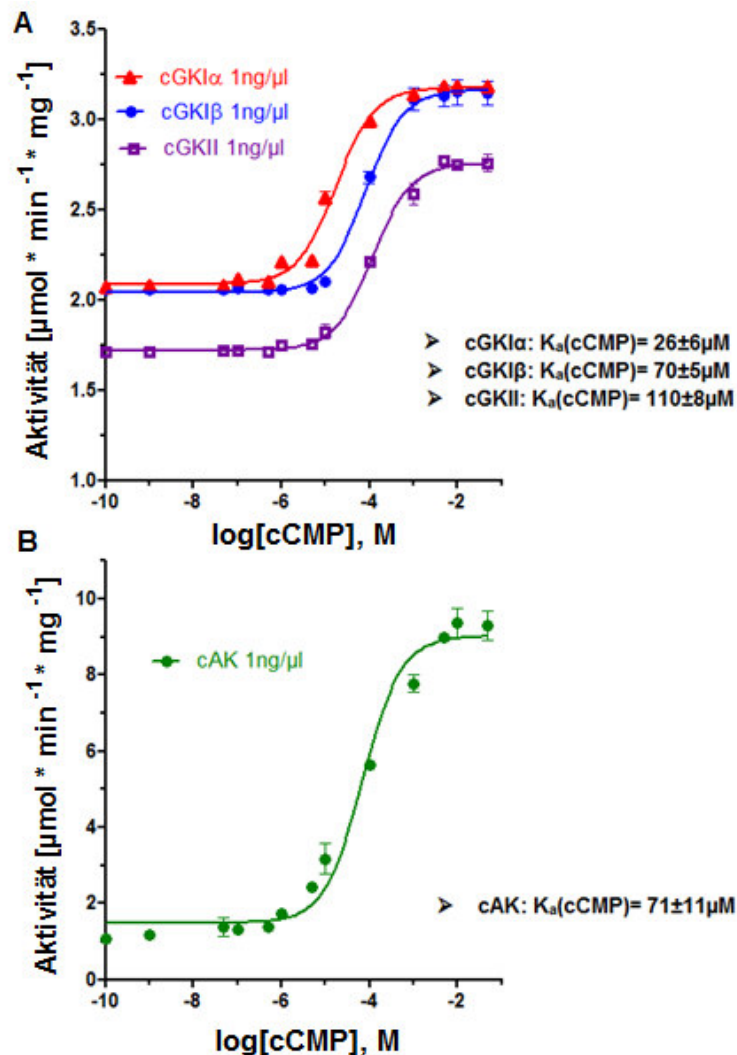
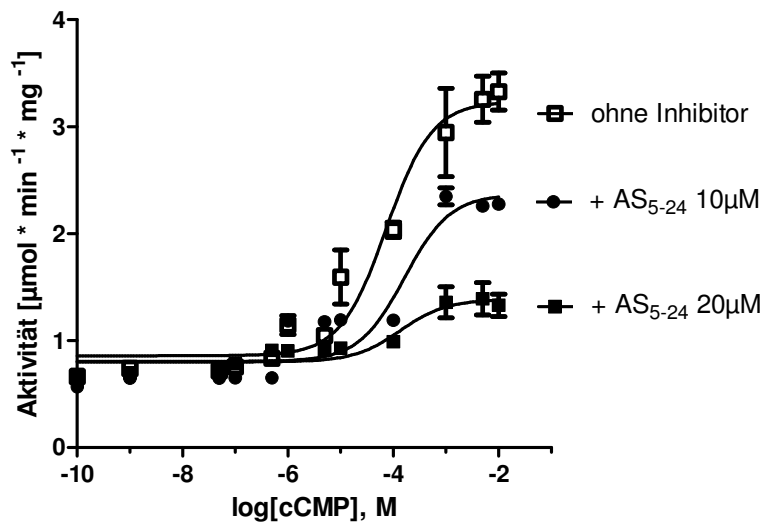


Abbildung 12: In vitro-Aktivierung von aufgereinigten Kinasen durch cCMP unter Verwendung des neuartigen Substratpeptides IRAGtide. (A) Konzentrationswirkungskurven von cGKI α , cGKI β und cGKI γ (murin) und (B) cAK (bovin, Herz). Die daraus resultierenden $K_a(\text{cCMP})$ -Werte sind in den Grafiken angegeben. Die Daten stammen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

C.1.3.2 Aktivierung endogener Kinasen in Gewebelysaten durch cCMP

Desweiteren wurde in dieser Arbeit geprüft, ob cCMP in der Lage ist auch endogene cGKs in verschiedenen Gewebelysaten zu stimulieren. Es wurde sowohl WT als auch cGKI-Knockout-Gewebe verwendet und nach B.2.4.1 aufbereitet und mittels Phosphotransferaseassay analysiert. Besonders Jejunum-, Lungen- und Nieren-Gewebe wurden hier genauer untersucht, da diese Gewebe hohe Konzentrationen an cGKs aufweisen [29]. Um eine cAK-vermittelte Phosphorylierung auszuschließen, wurde ein cAK-

Inhibitorpeptid zugegeben (AS₅₋₂₄), welches ein cAK-Substratpeptid imitiert und an die katalytische Domäne der cAK bindet. Zusätzlich zu cAK (K_i 2.3nM) hemmt AS₅₋₂₄ aber auch sehr schwach die cGK. Deswegen wurde in Vorversuchen eine AS₅₋₂₄-Konzentration ermittelt, bei der cGK noch hinreichend aktiv war und ausreichend stimuliert wurde, aber der cAK-Signalweg gehemmt wurde. Diese beträgt 10µM im Phosphotransferaseassay; niedrigere oder höhere Konzentrationen waren dabei nur bedingt geeignet (Abbildung 13).



- AS₅₋₂₄ 10µM: K_a(cAMP)= 164±90µM
- AS₅₋₂₄ 20µM: K_a(cAMP)= 134±93µM
- ohne Inhibitor: K_a(cAMP)= 74±36µM

Abbildung 13: Aktivitätsbestimmung endogener Kinasen in Lungen WT-Gewebelysaten unter cAMP-Stimulation (Substratpeptid VASptide 400µM) und Zugabe von unterschiedlichen AS₅₋₂₄-Konzentrationen (zur cAK-Blockade). Die entsprechenden K_a-Werte sind unterhalb angegeben. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden aus drei unabhängigen Experimenten erstellt.

Die Durchführung des Phosphotransferaseassays (B.2.7) mit Gewebelysaten erfolgte analog zu den Versuchen mit gereinigten Enzymen mit der Ausnahme, dass hier 5.0ng/µl Protein eingesetzt wurde. Es wurde versucht mit steigenden Konzentrationen an cNMP die Kinasen zu stimulieren. Anschließend wurden zwei repräsentative Konzentrationen (Abgleich mit dem EC₅₀-Wert) herausgegriffen und grafisch dargestellt. Die K_a(cNMP)-Werte wurden aus allen vermessenen Konzentrationen (cNMP) berechnet (B.2.7.2). Als Substratpeptide wurden VASptide, IRAGtide und KEMPTide (LRRASLG) eingesetzt. Letztgenanntes Substratpeptid war allerdings für diese Versuche weniger geeignet, da die Stimulation der Kinasen im Vergleich zu den beiden anderen Substraten deutlich erniedrigt war und auch der K_a-Wert (431±207µM) stark von den Literaturdaten abwich [89]. In Vorversuchen wurden Jejunum-

WT-Gewebelysate (jeweils 5.0ng/μl, keine cAK-Blockade) unter Verwendung von verschiedenen Substraten (jeweils 400μM) mit verschiedenen cCMP-Konzentrationen stimuliert und die EC₅₀-Werte bestimmt. Für VASPtide bzw.d IRAGtide ergaben sich K_a-Werte von 127±47μM bzw. 104±42μM (Abbildung 14). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde somit ausschließlich mit IRAGtide und VASPtide gearbeitet.

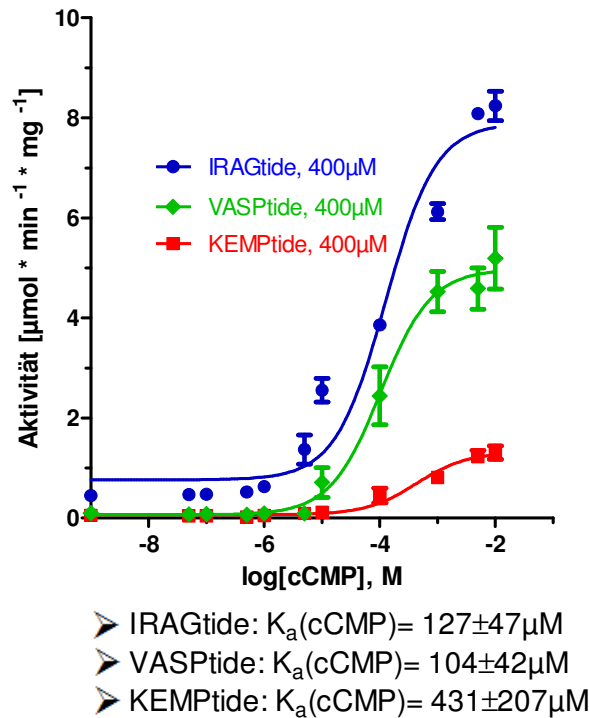


Abbildung 14: Aktivitätsbestimmung endogener Kinasen in Jejunum-WT-Gewebelysate unter cCMP-Stimulation und Verwendung von verschiedenen Substraten. Die entsprechenden K_a-Werte sind unterhalb angegeben. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden aus 3 unabhängigen Experimenten berechnet.

In Jejunum- und Lungengewebe konnte eine deutliche Stimulation der Kinasen mit cCMP erzielt werden. Im Nierengewebe, möglicherweise aufgrund dessen komplexen Aufbaus, war dieser Effekt schwächer zu detektieren. Kinasen in WT-Gewebelysaten phosphorylierten die Substratpeptide unter cAK-Blockade nach Gabe von 100μM cCMP im Mittel 2-2.5-fach im Vergleich zur Kontrolle (Stimulation mit Wasser). Eine Stimulation mit 5μM cCMP bewirkte hingegen nur einen geringen Anstieg der Kinasen-Aktivität (~1.2-fach) (Abbildung 15). Mit beiden Substratpeptiden wurden ähnliche Resultate erzielt. Die K_a(cCMP)-Werte unter Verwendung von IRAGtide lagen bei 140±35μM (Jejunum WT) und 63±15μM (Lunge WT). Für VASPtide wurden ein K_a-Wert(cCMP): 125±41μM (Jejunum WT) und ein K_a-Wert(cCMP) 78±24μM (Lunge WT) erzielt. Interessanterweise war diese Phosphorylierung in cGKI^{-/-}-Gewebe nicht detektierbar, was darauf hinweist, dass die cCMP-vermittelte Phosphorylierung in Jejunum- und Lungen-Gewebelysaten abhängig von cGKI ist.

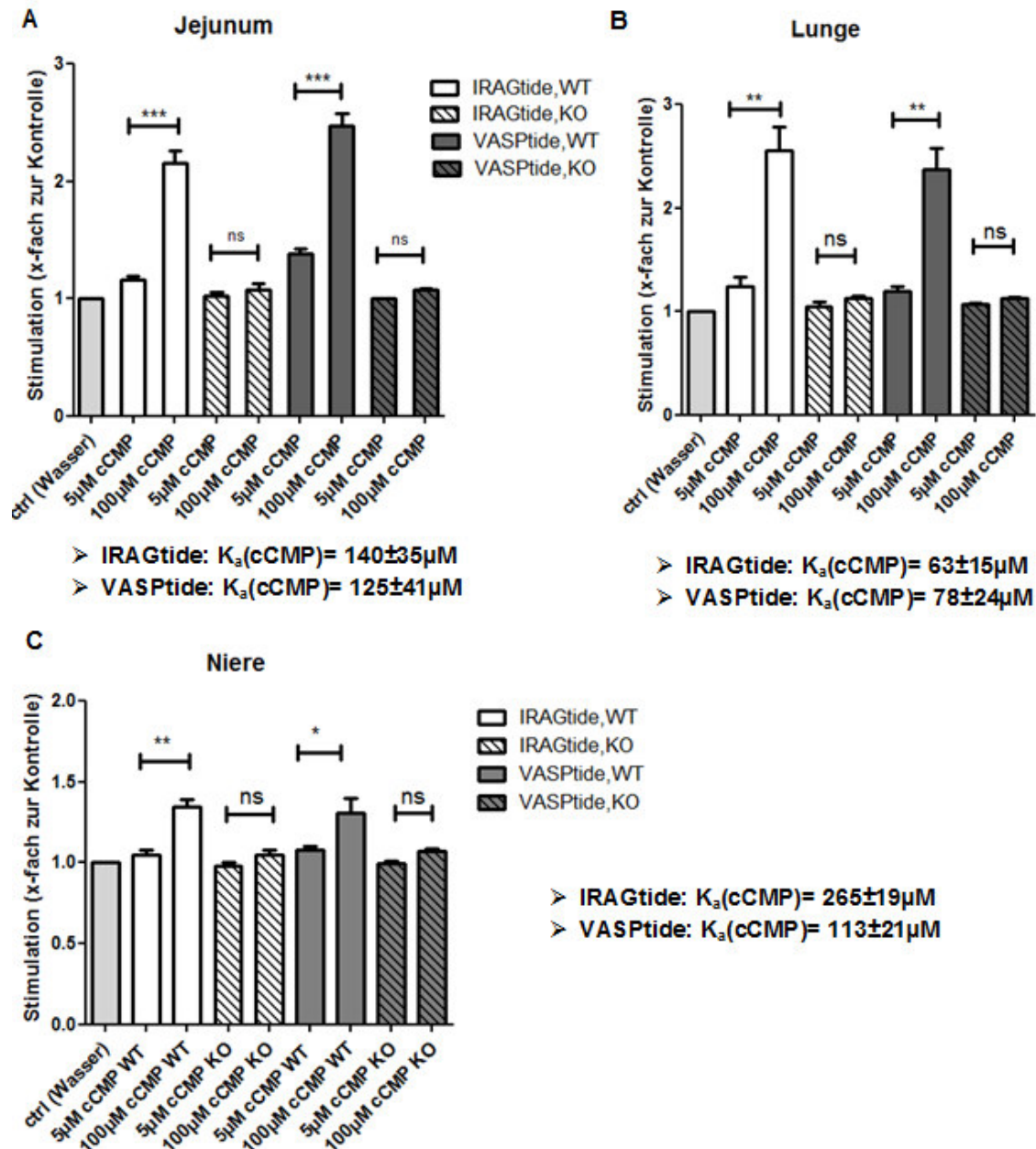


Abbildung 15: Aktivierung von cGMP-abhängigen Kinasen durch cAMP in Gewebe von WT- und cGKI-KO-Mäusen unter Verwendung zweier Substrate (IRAGtide bzw. VASPtide). Stimulation von endogenen cGKs in (A) Jejunum-Gewebelysaten, (B) Lungen-Gewebelysaten oder (C) Nieren-Gewebelysaten mit Wasser (ctrl) oder cAMP (5μM, 100μM) unter cAK-Blockade (Inhibitorpeptid AS₅₋₂₄). Die Stimulation mit Wasser wurde als Kontrollwert verwendet und mit "1" festgelegt. Es sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

C.1.3.3 Aktivierung endogener Kinasen in Gewebelysaten durch cGMP und cAMP

Zum besseren Vergleich der cAMP-Daten wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, bei denen ausschließlich mit cGMP bzw. cAMP stimuliert wurde (Abbildung 16). Die cAMP vermittelte Stimulation von endogenen Kinasen in WT-Gewebe war vergleichbar mit dem

cCMP-vermittelten Effekt (1.8-2.8-fache Stimulation). In cGKI-KO-Gewebelysaten konnte diese Phosphorylierung, analog zu cCMP, nicht mehr beobachtet werden. cAMP bewirkte, trotz Zugabe eines cAK-Inhibitors, eine verstärkte Phosphorylierung von Kinasen in Lungen-Gewebelysat von WT-Mäusen. In Jejunum- und in cGKI-KO-Gewebelysaten konnte keine Stimulation beobachtet werden. Möglicherweise lässt sich dieser Effekt durch eine Kreuzreaktion mit anderen Kinasen erklären. Die $K_a(\text{cGMP})$ -Werte für Jejunum WT betragen $2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ (IRAGtide), $3 \pm 1 \mu\text{M}$ (VASPtide) und für Lunge WT $15 \pm 8 \mu\text{M}$ (IRAGtide) bzw. $24 \pm 11 \mu\text{M}$ (VASPtide). Die katalytische Aktivität der Kinasen wurde in Gegenwart von steigenden cNMP-Konzentrationen vermessen (siehe B.2.7.2 Bestimmung der Aktivitätskonstanten für cNMPs (K_a -Wert)). Weiterhin wiesen die Kinasen in Jejunum-WT-Gewebelysaten unter Verwendung von IRAGtide und verglichen mit $K_a(\text{cCMP})$ einen ca. 70-fach erniedrigten $K_a(\text{cGMP})$ -Wert auf. Somit sind möglicherweise höhere cCMP-Konzentrationen (im Vergleich zu cGMP) notwendig, um endogene Kinasen *in vivo* zu aktivieren. Die Affinität, mit der cCMP an cGMP-abhängige Kinasen bindet ist, in Relation zu cGMP, deutlich niedriger.

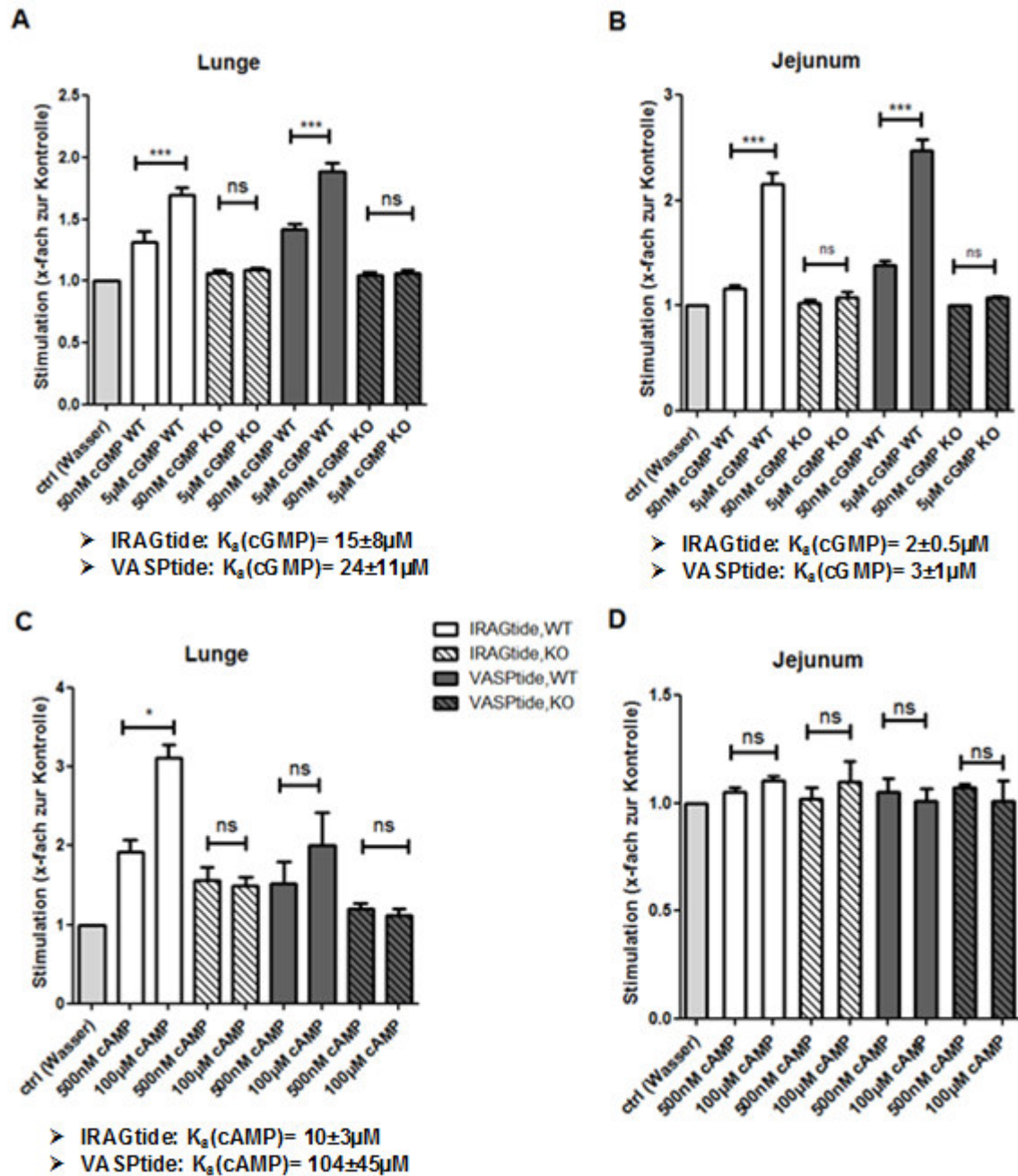


Abbildung 16: Aktivierung von cGMP-abhängigen Kinasen durch cGMP bzw. cAMP in Gewebe von WT- und cGKI-KO-Mäusen unter Verwendung zweier Substrate (IRAGtide bzw. VASptide). Stimulation von endogenen cGKs in (A) Lungen-Gewebelysaten bzw. (B) Jejunum-Gewebelysaten mit Wasser (ctrl) oder cGMP (50nM und 5µM) unter cAK-Blockade. Stimulation von endogenen cGKs in (C) Lungen-Gewebelysaten und (D) Jejunum-Gewebelysaten mit Wasser (ctrl) oder cAMP (500nM und 100µM) unter Zugabe eines cAK-Inhibitorpeptids. Die Stimulation mit Wasser wurde als Kontrollwert verwendet und mit "1" festgelegt. Es sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

C.2 Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen

Die Existenz des zyklischen Cytidin-3',5'-monophosphats (cCMP) wurde lange Zeit angezweifelt. In den späten 70er Jahren wurde von Cech und Ignarro [80] die Existenz von cCMP in verschiedenen Geweben beschrieben. Aufgrund der, zur damaligen Zeit, noch nicht vollständig ausgereiften Analysemethoden und der geringen cCMP-Spiegel *in vivo* wurde dieser Nachweis allerdings angezweifelt. Kürzlich konnte aber die Existenz von cCMP durch hochsensitive Methoden (LC-MS/MS) nachgewiesen werden [76]. Daher war es in dieser Arbeit ein Ziel, mögliche cCMP-bindende Proteine zu identifizieren.

C.2.1 Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen mittels Affinitätschromatographie und Silberfärbung

Wie in C.1. bereits festgestellt wurde, reagiert cCMP ähnlich wie cGMP. Eine mögliche cCMP-vermittelte Interaktion mit cGK und cAK wurde deshalb mittels cCMP-Affinitätschromatographie (B.2.5.2) genauer untersucht. Hierbei wurde Agarose verwendet, an die mit sogenannten Linkern cCMP gebunden ist. Als Fällungspuffer wurde 2% Lubrolpuffer mit Salzkonzentrationen von 150-300mM NaCl eingesetzt. Je höher die Salzkonzentration, desto spezifischer ist die Bindung an die Matrix. Nach Vorversuchen zeigte sich, dass eine Konzentration von 250mM im Fällungspuffer am geeignetsten war. Spezifisch und unspezifisch gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE (B.2.4.5) aufgetrennt und via Silberfärbung (B.2.4.7) bzw. Western Blot (B.2.4.8, C.2.2.) genauer analysiert. Um die Spezifität einer Bindung zu verdeutlichen, wurde im Überschuss cCMP zugegeben. Dadurch wurden spezifisch an die cCMP-Agarose gebundene Proteine losgelöst und abgetrennt. In den folgenden Experimenten wurde jeweils eine Probe mit einem Überschuss cCMP behandelt (gekennzeichnet mit „+“), mit „-“ gekennzeichnete Proben wurde kein zusätzliches cCMP zugegeben und mit "Ctrl." wurde die Negativkontrolle mit EtOH-NH-Agarose bezeichnet. Bei den „+“ Proben wurde eine cCMP Konzentration von 2mM zugegeben. Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives silbergefärbtes Polyacrylamid-Gel unter Verwendung der 4-AH-cCMP-Agarose. Spezifisch gefällte Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufbereitet und via Massenspektrometrie analysiert (siehe B.2.4.7 Silber-Färbung). cGKI α (76kDa) und die regulatorische Untereinheit der cAK II α (50kDa)/I α (47kDa) wurden so als cCMP-bindende Proteine identifiziert (siehe Tabelle 11 im Anhang).

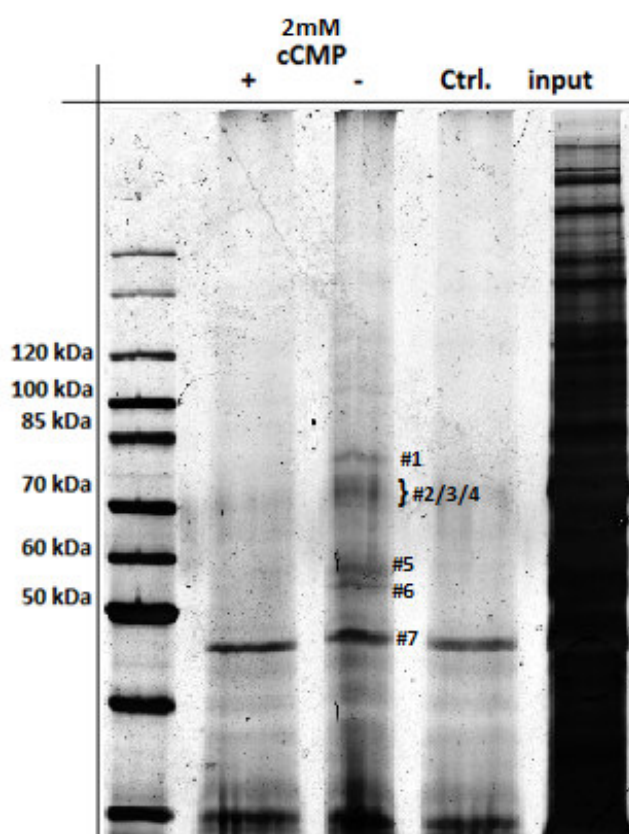


Abbildung 17: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in WT-Lungen-Gewebelysat via cCMP-Agarosefällung, SDS-PAGE und Silberfärbung. Es wurden 4-AH-cCMP-Agarose und EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) verwendet. cCMP wurde im Überschuss („+“) zugegeben, oder weggelassen („-“). „Input“ bezeichnet das eingesetzte Gesamtlusat. #1 entspricht cGKI α , #2 und #4 ist Serum Albumin, mit #3 wurde HSP71 und 5'-Nucleotidase bezeichnet, #5 und #6 entsprechen cAK II α /I α reg und #7 kennzeichnet Aktin und das 60S ribosomale Protein L4 (Tabelle 11). Spezifisch gefällte Proteine wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie untersucht.

C.2.2 Identifizierung cCMP-bindender Proteine mittels Affinitätschromatographie und Western Blot

Da die Silberfärbung, verglichen mit anderen Methoden, einerseits sehr empfindlich detektiert, andererseits jedoch variabel und schwer reproduzierbar ist, wurde dieses Ergebnis nochmals mittels Western Blot bestätigt. Hier wurden primäre Antikörper eingesetzt, die spezifisch gegen die gefällten Proteine gerichtet sind und diese somit sicher nachweisen. Es wurde mit den primären Antikörpern cGKIcommon (Detektion von cGKI α und cGKI β , lehrstuhlinterne Herstellung), cGKII (freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Ruth zur Verfügung gestellt) und cAK I α /I β reg gearbeitet. Auch hier wurde wieder im Überschuss cCMP zugegeben („+“) bzw. dies unterlassen („-“). Für diese cCMP-Fällung standen 2 verschiedene Agarosen zur Auswahl, die 4-AH-cCMP-Agarose (über die 4-NH-Gruppe des

Pyrimidin-Rings an die Matrix gebunden) und die 2'-AHC-cCMP-Agarose, bei der cCMP mittels 2'-O-Ribosyl-Gruppe an die Agarose gebunden ist [87]. Interessanterweise interagiert nur die 4-AH-cCMP-Agarose mit den untersuchten Proteinen. 2'-AHC-cCMP-Agarose war nicht geeignet, da die Proteine hier nicht gebunden wurden (Abbildung 18). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die 2'-OH-Gruppe essentiell für die Interaktion ist, bzw. dass aufgrund sterischer Probleme keine Bindung zustande kommt. Somit wurde in den nachfolgenden Experimenten ausschließlich mit 4-AH-cCMP-Agarose gearbeitet. Abbildung 18 zeigt einen repräsentativen Blot für eine cCMP-Fällung mit beiden cCMP-Agarosen. Es wurde hier cGKI α gefällt. Das Enzym wurde ausreichend an die 4-AH-cCMP Agarose gebunden und ließ sich mit einem Überschuss cCMP eluieren. Die Bindung von cGKI α und cCMP war somit spezifisch. cGKI α wurde hingegen nicht an die 2'-AHC-cCMP Agarose gebunden und konnte infolgedessen natürlich nicht eluiert werden.

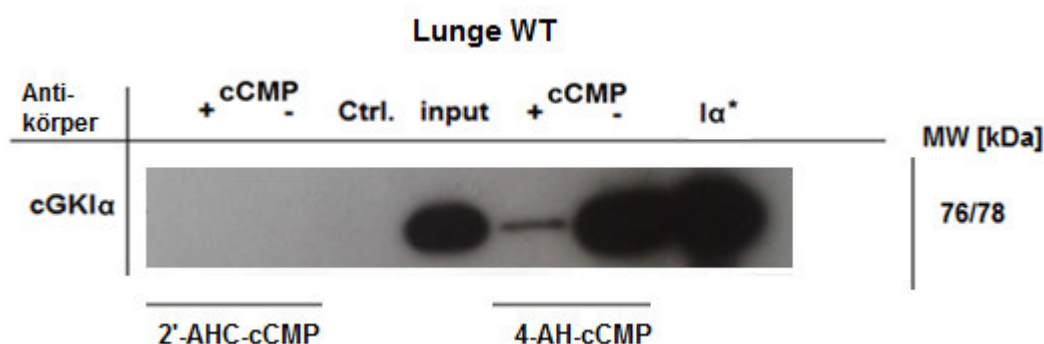


Abbildung 18: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in WT Gewebe unter Verwendung von verschiedenen cCMP-Agarosen. Lungen-Gewebelysate wurde mit 4-AH-cCMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert. Für die Kompetition wurde 2mM cCMP zugegeben („+“) bzw. durch Wasser ersetzt („-“). Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot, zur Kontrolle wurden Gesamtlisat („input“, 1 μ g/ μ l) und aufgereinigtes cGKI α („l α^* “, 1.5ng/ μ l) aufgetragen.

Bei den „+“ Proben wurde hier eine cCMP Konzentration von 2mM verwendet (Abbildung 19), aber auch mit 200 μ M wurde gearbeitet (Abbildung 20). Es wurden zu Beginn der Arbeit vier verschiedene Gewebe analysiert, nämlich Lunge, Jejunum, Niere und Hirn. In allen untersuchten WT-Gewebelysaten kam es zu einer spezifischen Interaktion von cGKI, cGKII und cAK I α /I β reg mit cCMP. War die Bindung der Proteine an die cCMP-gekoppelte Matrix spezifisch, wurde idealerweise nur eine Bande bei den „-“-Proben detektiert. Eine entsprechende Bande in der „+“-Spur sollte nicht auftauchen bzw. schwächer zu sehen sein. Zusätzlich wurden die Proteine bei dieser Art der Fällung aufkonzentriert, sodass die Banden, verglichen mit dem „input“ (unbehandeltes Gewebelysate, 1 μ g/ μ l) stärker ausgeprägt sind. Als Kontrollen wurden zusätzlich aufgereinigte Enzyme (gekennzeichnet mit *, jeweils 1.5ng/ μ l) verwendet. cGKI wurde auf Höhe von 76kDa (cGKI α) und 78kDa (cGKI β), cGKII bei 83kDa und die regulatorische Untereinheit von cAK I α /I β bei 47/50-52kDa detektiert.

cGKI konnte in allen vier Gewebetypen gefällt werden, wobei die analysierten Enzyme in Lungen- und Jejunum-Gewebe am deutlichsten gefällt werden konnten. cGKII wird besonderes stark im Jejunum exprimiert, deshalb war hier die entsprechende Fällung deutlicher zu detektieren. Die regulatorische Untereinheit der cAK wurde besonders in Hirn und Jejunum deutlich gefällt, wobei in der entsprechenden „+“-Bande zu erkennen ist, dass beide Untereinheiten gefällt wurden ($I\alpha$ 47kDa, $I\beta$ 50-52kDa). Da die Fällungen mit Jejunum- und Lungengewebe besonders gut durchzuführen und zu reproduzieren waren, wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich mit diesen Geweben gearbeitet.

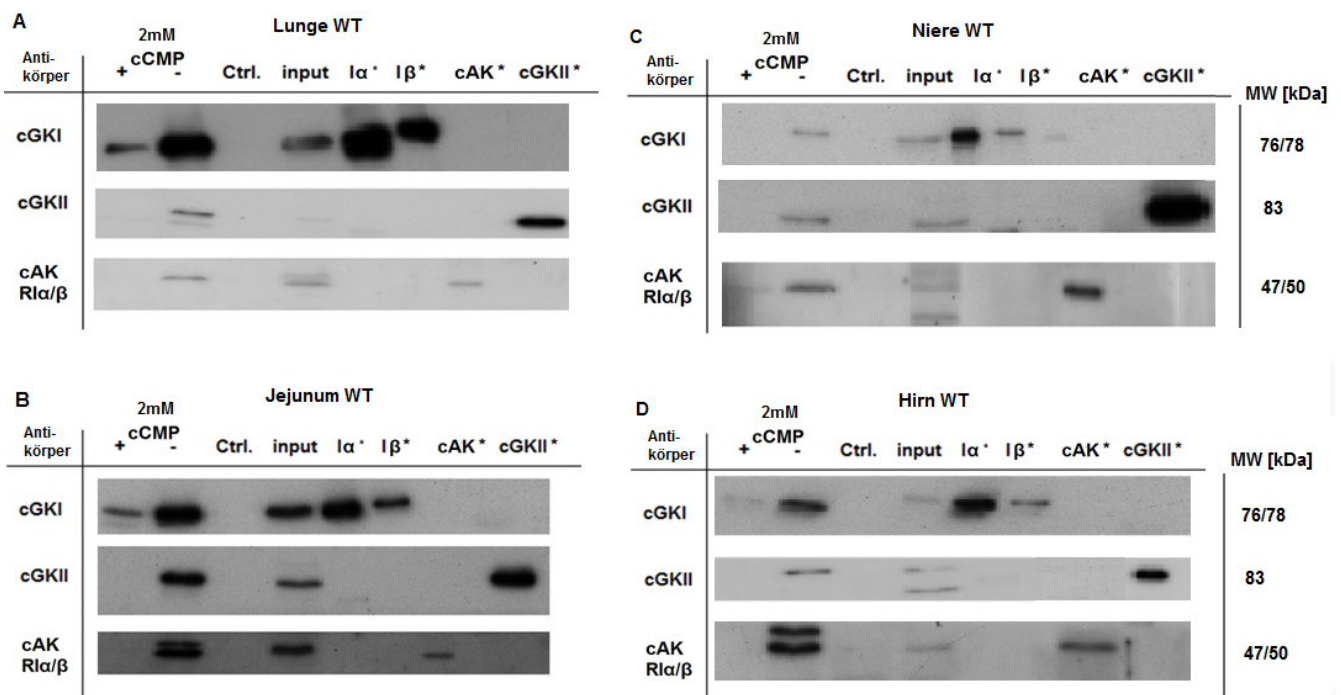


Abbildung 19: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in verschiedenen WT-Gewebelysaten. (A) Lungen-Gewebelysate wurde mit 4-AH-cCMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert. Für die Konkurrenz wurde 2mM cCMP zugegeben („+“) bzw. durch Wasser ersetzt („-“). Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot, zur Kontrolle wurden Gesamtylat („input“, $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und aufgereinigte Enzyme ($1.5\text{ng}/\mu\text{l}$) aufgetragen. Das Experiment wurde analog zu (A) mit (B) Jejunum-, (C) Nieren- und (D) Hirn-Gewebelysaten durchgeführt.

Zusätzlich wurde dieses Experiment unter Verwendung von Jejunum- und Lungenlysat mit $200\mu\text{M}$ cCMP durchgeführt. Diese Konzentration ist, im Vergleich zu 2mM, physiologischer und erlaubte somit mögliche Rückschlüsse auf *in vivo* Vorgänge. Auch hier konnte eine spezifische Interaktion von cGKI, cGKII und cAK (reg. UE) mit cCMP-Agarose detektiert werden.

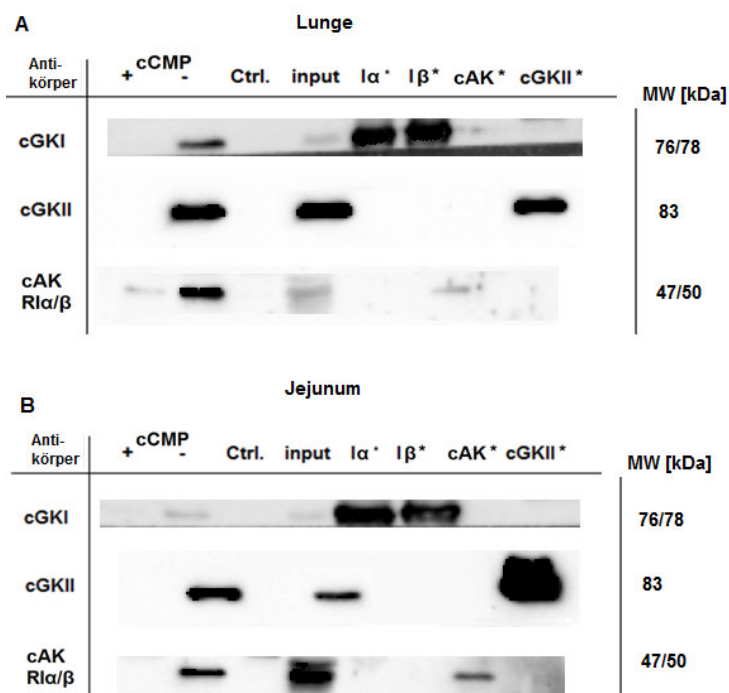


Abbildung 20: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in verschiedenen WT-Gewebelysaten. (A) Lungen-Gewebelysate wurde mit 4-AH-cCMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert. Für die Konkurrenz wurde 200 μ M cCMP zugegeben („+“) bzw. durch Wasser ersetzt („-“). Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot, zur Kontrolle wurden Gesamtlisat („input“, 1 μ g/ μ l) und aufgereinigte Enzyme (1.5ng/ μ l) aufgetragen. Das Experiment wurde analog zu (A) mit (B) Jejunum-Gewebelysate durchgeführt.

C.2.3 Spezifität der cCMP-Affinitätschromatographie

Weiterhin wurde geprüft, ob eine Zugabe von cAMP die Interaktion zwischen cGKI und der cCMP-beladenen Matrix hemmen könnte (Abbildung 21). Auch hier wurden wieder Gewebelysate mit 4-AH-cCMP-Agarose inkubiert und anschließend ein Überschuss an cAMP (anstatt cCMP) zugegeben. Die cGMP-abhängige Proteinkinase I wurden aber, im Gegensatz zu den Experimenten mit cCMP, nicht spezifisch gefällt. Der Anteil an unspezifisch gefälltem Protein überwog hier. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass cCMP ähnlich einem cAMP-Analogen reagiert.

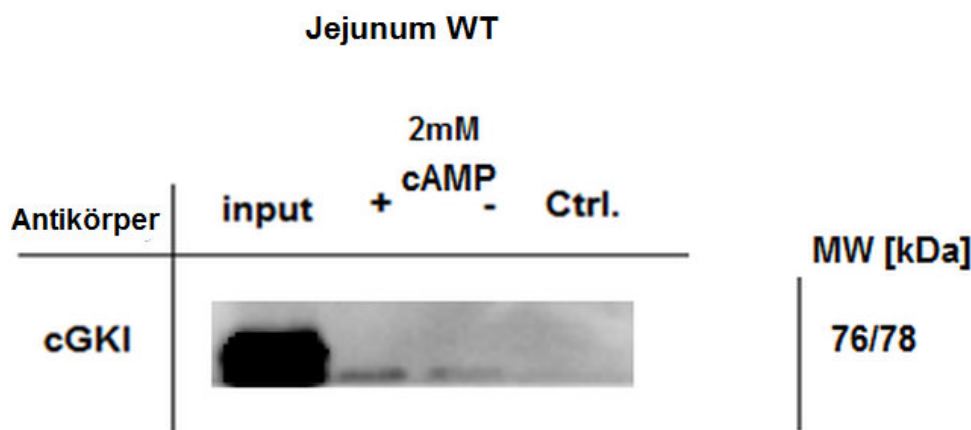


Abbildung 21: Agarose-Fällung unter cAMP-Kompetition. Jejunum-WT-Gewebelysate wurden mit 4-AH-cCMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert und anschließend mit einem Überschuss cAMP (2mM) versetzt. Gebundene Proteine wurden mittels Gelelektrophorese/Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde Gesamtllysate aufgetragen (1µg/µl).

C.3 Interaktion der MAPK (ERK 1/2) mit cGK- Allgemeine biochemische Versuche

Bei der cGMP-abhängigen Proteinkinase handelt es sich um eine Serin-Threonin Kinase, welche die Hydroxygruppen des Serins/Threonins phosphorylieren kann und durch zyklische Nukleotide (z. B. cGMP) reguliert wird. In den letzten Jahren wurde immer häufiger ein Zusammenhang zwischen cGK und der Regulation des Zellzyklus diskutiert. Dabei gibt es Hinweise, dass das Zellwachstum bzw. die Zellproliferation durch cGK moduliert wird [143, 144]. Dieser Effekt wird in Zusammenhang mit einer Interaktion von cGK mit dem MAPK-Signalweg gebracht [116, 144-146]. Unter dem MAP-Kinase-Signalweg (MAPK: mitogen-activated protein kinase) versteht man einen Signalweg, bei dem in einer Kaskade Kinasen der Reihe nach aktiviert/phosphoryliert werden (MAP-3K, MAP-2K, MAP-K) und somit das Zellwachstum bzw. die Apoptose, aber auch die Proliferation, beeinflusst werden kann. Nach wie vor ist aber nicht bekannt, ob und wie der cGMP (cCMP)/cGK-Signalweg und der MAPK-Signalweg miteinander interagieren.

C.3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen MAPK und cCMP mittels cCMP-Affinitätschromatographie

Um eine mögliche Interaktion zwischen cCMP und MAPK genauer zu analysieren, wurden wiederum cNMP-Agarosefällungen (B.2.5.2) durchgeführt. Es wurden sowohl Lungen- als auch Jejunum-Gewebelysate untersucht. Es wurde 4-AH-cCMP- und EtOH-NH-Agarose verwendet und mit cCMP eluiert. Auch hier wurde zuerst ein „Vorversuch“ mit 2mM cCMP durchgeführt (Abbildung 22A/B) und anschließend eine cCMP-Konzentration (200µM)

eingesetzt, die mehr den physiologischen Bedingungen entspricht (Abbildung 22C/D). Bei beiden eingesetzten cCMP-Konzentrationen konnte eine spezifische Interaktion von cCMP mit MAPK detektiert werden. Sowohl im Lungengewebe, als auch im Jejunumgewebe bewirkte die Zugabe eines cCMP-Überschusses eine verminderte Bindung der MAPK an die Matrix. Dadurch konnten in den nachfolgenden Western Blots keine bzw. schwächere Banden in der „+“ Lane detektiert werden. Interessanterweise wurde hauptsächlich die p42 MAPK-Isoform gefällt bzw. aufkonzentriert.

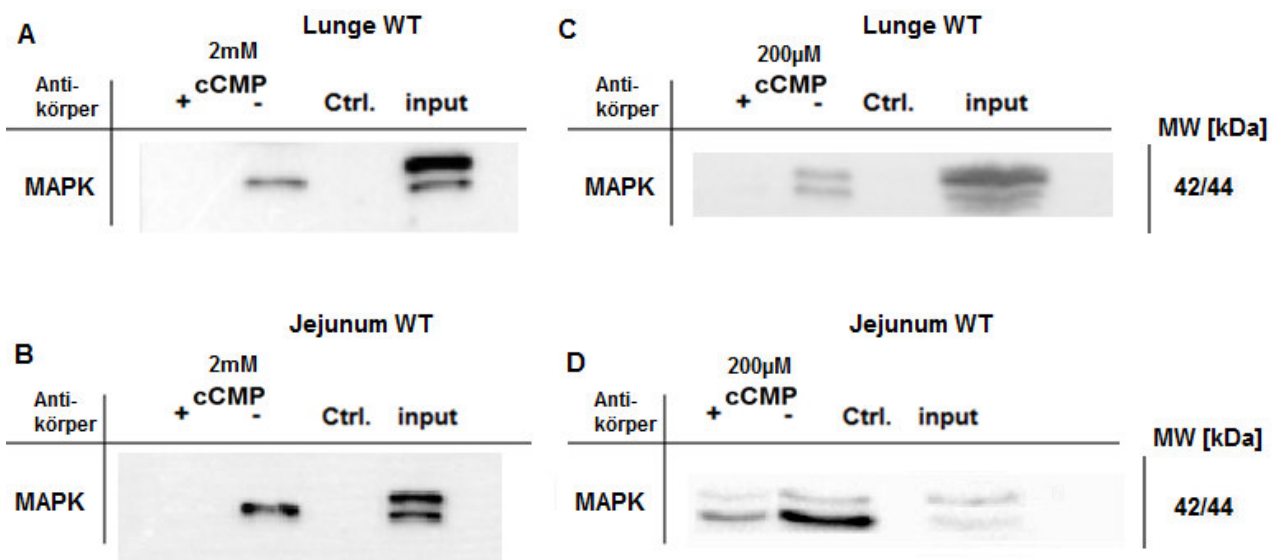


Abbildung 22: Identifizierung von MAPK als cCMP-bindendes Protein in verschiedenen WT-Gewebelysaten. (A) Lungen-Gewebelysate wurde mit 4-AH-cCMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert. Für die Konkurrenz wurde 2mM cCMP (A/B) bzw. 200µM cCMP (C/D) zugegeben („+“) bzw. durch Wasser ersetzt („-“). Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem gegen p44/p42 MAPK gerichteten Antikörper. Zur Kontrolle wurden Gesamtlisat („input“, 1µg/µl) aufgetragen. Das Experiment wurde analog zu (A/C) mit (B/D) Jejunum-Gewebelysate durchgeführt.

Da eine direkte Interaktion zwischen cCMP und MAPK aber unwahrscheinlich ist (keine cNMP-Bindungsstelle), lag die Vermutung nahe, dass cCMP über die Aktivierung/Bindung einer anderen Kinase (z. B. cGK) mit dem MAPK-Signalweg interagiert. Um zu klären, ob cGKI bzw. cGKII essentiell für die Interaktion zwischen MAPK und cCMP sind, wurden verschiedene cCMP-Agarose-Fällungen mit cGKI^{-/-} und cGKII^{-/-} KO-Gewebe durchgeführt. Auch hier wurde wieder im Überschuss cCMP 2mM (Abbildung 23A/B) bzw. 200µM (Abbildung 23C/D) zugegeben, um spezifische Bindungen detektieren zu können. MAPK wurde sowohl in cGKI^{-/-}, als auch in cGKII^{-/-} Gewebelysaten gefällt. Die Bindung an die cCMP-beladene Matrix war spezifisch. Auch hier konnte beobachtet werden, dass hauptsächlich die p42-Isoform der MAPK gefällt wurde und die typische Aufkonzentrierung bei der „+“-Lane ausblieb. Die Ergebnisse mit KO-Lungengewebe sind also gleich zu denen,

die mit WT-Gewebe erzielt wurden, was darauf hinweisen würde, dass weder cGKI, noch cGKII einen Einfluss auf die Interaktion von cCMP mit MAPK haben. In KO-Jejunumgewebe konnte allerdings ein anderes Ergebnis erzielt werden. Hier interagiert die MAPK nur in cGKII-KO-Gewebe spezifisch mit der cCMP-Agarose. Interessanterweise war die Interaktion unter Verwendung von 2mM cCMP deutlich spezifischer als unter Verwendung von 200µM cCMP. In cGKI-KO-Gewebe wurde diese Interaktion nicht detektiert; hier wurde keine MAPK gefällt. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass p44/42 MAPK in diesem Gewebe nicht ausreichend vorhanden war und/oder dass cGKI im Jejunum essentiell für die Interaktion von MAPK mit cCMP ist.

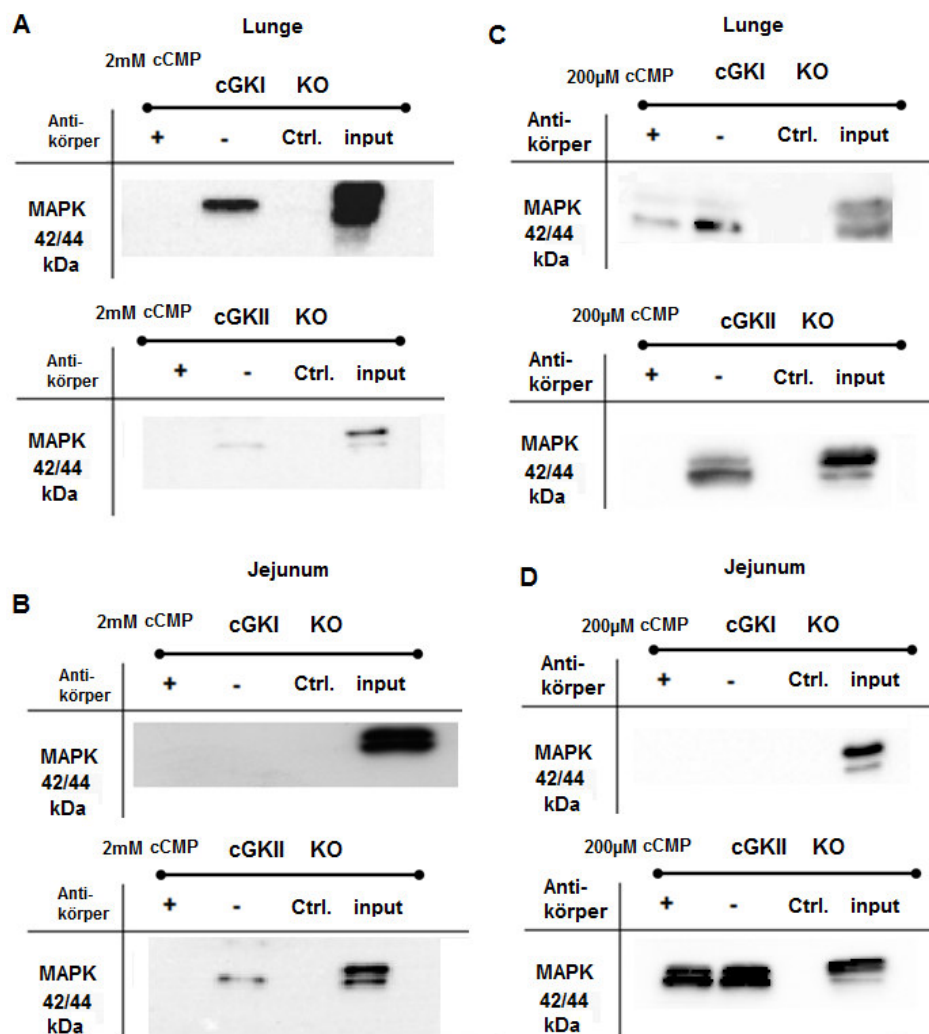


Abbildung 23: Identifizierung von MAPK als cCMP-bindendes Protein in verschiedenen KO-Gewebelysaten. (A) cGKI^{-/-} bzw. cGKII^{-/-} Lungen-Gewebelysate wurde mit 4-AH-cCMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert. Für die Konkurrenz wurde 2mM cCMP (A/B) bzw. 200µM cCMP (C/D) zugegeben („+“) bzw. durch Wasser ersetzt („-“). Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem gegen p44/p42 MAPK gerichteten Antikörper. Zur Kontrolle wurden Gesamtylat („input“, 1µg/µl) aufgetragen. Das Experiment wurde analog zu (A) mit (B) cGKI^{-/-} bzw. cGKII^{-/-} Jejunum-Gewebelysat durchgeführt.

C.3.2 Untersuchung der Interaktion zwischen MAPK und cGK mittels Co-Immunpräzipitation

Im nächsten Schritt wurde somit mittels Co-Immunpräzipitation (B.2.5.1) versucht eine mögliche Protein-Protein-Interaktion zwischen MAPK und cGK nachzuweisen. Dazu wurde Protein-A-Sepharose mit Lubrolpuffer gewaschen und mit BSA-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (gegen das zu fällende Protein gerichtet) an die Sepharose gebunden. In dieser Arbeit wurde hierfür der polyklonale p44/42 MAPK Antikörper eingesetzt. Nach erfolgter Kopplung des Antikörpers an die Matrix wurden die Gewebelysate zugegeben. Am nächsten Tag konnten die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert werden. Der fertige Blot wurde mit primären Antikörpern, gerichtet gegen cGKI α bzw. gegen cGKII, behandelt. Dadurch konnte eine Interaktion zwischen cGKI α /MAPK bzw. cGKII/MAPK nachgewiesen werden (Abbildung 24). Die detektierten Banden waren allerdings nur sehr schwach ausgeprägt, was darauf hindeuten würde, dass die Interaktion zwischen cGK und MAPK nur indirekt, über ein noch unbekanntes Adapterprotein, möglich ist. Eine Interaktion zwischen cGKI β /MAPK konnte hingegen nicht bewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde versucht, primäre cGK-Antikörper (cGKI bzw. cGKII) an die Sepharose zu koppeln und im Western Blot mit einem p44/42 MAPK Antikörper zu arbeiten. Dies war allerdings nicht möglich, da beide Antikörper von derselben Spezies stammten (rabbit) und eine Antikörperbande bei ca. 50kDa den Nachweis von MAPK erheblich störte. Diese Antikörperbande wurde durch den sekundären Antikörper sichtbar gemacht, der die heavy-chain (~50kDa) und die light-chain (~25kDa) des denaturierten primären Antikörpers (gebunden an Protein-A-Sepharose) erkennt.

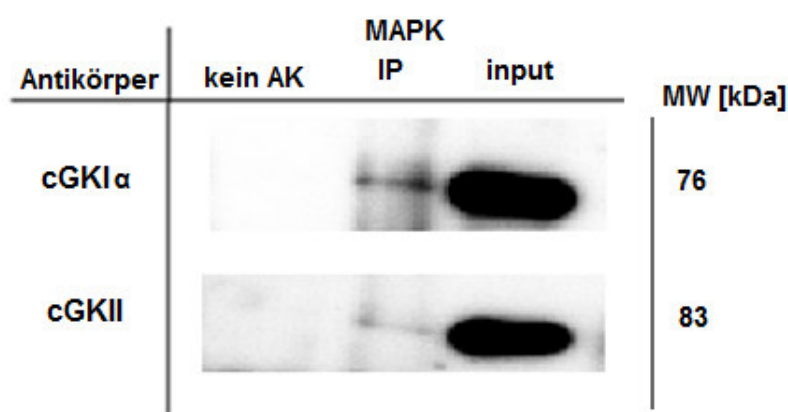


Abbildung 24: Detektion der Protein-Protein-Interaktion zwischen cGK und MAPK mittels Co-Immunpräzipitation. Jejunum-Gewebelysat (WT) wurde mit Protein-A-Sepharose (gekoppelt mit p44/p42 MAPK Antikörper) inkubiert. Nach der Fällung, wurden die Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei primäre Antikörper, gerichtet gegen cGKI α und cGKI β eingesetzt wurden. Bei der Immunpräzipitation (IP) wurde als Kontrolle unbehandeltes Gewebelysat ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, „input“) verwendet. Als Negativkontrolle („kein AK“) wurde nicht mit Antikörper gekoppelte Protein A Sepharose verwendet.

C.3.3 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen MAPK und cGMP

Eine Theorie bestand darin, dass auch cGMP, aufgrund der Strukturähnlichkeit zu cCMP, mit MAPK interagieren könnte. Hierzu wurden Fällungen mit 8-AET-cGMP-Agarose durchgeführt. Analog zu den cCMP-Agarose-Fällungen, wurden die an die Matrix gebundenen Proteine mit einem Überschuss cGMP ($200\mu\text{M}$) eluiert, um eine Aussage über die Spezifität der Bindung treffen zu können. Als Kontrolle wurde wiederum mit EtOH-NH-Agarose gearbeitet und das verwendete Gesamtylat aufgetragen. Abbildung 25 zeigt, dass sowohl cGKI, als auch cGKI β spezifisch an cGMP gebunden wurde (in Lungen-WT-Gewebe), was bereits hinreichend bekannt ist [28, 29]. Im Gegensatz dazu wurde aber MAPK sowohl in Jejunum-WT-Gewebe, als auch in Lungen-WT-Gewebe nur unspezifisch gebunden. Die Banden der „+“ und der „-“ Lane waren gleich stark ausgeprägt bzw. stärker bei der „+“ Lane. Zudem kam es auch hier zu keiner Aufkonzentrierung der gefällten MAPK, was auf eine indirekte Wechselwirkung hindeuten würde. Es lag somit keine spezifische Interaktion zwischen cGMP und MAPK vor.

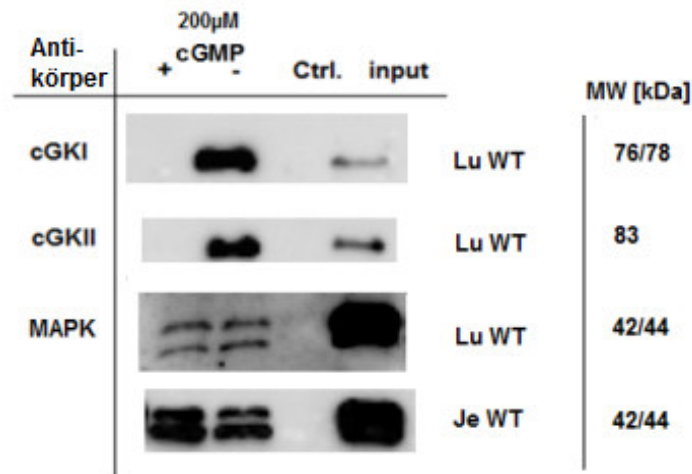


Abbildung 25: Identifikation von cGMP-bindenden Proteinen in verschiedenen WT-Gewebelysaten. WT-Lungen- bzw. Jejunum-Gewebelysate wurde mit 8-AET-cGMP-Agarose bzw. EtOH-NH-Agarose (Ctrl.) inkubiert. Für die Kompetition wurde 200µM cGMP zugegeben („+“) bzw. durch Wasser ersetzt („-“). Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit folgenden primären Antikörpern: cGKIcommon, cGKII, p44/p42 MAPK. Zur Kontrolle wurde Gesamtylsat („input“, 1µg/µl) aufgetragen.

C.4 Interaktion der MAPK (ERK 1/2) mit cGK-Phosphorylierungsversuche

Durch Interaktion von zyklischen Nukleotiden mit Proteinen kommt es zu einer Konformationsänderung der entsprechenden Proteine, die wiederum deren Aktivität beeinflusst. Beispielsweise werden Serin/Threonin-Kinasen (cGK, cAK) durch zyklische Nukleotide aktiviert und infolgedessen auto-phosphoryliert. Auch MAPK zählt zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und ist maßgeblich an zellulären Prozessen, wie Apoptose und Proliferation, beteiligt. Es existieren zahlreiche Arbeiten [115, 117, 144], die auf einen Zusammenhang zwischen dem MAPK-Signalweg und dem NO/cGMP/cGK-Signalweg hinweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits eine Interaktion zwischen cGK/MAPK gezeigt werden. Wie dieses Zusammenspiel allerdings zustande kommt bzw. im Einzelnen abläuft, war weiterhin unklar. Daher wurde anhand von Phosphorylierungsstudien versucht, diese Wechselwirkung genauer aufzuklären.

C.4.1 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung

Zunächst wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von MAPK durch cCMP beeinflusst werden konnte. Später wurde dann auch mit anderen zyklischen Nukleotiden gearbeitet. Hierfür wurden WT-Gewebelysate (Jejunum und Lunge), wie in B.2.6 beschrieben, aufbereitet und mit 100µM Dibutyryl-cCMP (DB-cCMP) stimuliert. Der Vorteil der cNMP-

Analoga besteht darin, dass sie lipophiler und somit membrangängiger und widerstandsfähiger gegenüber einer PDE-vermittelten Hydrolyse sind. Die beiden Butyryl-Reste sitzen jeweils an der 2'-O-Ribosyl- und der Amino-Gruppe am Pyrimidin-Ring. Intrazellulär wird jedoch nur die erstgenannte Butyryl-Gruppe abgespalten, sodass der aktive Metabolit ein Monobutyryl-cCMP (MB-cCMP) ist [147, 148]. Die Stimulation erfolgte 15-60min bei 37°C. Ein Inhibitor wurde zu Beginn der Experimente nicht zugegeben und durch Wasser ersetzt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE/Western Blot aufgetrennt und analysiert. In Vorversuchen musste zunächst geklärt werden, ob DB-cCMP ein geeignetes cCMP-Analogon für dieses Experiment ist und wie die Zeitkinetik der Phosphorylierung abläuft. Hierzu wurde Jejunum-Gewebelysat (WT) für 60min mit DB-cCMP stimuliert bzw. statt dem Analogon nur Wasser zugegeben. Anschließend wurden die Proben mittels Immunoblotting analysiert. Es wurde auf Stimulation der MAPK und auch auf Stimulation des VASPs (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) geprüft. Die VASP-Phosphorylierung diente nur zur Kontrolle der cGKI-Aktivität in diesen Experimenten und wurde auf den Gehalt an Beta-Aktin bezogen. Beta-Aktin ist ein sogenanntes „Housekeeping“-Protein und wird häufig als interne Ladungskontrolle im Western Blot verwendet. Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, konnte mit DB-cCMP 100µM nach 60min Inkubation bei 37°C eine deutliche Stimulation der MAPK-Phosphorylierung erzielt werden. Auch VASP, ein Substrat der cGKI, wurde phosphoryliert.

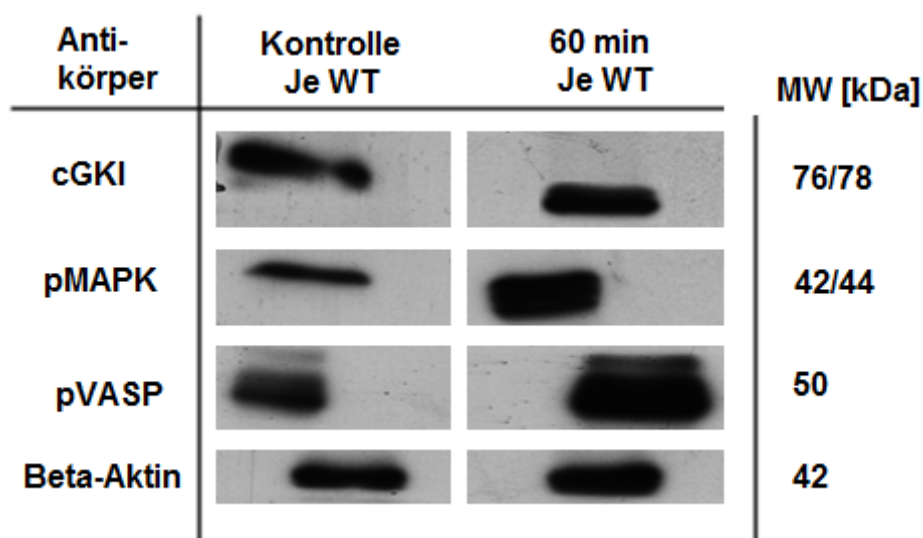


Abbildung 26: Stimulation von Jejunum-Gewebelysaten (WT) durch DB-cCMP. Gewebe wurde für 60min mit DB-cCMP (100µM) oder mit Wasser (Kontrolle) „stimuliert“. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert und mit folgenden primären Antikörpern behandelt: cGKIcommon (erkennt cGKI α und cGKI β), phospho-p44/p42 MAPK, phospho-VASP, Beta-Aktin. Ein Strippen der Membran war hierfür notwendig.

Die Zunahme der Phosphorylierung wurde densitometrisch nach B.2.6.3 getrennt für p42 MAPK und p44 MAPK berechnet. Die Miteinberechnung eines „Housekeeping“-Proteins war

hier nicht notwendig. Zur Kontrolle wurden unstimulierte Proben („us“) aufgetragen, mit denen genauso wie mit den stimulierten Proben verfahren wurde. Einzige Ausnahme war, dass hier die Stimulation unterblieb, da statt DB-cCMP Wasser zugesetzt wurde. In Lungen-WT-Gewebe kam es unter Gabe von DB-cCMP (100 μ M, 15min), verglichen mit der Kontrolle, zu einer ~2.5fachen Zunahme der p42 MAPK-Phosphorylierung (Abbildung 27 C/D). Eine Stimulation für 60min resultierte in einer ~6-8fachen Zunahme der p42 Phosphorylierung. Die p44 MAPK-Phosphorylierung fiel, verglichen mit der p42 Phosphorylierung, schwächer aus. Aber auch hier konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erzielt werden. Es konnte unter DB-cCMP Gabe (100 μ M) eine ~2fache (15min), ~3fache (30min) bzw. ~4fache (60min) Zunahme der p44 MAPK-Phosphorylierung erzielt werden. Eine Zunahme der Phosphorylierung mit steigender Inkubationsdauer konnte bei beiden MAPK-Isoformen beobachtet werden. Mit Jejunum-WT-Gewebelysaten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Abbildung 27 A/B). Verglichen mit p44 MAPK wurde p42 MAPK deutlich stärker und, kinetisch gesehen, auch schneller phosphoryliert. Hier wurde bereits nach 15min Inkubationszeit eine ~13.5fache Zunahme der p42 Phosphorylierung erzielt. Dieser Wert konnte auch durch eine Erhöhung der Inkubationszeit nur geringfügig gesteigert werden, was die Vermutung nahe legt, dass die Inkubationszeiten bereits zu lange angesetzt waren bzw. dass sich die Zeitkinetik der p42 MAPK-Phosphorylierung in Jejunum-WT-Gewebe anders verhält. Anders sah die p44 MAPK-Phosphorylierung in Jejunum-WT-Gewebe aus. Hier wurde nach 15min eine ~2.5fache Zunahme erzielt, die nach 60min Inkubationszeit auf das ~8fache gesteigert werden konnte.

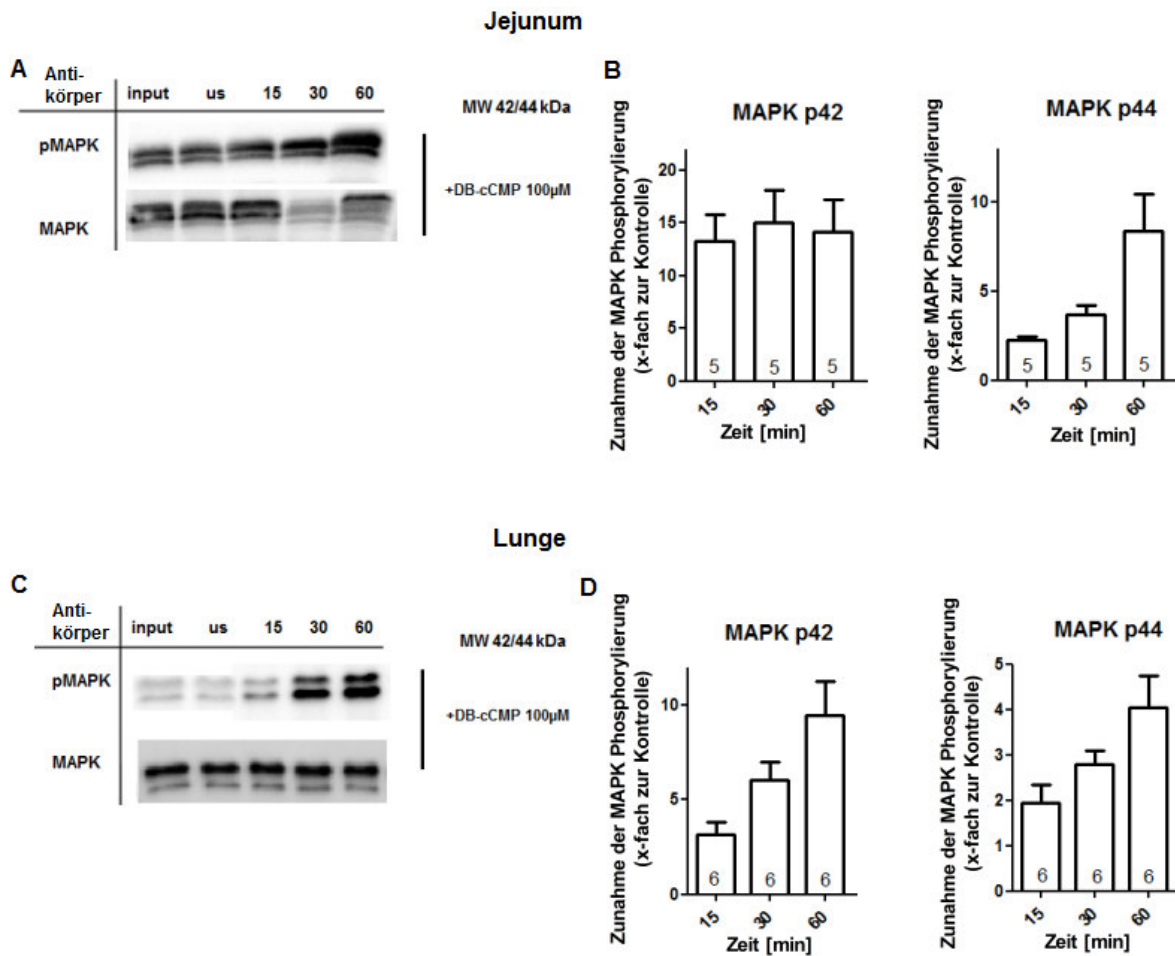


Abbildung 27: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP. (A) Jejunum-WT-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100µM DB-cCMP inkubiert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Proben (2.5µg/µl, „us“) und unbehandeltes Gewebelysat (1µg/µl, „input“) eingesetzt. Die unstimulierten Proben („us“) wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt DB-cCMP Wasser zugegeben wurde. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörpers bestimmt. (B) Densitometrische Analysen von 4-5 unabhängigen Experimenten (Ziffer in den Säulen entspricht der n-Zahl) wurden zur quantitativen Bestimmung der p44/42 MAPK-Level durchgeführt. Es wurde die x-fache Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt. (C)/(D) analog (A)/(B) mit der einzigen Ausnahme, dass Lungen-Gewebelysate (WT) verwendet wurden.

Im Vergleich zu Lungen-WT-Gewebe wurde MAPK in Jejunum-WT-Gewebelysaten signifikant stärker phosphoryliert (Abbildung 28). Zusammenfassend konnte aber gezeigt werden, dass cCMP in beiden untersuchten Geweben die Phosphorylierung der MAPK stimulierte.

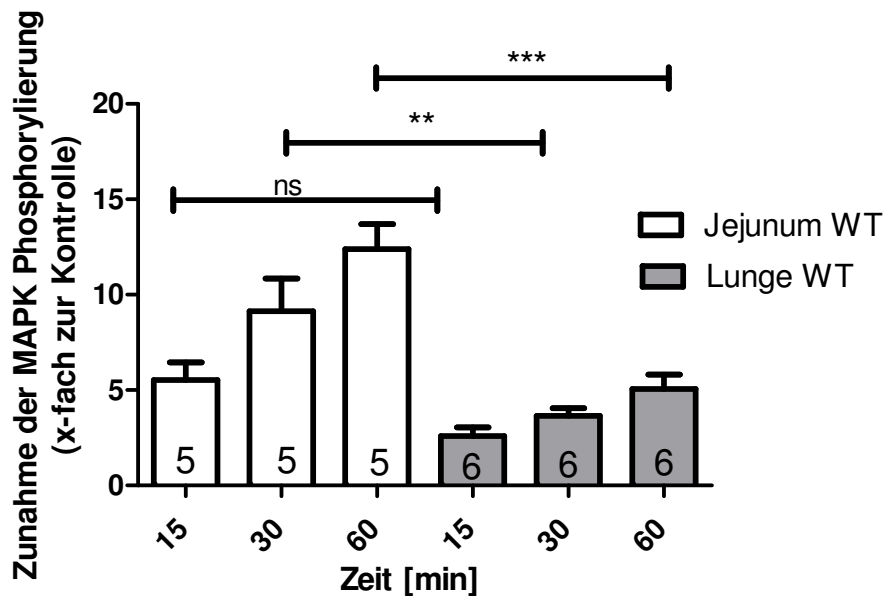


Abbildung 28: Aktivierung der MAPK durch DB-cGMP. Jejunum-WT-Gewebelysate und Lunge-WT-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100 μ M DB-cGMP inkubiert. Es wurde kein Inhibitor zugegeben. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörpers bestimmt. Densitometrische Analysen von 5-6 unabhängigen Experimenten (Ziffer in den Säulen entspricht der n-Zahl) wurden zur quantitativen Bestimmung der p44/42 MAPK-Level durchgeführt. Es wurde die x-fache Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt.

C.4.2 cGMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung unter cAK-Blockade

Außerdem sollte abgeklärt werden, inwiefern cAK an der cGMP-vermittelten Phosphorylierung der MAPK mitwirkt. WT-Gewebe (Jejunum und Lunge) wurde, wie in B.2.6 beschrieben, behandelt und mit 100 μ M DB-cGMP stimuliert. Zusätzlich wurde ein cAK-Inhibitor (AS₅₋₂₄, 10 μ M) zum Reaktionsansatz zugegeben, der eine cAK-vermittelte Phosphorylierung ausschließen sollte. Interessanterweise nahm hierbei die Phosphorylierung der p44/p42 MAPK deutlich ab (Abbildung 31). In Jejunum-WT-Gewebelysaten kam es zu einer signifikanten Abnahme der p42 MAPK-Phosphorylierung, die bei 15min Inkubationszeit um das 12fache sank. Die Zunahme der Phosphorylierung betrug nur noch das 1.5fache, verglichen mit der Kontrolle. Bei steigender Inkubationszeit nahm aber auch hier die p42 MAPK-Phosphorylierung zu und nach 60min konnte eine ~6fache Stimulation beobachtet werden. Bei Zugabe des cAK-Inhibitors wurde die p44 MAPK-Phosphorylierung zwar auch reduziert, allerdings war der Unterschied zu den Ergebnissen ohne Inhibitor nicht signifikant. Eine Signifikanz konnte erst bei einer

Inkubationszeit von 60min erzielt werden. Hier wurde die Phosphorylierung durch den cAK-Inhibitor um das 4fache reduziert (Abbildung 29A, Abbildung 31A). Zusätzlich wurde Lungengewebe (WT) untersucht. Auch hier wurde AS₅₋₂₄ (10µM) zugegeben und anschließend mit DB-cCMP (100µM) stimuliert (Abbildung 29B). Die Phosphorylierung der p44/p42 MAPK nahm daraufhin ab. Die Zunahme der p42-Phosphorylierung sank nach 15min Inkubationszeit von ~2.5fach auf ~1.5fach und nach 60min von ~6fach auf ~2fach. Die Zunahme bei p44 MAPK sank nach 15min von ~2fach auf ~ 1fach und nach 60min von ~4fach auf ~1.5fach (Abbildung 31B). Insgesamt betrachtet konnte man die MAPK-Phosphorylierung durch Zugabe eines cAK-Inhibitors deutlich reduzieren, was die Schlussfolgerung zulässt, dass cAK eine stimulierende Funktion bei der cCMP-vermittelten MAPK-Phosphorylierung ausübt. Weiterhin wurde die Phosphorylierung von p42 MAPK deutlich stärker gehemmt als von p44, p42 MAPK wurde aber weiterhin auch deutlicher phosphoryliert. AS₅₋₂₄ ist ein potenter, kompetitiver cAK-Inhibitor und hemmt auch in schwachem Ausmaß die cGK. Die Konzentration wurde entsprechend angepasst (Abbildung 13). Eine Hemmung der cGK durch den Inhibitor konnte dennoch nicht komplett ausgeschlossen werden.

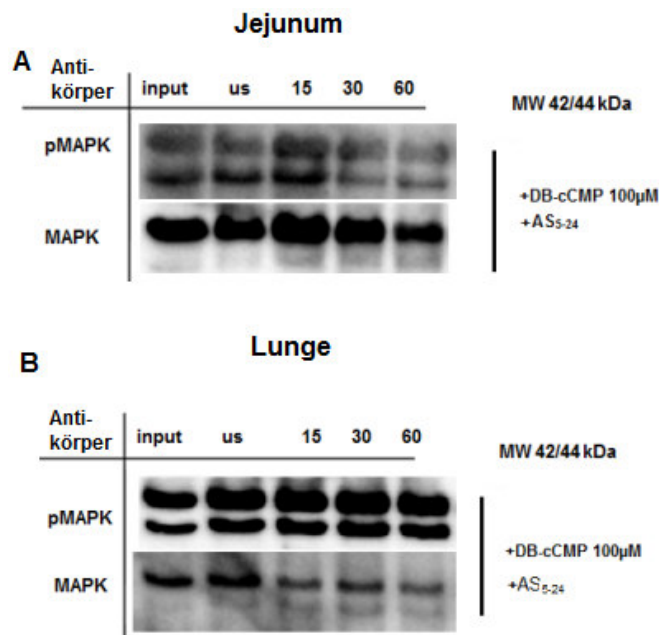


Abbildung 29: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP unter cAK-Blockade. (A) Jejunum-WT-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100µM DB-cCMP inkubiert. Ein cAK-Inhibitor (AS₅₋₂₄, 10µM) wurde zugegeben bzw. durch Wasser ersetzt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Proben (2.5µg/µl, „us“) und unbehandeltes Gewebelysate (1µg/µl, „input“) eingesetzt. Die unstimulierten Proben („us“) wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt DB-cCMP Wasser zugegeben wurde. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörpers bestimmt. (B) analog (A) mit der einzigen Ausnahme, dass Lungen-Gewebelysate (WT) verwendet wurden.

C.4.3 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung unter PKC-Blockade

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin-Threonin Kinase und spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation [149]. Desweiteren wird ein Crosstalk zwischen dem PKC- und dem cGMP-NO-cGK-Signalweg diskutiert [150], was wiederum die Vermutung nahe legte, dass evtl. auch PKC eine Rolle bei der cCMP-stimulierten MAPK-Phosphorylierung spielt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Versuche mit einem PKC-Inhibitor, nämlich mit myr-psi PKC (50 μ M), durchgeführt. WT-Gewebe (Lunge und Jejunum) wurde wie in B.2.6 beschrieben, behandelt und mit 100 μ M DB-cCMP stimuliert. Zuvor wurden jeweils 10 μ M AS₅₋₂₄ (cAK-Inhibitor) und 50 μ M myr-psi PKC (PKC-Inhibitor) zu den Ansätzen gegeben. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot analysiert (Abbildung 30) und densitometrisch ausgewertet (Abbildung 31). Durch zusätzliche Gabe eines PKC-Inhibitors konnte die Phosphorylierung weiter inhibiert werden. Besonders in Jejunum-WT-Lysaten konnte die Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Gabe eines cAK-Inhibitors alleine, nochmals z. T. um die Hälfte reduziert werden (Abbildung 31A). In Lungen-Gewebelysat (WT) konnte dieser Effekt nicht so deutlich beobachtet werden. Die p44 MAPK-Phosphorylierung blieb hier bei Gabe beider Inhibitoren auf demselben Level wie bei alleiniger Gabe eines cAK-Inhibitors. Nichtsdestotrotz wurde in allen Geweben, trotz Zugabe beider Inhibitoren, eine MAPK Phosphorylierung detektiert. Es kam meist zu einer signifikanten 2-3fachen Zunahme der MAPK-Phosphorylierung verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Die cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung ist also zum Großteil, jedoch nicht ausschließlich, cAK- und PKC-abhängig.

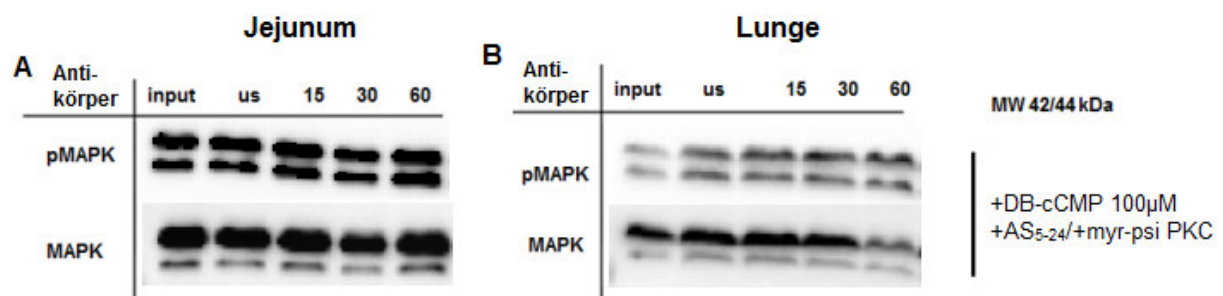


Abbildung 30: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP unter cAK- und PKC-Blockade. (A) Jejunum-WT-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100 μ M DB-cCMP inkubiert. Ein cAK-Inhibitor (AS₅₋₂₄, 10 μ M) und ein PKC-Inhibitor (myr-psi PKC, 50 μ M) wurden zugegeben bzw. durch Wasser ersetzt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Proben (2.5 μ g/ μ l, „us“) und unbehandeltes Gewebelysat (1 μ g/ μ l, „input“) eingesetzt. Die unstimulierten Proben („us“) wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt DB-cCMP Wasser zugegeben wurde. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörpers bestimmt. (B) analog (A) mit der einzigen Ausnahme, dass Lungen-Gewebelysate (WT) verwendet wurden.

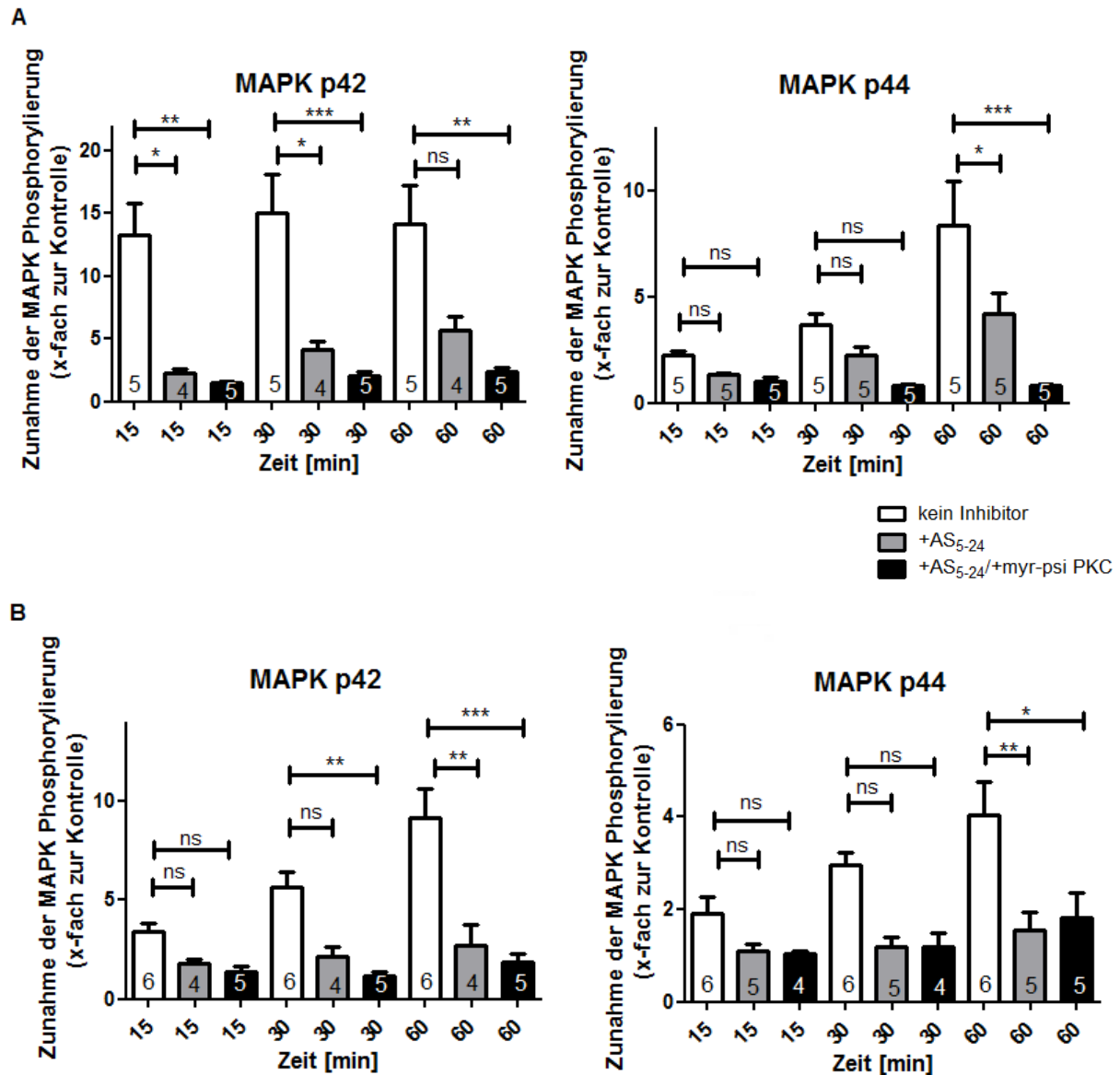


Abbildung 31: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP. (A) Jejunum-WT-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100 μ M DB-cCMP inkubiert. Ein cAK-Inhibitor (AS₅₋₂₄, 10 μ M) und/oder ein PKC-Inhibitor (myr-psi PKC, 50 μ M) wurde zugegeben bzw. durch Wasser ersetzt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Proben (2.5 μ g/ μ l) und unbehandeltes Gewebelysate (1 μ g/ μ l) eingesetzt. Die unstimulierten Proben wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt DB-cCMP Wasser zugegeben wurde. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert (Daten nicht gezeigt). Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörper bestimmt. Es wurden densitometrische Analysen von 4-6 unabhängigen Experimenten (Ziffer in den Säulen entspricht der n-Zahl) zur quantitativen Bestimmung der p44/p42 MAPK-Level, durchgeführt. Es wurde die x-fache Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt. (B) analog (A) mit der einzigen Ausnahme, dass Lungen-Gewebelysate (WT) verwendet wurden.

C.4.4 cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung in KO-Gewebe

Um die Rolle der cGK während der MAPK-Phosphorylierung zu klären, wurde mit KO-Gewebelysaten gearbeitet. Es wurde jeweils Jejunum- und Lungen-cGKII^{-/-}- und cGKI^{-/-}-Gewebe verwendet. Das Experiment wurde, wie bereits in B.2.6 beschrieben, durchgeführt. Bei der Berechnung erfolgte hier aber keine Aufspaltung in p44 und p42 MAPK. Beide Isoformen wurden zusammengefasst, da eine Trennung der Banden auf den Blots oftmals schwierig war. In KO-Geweben (Lunge und Jejunum) konnte eine MAPK-Phosphorylierung erzielt werden (Abbildung 32). Interessanterweise fiel die Phosphorylierung in cGKII-KO-Gewebelysaten (v.a. Jejunum-cGKII-KO, Abbildung 32A), verglichen mit WT- oder cGKI-KO-Gewebelysaten, deutlich stärker aus. Besonders in Jejunum-cGKII^{-/-}-Gewebelysaten kam es bereits nach 15min Inkubation zu einer ~14fachen Zunahme der Phosphorylierung; ein Wert, der bei WT- und cGKI^{-/-}-Jejunum-Geweben um das ~3fache erniedrigt war (Abbildung 32B). Die Phosphorylierung in cGKII^{-/-}-Jejunum-Gewebe war auch nach 30min bzw. 60min Stimulationsdauer höher als in WT- bzw. cGKI^{-/-}-Gewebe. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass cGKII eine inhibitorische Rolle in der cCMP-vermittelten MAPK-Phosphorylierung im Jejunum spielen könnte. Zudem wird cGKII besonders im Darmtrakt exprimiert und spielt hier eine wichtige Rolle bei der gastrointestinalen Sekretion [61]. Durch die hohe cGKII-Konzentration im GI-Trakt lässt sich möglicherweise der deutliche Effekt bei der MAPK-Phosphorylierung erklären. Vergleich man die MAPK-Phosphorylierung in WT-Gewebe mit cGKI^{-/-}-Gewebe ergab sich in Jejunum kein signifikanter Unterschied. In Lungengewebe zeigte sich allerdings ein anderes Bild (Abbildung 32C/D). Hier waren die Effekte in cGKII-KO-Gewebe vergleichbar mit WT-Gewebe, was damit zu erklären ist, dass cGKII in der Lunge eine eher untergeordnete Rolle spielt. cGKI, besonders cGKI α , ist hingegen in hohem Ausmaß in Lungengewebe exprimiert [29]. Das könnte der Grund dafür sein, dass hier auch ein deutlicherer Effekt in cGKI^{-/-}-Gewebe beobachtet wurde. Die Zunahme der MAPK-Phosphorylierung war deutlich erniedrigt und konnte auch nach 60min nur ~2.5fach stimuliert werden (im Vergleich dazu WT-Lungengewebe: ~5fach). cGKI hat somit während der MAPK-Phosphorylierung einen stimulierenden Effekt. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die cCMP-vermittelte MAPK Phosphorylierung stark gewebeabhängig ist. Je nachdem welche cGMP-abhängigen Kinasen im Gewebe vorkommen und wie stark sie in den einzelnen Geweben exprimiert sind, kommt es zu einem stimulierenden oder inhibierenden Effekt auf die MAPK-Phosphorylierung. cGKI wirkt möglicherweise über den MAPK-Signalweg (besonders in der Lunge) eher proliferativ, cGKII hingegen mehr antiproliferativ. Weitere Studien sind allerdings notwendig, um diese Vermutung genauer zu klären.

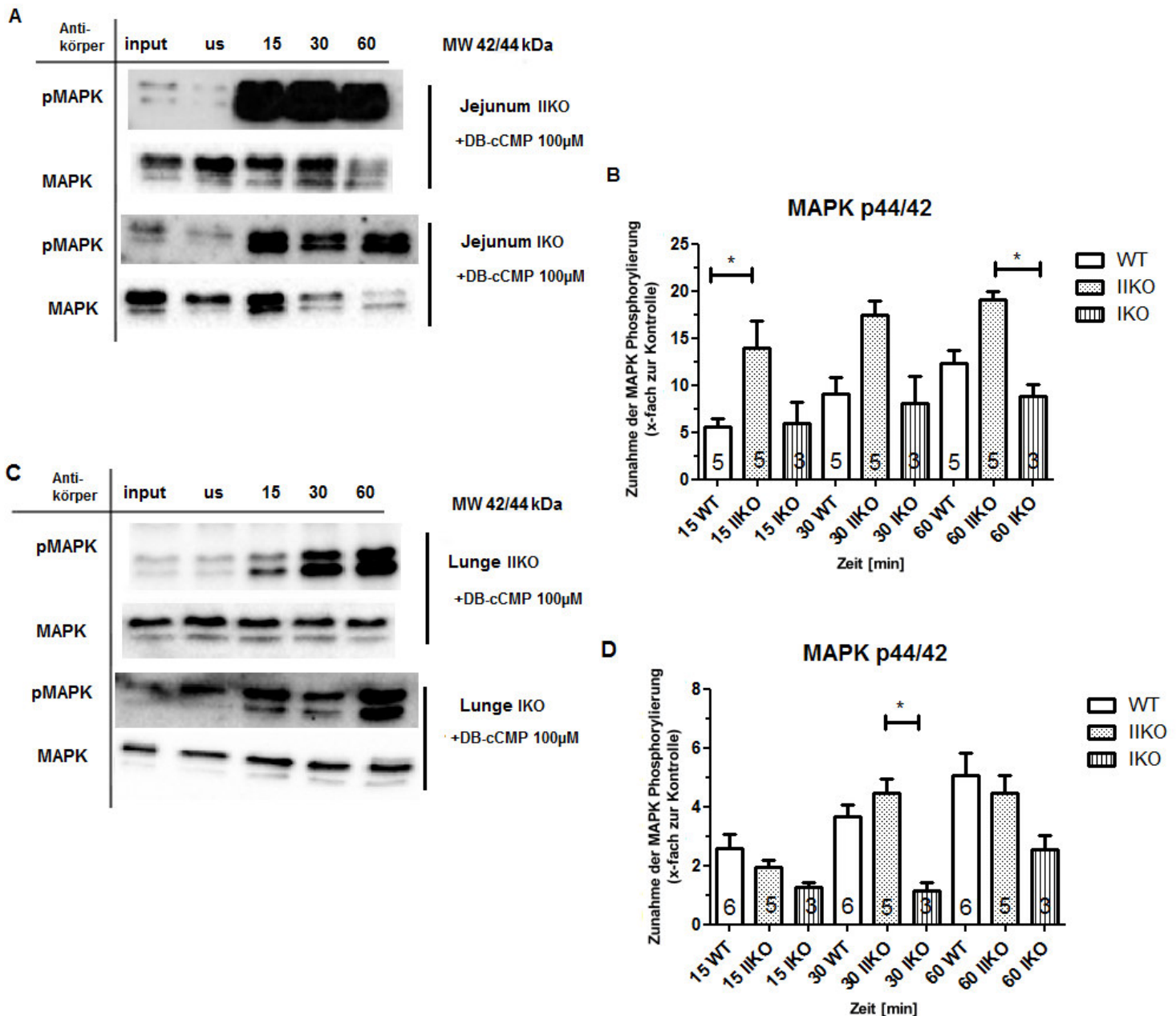


Abbildung 32: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP in WT- und KO-Gewebe. (A) Jejunum-WT/*cGKI*^{-/-}/*cGKI*^{-/-}-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100µM DB-cCMP inkubiert. Ein cAK-Inhibitor wurde nicht zugegeben. Als Kontrolle wurden unstimulierte Proben (2.5µg/µl, „us“) und unbehandeltes Gewebelysate (1µg/µl, „input“) eingesetzt. Die unstimulierten Proben („us“) wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt DB-cCMP Wasser zugegeben wurde. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörpers bestimmt. (B) Densitometrische Analysen von 3-5 unabhängigen Experimenten (Ziffer in den Säulen entspricht der n-Zahl) wurden zur quantitativen Bestimmung der p44/42 MAPK-Level, durchgeführt. Es wurde die x-fache Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt. (C)/(D) analog (A)/(B) mit der einzigen Ausnahme, dass Lungen-Gewebelysate (WT/*cGKI*^{-/-}/*cGKI*^{-/-}) verwendet wurden.

C.4.5 Stimulation der MAPK-Phosphorylierung durch andere zyklische Nukleotide

Weiterhin sollte geklärt werden, ob auch andere zyklische Nukleotide (wie cGMP oder cAMP) in der Lage sind, MAPK zu phosphorylieren. Hierzu wurden WT-Gewebelysate (Lunge und Jejunum) nach dem Protokoll in B.2.6 aufbereitet und stimuliert. Auch hier wurden membrangängige cNMP-Analoga verwendet, nämlich 8-pCPT-cGMP (cGMP-Analagon, 100 μ M) und SP-5,6-DCI-cBIMPS (cAMP-Analagon, 100 μ M). Sowohl unter cGMP-, als auch unter cAMP-Stimulation kam es zu einer verstärkten Phosphorylierung der MAPK (Abbildung 33). Verglichen mit unstimulierten Proben resultierte in Jejunum-WT-Gewebe eine 15minütige Stimulation mit cGMP in einer \sim 2.5fachen Zunahme der p44 und einer \sim 2fachen Zunahme der p42 Phosphorylierung. Bei einer 30minütigen Stimulation mit cGMP ließ sich eine \sim 4.5fache Zunahme der p44 MAPK-Phosphorylierung erzielen. Ansonsten konnten die Werte nicht weiter gesteigert werden. Auch für cAMP konnte mit steigender Inkubationszeit keine steigende MAPK-Phosphorylierung erreicht werden. In Lungen-WT-Gewebe konnte für p44 eine maximal 1.5fache Zunahme der Phosphorylierung erzielt werden, sowohl mit cAMP, als auch mit cGMP. Die p42 Isoform der MAPK wurde hier im Vergleich zu p44 stärker stimuliert, wohingegen sich mit cGMP nach 15min eine \sim 3.5fache Zunahme ergab, die mit steigender Inkubationsdauer sank. Mit cAMP erhielt man mit steigender Stimulationsdauer auch entsprechend höhere Phosphorylierungswerte und bei 60min wurde eine \sim 4fache Zunahme erreicht. Dies alles legt aber die Vermutung nahe, dass die Zeitkinetik für diese Experimente falsch gewählt wurde bzw. dass die cGMP-/cAMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung z. T. schneller abläuft, als die cAMP-vermittelte. Allerdings ergab eine cGMP-/cAMP-vermittelte Stimulation, verglichen mit cAMP, eine schwächere Phosphorylierung der MAPK.

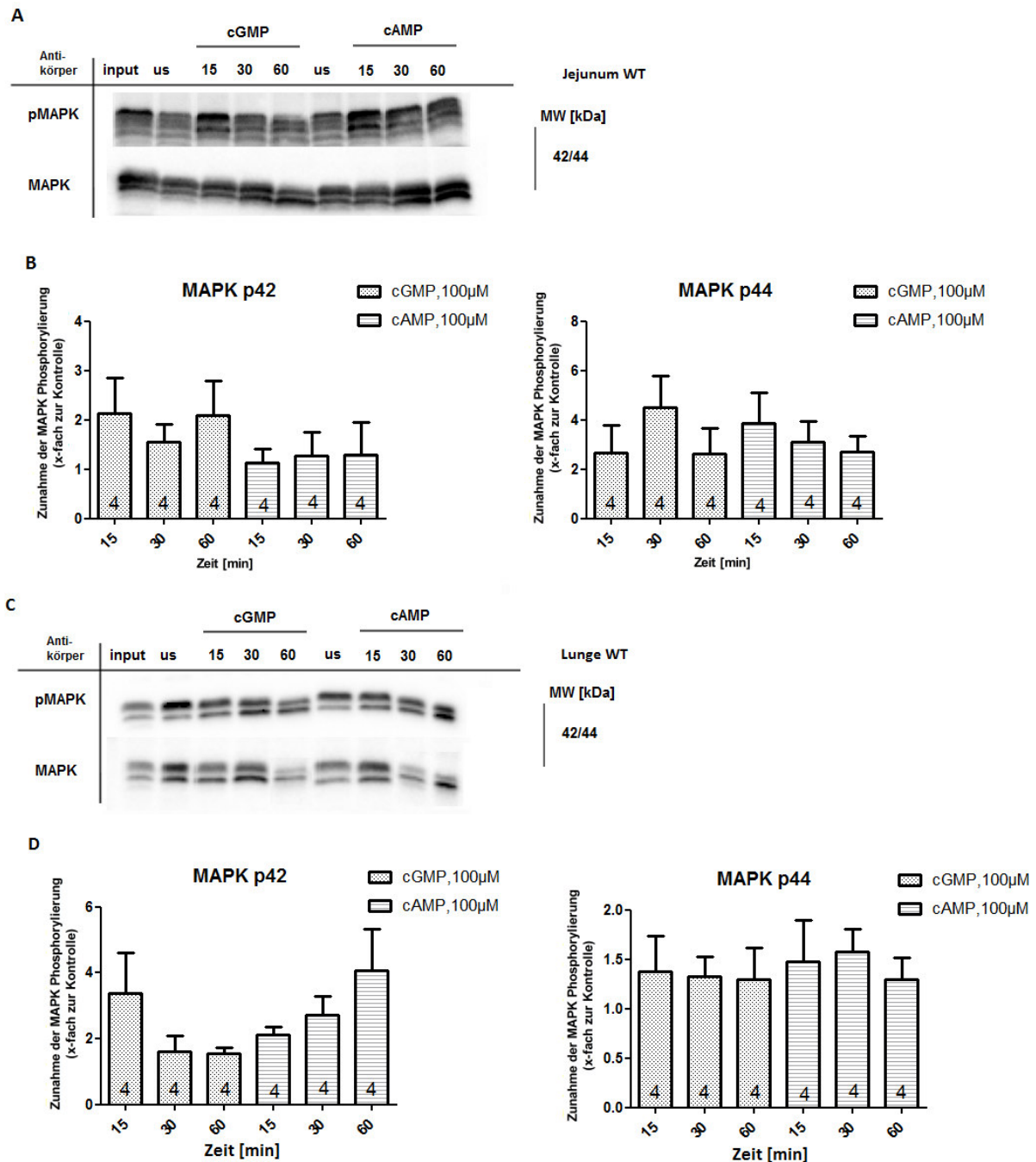


Abbildung 33: Aktivierung der MAPK durch cGMP- bzw. cAMP-Analoga in WT Gewebe. (A) Jejunum-WT-Gewebelysate wurden 15, 30 und 60min mit 100 μ M 8-pCPT-cGMP bzw. mit 100 μ M SP-5,6-DCl-cBIMPS inkubiert. Ein cAK- oder PKC-Inhibitor wurde nicht zugegeben. Als Kontrolle wurden unstimulierte Proben (2.5 μ g/ μ l, „us“) und unbehandeltes Gewebelysate (1 μ g/ μ l, „input“) eingesetzt. Die unstimulierten Proben („us“) wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt cNMP-Analoga Wasser zugegeben wurde. Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörper bestimmt. (B) Densitometrische Analysen von 4 unabhängigen Experimenten (Ziffer in den Säulen entspricht der n-Zahl) wurden zur quantitativen Bestimmung der p44/42 MAPK-Level durchgeführt. Es wurde die x-fache Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt. (C)/(D) analog (A)/(B) mit der einzigen Ausnahme, dass Lungen-Gewebelysate (WT) verwendet wurden.

C.5 Effekte einer schweren, LPS-induzierten Sepsis

Die oben aufgeführten Ergebnisse lassen vermuten, dass cGMP eine Rolle als „second messenger“ in physiologischen Prozessen spielt. Um einen Einblick in die pathophysiologische Bedeutung von cGMP zu erhalten, wurde bei WT- und cGKII-KO-Tieren eine Sepsis induziert. Dies geschah durch intraperitoneale Applikation von *E.coli*-Lipopolysacchariden (LPS). cGKI-KO-Tiere konnten nicht verwendet werden, da diese eine Behandlung mit LPS nicht überleben würden. Durch Gabe von LPS wird durch die iNOS (induzierbare NO-Synthase) vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, welches wiederum die lösliche Guanylylcyclase (sGC) aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels [151]. Nun sollte überprüft werden, ob nicht nur cGMP, sondern auch andere zyklische Nucleotide, wie cCMP, dabei hochreguliert werden (Abbildung 34). Ein Problem war hierbei der Nachweis von cCMP, da dessen Nachweisgrenze extrem niedrig ist und im nanomolaren-picomolaren Bereich liegt (siehe Einleitung).

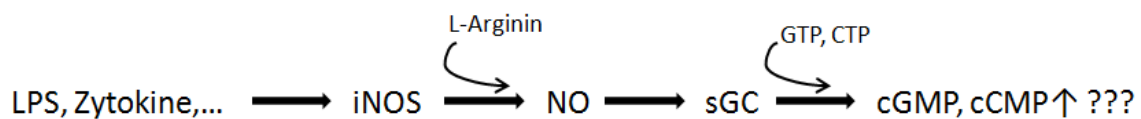


Abbildung 34: Schematische Darstellung der NO-Signalkaskade während einer LPS-induzierten Sepsis.

C.5.1 Bestimmung der cNMP-Spiegel im Urin während einer LPS-induzierten Sepsis

Hierzu wurden etwa altersgleiche (10-15 Wochen) WT- bzw. cGKII-KO-Mäuse nach B.2.3.1 mit 10mg/kg KG LPS behandelt und über einen Zeitraum von 24 Stunden Urin gesammelt. Zur Kontrolle wurde einigen Tieren dasselbe Volumen isotone NaCl-Lösung verabreicht (Ctrl.). Zusätzlich wurde retrobulbär Serum entnommen (B.2.3.2). Anschließend wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, perfundiert und Gewebe entnommen. Während der LPS-Phase kam es bei den Tieren zu starken Entzündungsreaktionen (sichtbar war v.a. eine Konjunktivitis, Zittern). Daher war eine laufende Überwachung zwingend erforderlich. Evtl. auftretende Komplikationen (Schnappatmung, keine Bewegung nach Berührung) wurden beobachtet und dokumentiert. Bei Nicht-Besserung wurde der Versuch vorzeitig abgebrochen und das Tier durch transzervikale Dislokation getötet. Nach etwa 3-4h zeigten alle Tiere typische „Symptome“ einer LPS-induzierten Sepsis, wie Lethargie, verminderte Aktivität, verminderte Fellpflege, starke Kyphose, Durchfall, schnelle Atmung, „Röcheln“ und Konjunktivitis. Bei cGKII-KO-Tieren waren diese Symptome deutlich schwächer ausgeprägt,

einzelne Tiere zeigten hier nach LPS-Gabe sogar keine der oben genannten Symptome. Urin-, Serum- und Gewebeprouben wurden an die ZFA Metabolomics der MHH in Hannover geschickt und dort mittels LC-MS/MS Massenspektrometrie auf ihren 3',5'-cCMP-Gehalt untersucht. Hiermit konnten auch andere zyklische Nukleotide, wie 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP, detektiert werden. Ein Nachweis von cCMP in Serum- und Gewebeprouben war, aufgrund der extrem niedrigen Nachweisgrenze, nicht möglich. Im Urin konnte hingegen cGMP, cAMP und auch cCMP nachgewiesen werden (Abbildung 35). Die Basallevel für cGMP lagen bei ca. 100pmol/ml, für cAMP bei ca. 1000pmol/ml und für cCMP etwa bei 0.2pmol/ml. Signifikante Unterschiede konnten bei diesen Versuchen, aufgrund der starken Schwankungen der Werte, oftmals nicht erzielt werden. Jedoch zeichneten sich Tendenzen ab. Der cGMP-Spiegel im Urin nahm bei -Mäusen nach etwa 4-5h zu. Bei cGKII-KO-Tieren wurde die maximale cGMP-Konzentration erst nach 24h erreicht. Die cAMP-Spiegel hingegen stiegen zwar nach 4-5h auf ein Maximum an, sanken dann aber nach 10h bzw. 24h wieder auf den Ausgangswert. Im WT konnte ein stärkerer cAMP-Konzentrationsanstieg beobachtet werden, als im cGKII-KO. cCMP war aufgrund der niedrigen Detektionsgrenze schwer nachzuweisen, konnte aber in Urinproben (nach LPS-Gabe) sicher nachgewiesen werden. Auch hier kam es nach 4-5h bzw. nach 10h zu einem Anstieg der cCMP-Konzentration, der sowohl im WT als auch in cGKII-KO-Versuchstieren beobachtet werden konnte. Die zusätzliche Gabe von ODQ (sGC-Inhibitor, i. p., 20mg/kg KG, 1h vor LPS-Gabe) brachte keine Veränderung gegenüber der LPS-Gabe alleine (Daten nicht gezeigt). Während einer LPS-induzierten Sepsis wird also nicht nur cAMP und cGMP, sondern auch cCMP hochreguliert. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis dafür sein, dass cCMP als „second messenger“ in pathophysiologischen Prozessen agiert.

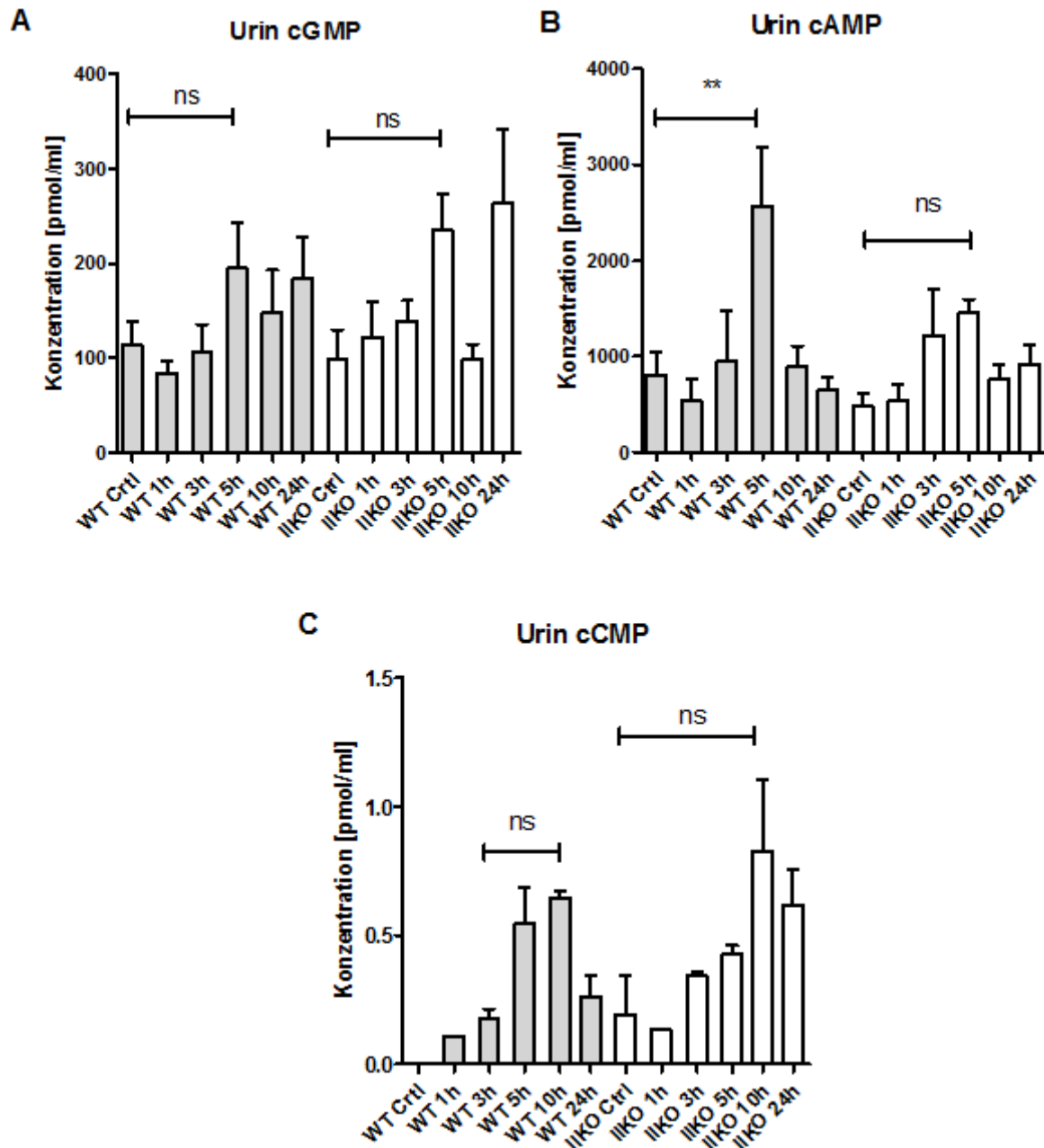


Abbildung 35: Simultane Quantifizierung zyklischer Nukleotide in WT- und cGKI-KO-Urin mittels LC-MS/MS. (A) cGMP-/(B) cAMP-/(C) cCMP-Konzentrationsbestimmung im Urin mittels Massenspektrometrie (ZFA Metabolomics). Es sind die Ergebnisse von 3-12 unabhängigen Experimenten dargestellt.

C.5.2 Änderung der MAPK-Phosphorylierung während einer LPS-induzierten Sepsis

Einige WT-Versuchstiere, die sich nach 24h erholt hatten und einen gesunden Eindruck machten, wurden unmittelbar nach Ablauf dieser 24h erneut mit LPS behandelt (i. p., 10mg/kg KG) und wiederum beobachtet und kontrolliert. Anschließend wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, perfundiert, Gewebe wurde ihnen entnommen (Jejunum) und dieses wurde

aufbereitet. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf verschiedene Proteine untersucht. Hierbei wurde jeweils LPS-behandeltes Jejunum-Gewebe mit unbehandeltem Jejunum-Gewebe verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass, unter LPS-Gabe, die Phosphorylierung von MAPK zunimmt (Abbildung 36). Diese Zunahme lässt sich dadurch erklären, dass LPS über den TLR4 (toll-like receptor 4) und Ras/Raf die MAPK-Phosphorylierung stimuliert [123]. Weiterhin ist es möglich, dass durch LPS-Gabe über den NO/sGC Signalweg vermehrt zyklische Nukleotide gebildet werden, die wiederum die cNMP-abhängigen Kinasen stimulieren, die dann mit der MAPK interagieren.

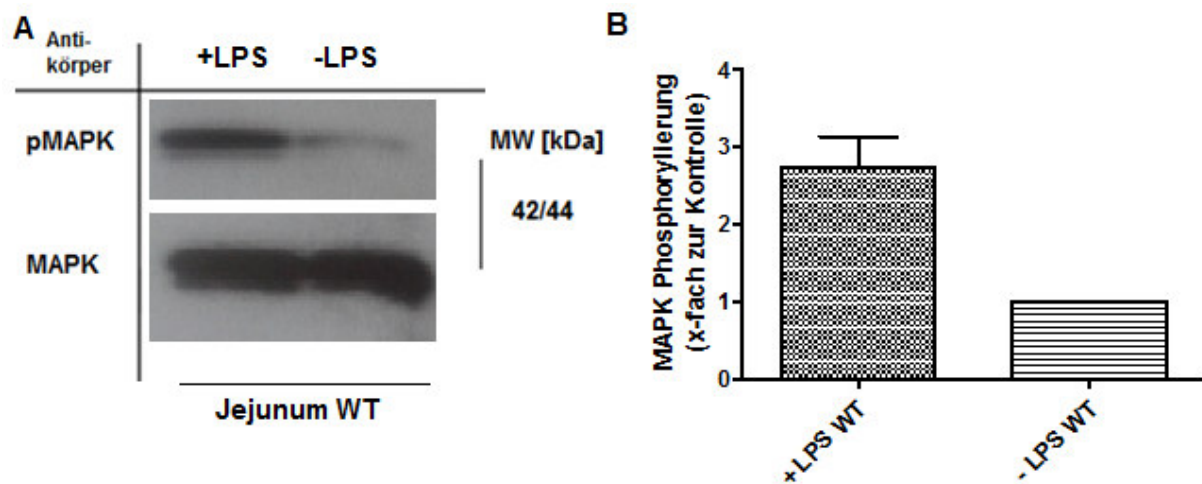


Abbildung 36: Stimulation der MAPK-Phosphorylierung durch LPS in WT-Gewebe. LPS-behandeltes Jejunum-Gewebe („+LPS“) wurde mit unbehandeltem Gewebe verglichen (jeweils 1µg/µl). Die unstimulierten Proben („-LPS“) wurden identisch zu den stimulierten Proben behandelt, nur dass statt LPS isotones NaCl i. p. gespritzt wurde. (A) Die MAPK-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines phospho-p44/42 MAPK-Antikörpers (pMAPK) detektiert. Der Gesamtgehalt an MAPK wurde nach Strippen der Membran durch Inkubation mit einem p44/42 MAPK-Antikörpers bestimmt. (B) Densitometrische Analysen von 3 unabhängigen Experimenten wurden zur quantitativen Bestimmung der p44/42 MAPK-Level durchgeführt. Es wurde die x-fache Zunahme der MAPK-Phosphorylierung, im Vergleich zur Kontrolle (-LPS), dargestellt.

D. Diskussion

D.1 cCMP als „second messenger“?

Das Prinzip der zyklischen Nukleotide, die als „second messenger“ fungieren, ist hinsichtlich der purinen Nukleotide cAMP und cGMP gut erforscht und etabliert [152]. Allerdings deuten neuere Forschungsergebnisse darauf hin, dass auch die pyrimidinen zyklischen Nukleotide, allen voran das zyklische Cytidin 3',5'-monophosphat (cCMP), eine intrazelluläre Funktion bei (patho)physiologischen Prozessen ausüben könnten. Vor Kurzem konnte cCMP in Zellen und Gewebe eindeutig mithilfe sensitiver massenspektrometrischer Methoden nachgewiesen werden [84, 153]. Auch 2',3'-cCMP wurde kürzlich mittels LC-MS/MS in Zellen detektiert [154]. Diesem kommt aber vermutlich eine untergeordnete Rolle bei, da auch im cAK-/cGK-Signalweg die 3',5'-Formen die aktive Form darstellen. Die Synthese erfolgt über die sGC und die sAC (aktiviert durch einen „first messenger“), die somit eine Cytidylzyklase-Aktivität aufweisen [155]. Besonders in HEK-Zelllinien (z. B. HEK293) ist sAC für hohe basale cCMP-Konzentrationen verantwortlich [85]. Dies wurde durch Studien mit sAC-Inhibitoren und Stimulation mit Bicarbonat (sAC wird über Bicarbonat reguliert [156]) bestätigt [85]. Forskolin, ein Diterpen aus den Wurzeln der Buntnessel (*Coleus forskohlii*) [157], aktiviert die mAC, mit Ausnahme der AC9 [158, 159], konnte aber in Zellen die cCMP-Produktion nicht anregen, wodurch man zu dem Schluss kam, dass membranständige Adenylylzyklasen nicht an der cCMP-Bildung beteiligt sind [85]. Eine cCMP-Generierung über AC9 kann aber nicht ausgeschlossen werden. Die NO-stimulierte sGC synthetisiert cCMP in Abhängigkeit von Mn^{2+} [160]. Eine Beteiligung der pGC an der cCMP-Bildung ist nicht bekannt [76]. Eine spezifische Cytidylzyklase existiert nach heutigem Wissensstand nicht [161]. Abgebaut wird cCMP über eine spezifische PDE - die PDE7A1 - und zu einem sehr geringen Anteil auch über die PDE6AB [93]. Zusätzlich wird auch eine cCMP-Inaktivierung über MRP5 diskutiert [92]. Mit der Entdeckung der spezifischen Phosphodiesterase PDE7A1 wurde die Theorie von Reinecke et al. z. T. widerlegt, dass keine cCMP-spaltende PDE existiert und es durch den fehlenden cCMP-Abbau zu einer Akkumulation von cCMP im Zellinneren kommen könnte [162]. Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass auch bakterielle Toxine (Pertussistoxin, EF aus *Bacillus anthracis*) große Mengen an cCMP generieren können, was womöglich zur Toxizität dieser Bakteriengifte beitragen könnte [83].

Mittlerweile sind einige membrangängige cCMP-Analoga (DB-cCMP oder cCMP-AM) kommerziell erhältlich, die den cCMP-Effekt imitieren können. Diese können im Ausgangszustand ihre Substrate nicht stimulieren [163]. Gereinigte Kinasen werden somit beispielsweise nicht von DB-cNMP, aber von cNMP stimuliert [89]. Da diese Analoga sehr

lipophil sind, gelangen sie leicht über die Membran ins Zellinnere, wo durch Esterasen die Butyrate oder Acetoxymethylgruppen abgespalten werden.

Betrachtet man diese Fakten, so sind bereits 4 der vorausgesetzten 6 Kriterien für einen „second messenger“ (siehe A.4 Zyklische Nukleotide (cCMP)) für cCMP erfüllt. Jedoch ist bisher immer noch wenig über cCMP-bindende Proteine bzw. cCMP-Effektoren bekannt.

Zur Aufklärung möglicher Zielstrukturen wurde mit aufgereinigten cG- und cA-Kinasen gearbeitet. Bei der Aktivitätsbestimmung lehrstuhlintern hergestellter Kinasen zeigte sich, dass die Aktivität der aufgereinigten Enzyme, verglichen mit den Literaturdaten [51, 89, 164], etwas schwächer war, aber durchaus noch im Normalbereich lag. Wie bereits bekannt, konnte cGMP beide cGKI Isoformen aktivieren, wobei cGKI β höhere K_a -Werte aufwies als cGKI α [29]. Die aufgereinigten Enzyme (cAK, cGKI und cGKII) wurden nun mit steigenden cCMP-Konzentrationen stimuliert und deren Aktivität mittels Phosphotransferaseassay gemessen. Anstatt dem gängigen Substrat VASPtide wurde ein neuartiges, von dem spezifischen cGKI β -Substrat IRAG abgeleitetes, Substrat (IRAGtide, RRRVSVAV) verwendet. IRAGtide enthält das Ser696 Motiv, die cGKI β -Phosphorylierungsstelle von IRAG [142]. Bei erfolgter Aktivierung der Kinase durch ein zyklisches Nukleotid wird im Normalfall ein endständiger (γ -)Phosphatrest (meist aus ATP stammend) auf das Substrat übertragen. Es konnte bestätigt werden, dass cCMP die gereinigten Kinasen cGKI (beide Isoformen), cGKII und cAK direkt stimuliert [89]. Die eigentliche Stimulation der Kinasen erfolgte unabhängig vom verwendeten Substrat und stieg mit steigender cCMP-Konzentration an. Verglichen mit der Literatur ergaben sich jedoch leichte Unterschiede. Bei Verwendung des gängigen Substrats VASPtide lagen die K_a -Werte für cCMP/cAK bei ca. 106 μ M und für cCMP/cGKII bei etwa 169 μ M [89]. Wurde IRAGtide verwendet, zeigte sich, dass cAK und auch cGKII mit cCMP um das 1.5fache stärker stimuliert wurden. cGKI α war unter IRAGtide sensitiver für cCMP (K_a (VASPtide): ~66 μ M) und cGKI β bei Verwendung von VASPtide (K_a : ~56 μ M). Interessanterweise wurden die beiden cGKI Isoformen je nach verwendetem Substrat unterschiedlich stark stimuliert. So lässt sich cGKI β (bei Zusatz von VASPtide)(K_a (cCMP): 56 \pm 8 μ M) spezifischer als cGKI α (K_a (cCMP): 66 \pm 8 μ M) von cCMP aktivieren. Unter Zugabe von IRAGtide wird cGKI α um das 2.7fache spezifischer von cCMP stimuliert [89]. Das Ergebnis ist insofern verwunderlich, da IRAG ein spezifisches Substrat der cGKI β ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die für die Substrat-Interaktion verantwortlichen Stellen nicht innerhalb der Kinase-Domäne liegen [142]. Weiterhin besitzen die cG-Kinasen aber eine deutlich höhere Spezifität für cGMP als für andere zyklische Nukleotide. Die Aktivierungskonstanten von cGMP liegen hier bei 0.11 μ M (cGKI α), 0.5 μ M (cGKI β) und 0.04 μ M (cGKII) [51]. Auch cAMP ist ein potenter Stimulator (im Vergleich zu

cCMP, unter Zugabe von VASPTide) der cGKII (K_a : 12 μ M) und der cGKI β (K_a : 18 μ M), nicht jedoch der cGKI α (K_a : 39 μ M) [51].

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen besitzen in der R-Domäne eine hoch- und eine niedrig-affine cGMP-Bindungsstelle (cGMP I und cGMP II) [29, 165]. Die cAMP-abhängigen Proteinkinasen weisen genauso zwei cAMP-Bindungsstellen in der regulatorischen Domäne auf [166]. Wie genau cCMP an die Kinasen bindet, ist nach wie vor unklar. Möglicherweise besetzt cCMP, analog cAMP und cGMP, direkt die Nukleotid-Bindungsstellen und aktiviert somit die Kinasen. Eine weitere Theorie zur cCMP-Interaktion mit diesen Kinasen besteht darin, dass es zu einer Kreuzaktivierung („Crosstalk“) von cNMP-abhängigen Signalkaskaden durch cCMP kommt. Beispielsweise könnte hier cCMP an die Kinasen binden und die zyklischen Nukleotid-Bindungsstellen blockieren bzw. auch sensibilisieren oder aber die cNMP-abbauenden PDEs blockieren, sodass die cNMP-Spiegel intrazellulär ansteigen [79, 162]. Die Hypothese einer möglichen Sensibilisierung von cG-Kinasen durch cCMP gegenüber cGMP konnte bereits in Vorversuchen (siehe Dissertation Dr. Matthias Desch) ausgeschlossen werden. Hier vermutete man, dass durch die Bindung von cCMP in einer cGMP-Bindungstasche eine Konformationsänderung ausgelöst wird, die wiederum die Bindung von cGMP in eine weitere Tasche begünstigt. Dadurch könnte cGK bereits bei basalen cGMP-Spiegeln bei gleichzeitiger Anwesenheit von cCMP, deutlich aktiviert werden. Allerdings ist es oftmals schwierig Ergebnisse, die mit Zellen oder mit gereinigten Enzymen erzielt wurden, auf die Situation *in vivo* und in Geweben zu übertragen. Um eine mögliche (patho)physiologische Relevanz von cCMP zu untersuchen, wurde somit auch versucht, endogene Kinasen in Gewebelysaten mit cCMP zu stimulieren. Zudem ist der angewendete Radioaktiv-Phosphotransferaseassay besonders geeignet zur Vermessung von Gewebelysaten, da diese noch unverarbeitet und somit nicht rein genug für andere Bestimmungsverfahren sind [167]. Die Methode basiert auf den radioaktiven Guanylylzyklase-Assays zur cGMP-Detektion und war eine der ersten Methoden zur Quantifizierung von zyklischen Nukleotiden. Hierbei wurde GTP radioaktiv markiert (^{14}C), die Menge an umgewandeltem (ebenfalls radioaktiv markiertem) cGMP gemessen und anschließend via TLC („thin layer chromatography“) getrennt. Dadurch konnten auch Rückschlüsse auf die GC-Aktivität gezogen werden [168]. Da dieses Verfahren sehr ungenau war, wurde es im Laufe der Zeit verbessert und variiert [169, 170]. Unter anderem konnte mit der sensitiveren Säulenchromatographie das radioaktiv markierte cGMP direkt bestimmt werden. Eine störanfällige enzymatische- oder Fluoreszenz-Detektion war nicht mehr nötig [167]. Später wurde der Assay abgewandelt und es konnte nun auch die Aktivität von Kinasen (z. B. cGK) bestimmt werden (siehe Material und Methoden und [138]). Der Phosphotransferaseassay ist somit eine robuste, sensitive und günstige Methode, zyklische

Nukleotide zu quantifizieren und die Kinetik der Kinasen nachzuverfolgen. Nachteilig ist allerdings, dass eine Kreuz-Aktivierung anderer Kinasen möglich ist (siehe Abbildung 16C) und dass radioaktives Material verwendet werden muss. Das verwendete ^{32}P ist ein reiner β -Strahler, welcher schnell zerfällt (HWZ:14.29 Tage), dessen Strahlung in der Luft aber einige Meter reicht.

In verschiedenen WT-Geweben, hauptsächlich Jejunum und Lunge, konnten die cG-Kinasen mit steigenden cCMP-Konzentrationen stimuliert werden. Es sind somit Target-Proteine für cCMP in diesen beiden Geweben vorhanden. Eine cAK-vermittelte Phosphorylierung (und damit eine Kreuzaktivierung des cAMP-Signalwegs) wurde durch Zugabe eines cAK-Inhibitors (AS_{5-24}) ausgeschlossen. Zum besseren Vergleich der erhaltenen cCMP-Daten wurde WT-Gewebe auch mit cGMP und cAMP stimuliert. cCMP konnte die cGKs in den hier untersuchten WT-Geweben annähernd so stark aktivieren wie cGMP (Abbildung 16). In Aorta-WT-Lysat aktivierte cGMP die cGKs stärker als cCMP [89]. In $\text{cGKI}^{-/}$ -Gewebe konnte keine Phosphorylierung unter cCMP- bzw. cGMP-Gabe detektiert werden. Dies stimmt mit Literaturwerten überein [89] und deutet darauf hin, dass die cCMP-vermittelte Phosphorylierung cGKI-abhängig ist. Eine Kreuzaktivierung der cGMP-Signalkaskade durch cAMP konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden [31, 171].

Weiterhin existieren einige andere Arbeiten, die die oben beschriebenen Bindungsexperimente mit cCMP-Analoga durchgeführt haben [89, 147]. Um die Lipophilie und somit die Membrangängigkeit von cCMP zu verbessern, kann beispielsweise die freie Hydroxy-Gruppe am Ribosyl-Rest und die Amin-Gruppe am Pyrimidinring dibutyryliert werden (DB-cCMP) [148]. Besonders für *in vivo* Experimente ist dies entscheidend. In der Zelle erfolgt hier eine Abspaltung der Butyryl-Gruppe an der 2'-O-Ribosyl-Position. Der aktive Metabolit ist hier ein monobutyryliertes cCMP (4-MB-cCMP). 4-MB-cCMP imitiert somit cCMP, was allerdings kritisch diskutiert wird, da zwischen den beiden Substanzen ein struktureller und somit auch chemischer Unterschied besteht [147]. Es wurde in Zellversuchen gezeigt, dass 4-MB-cCMP cGK aktiviert, nicht aber cAK [147]. Ob cCMP die gleichen Effekte wie 4-MB-cCMP *in vivo* und *in vitro* aufweist [94, 98, 172], muss in weiteren Studien geklärt werden. Eine andere Möglichkeit die Penetration des cCMPs durch die Membran zu erhöhen, stellt die Abschirmung des zyklischen Phosphatesters durch eine Acetoxymethylester-Gruppe (cCMP-AM) dar [91]. Auch hier erfolgt die Abspaltung des Restes durch Esterasen in wenigen Minuten. Der aktive Metabolit ist hier cCMP.

Um die Bindungsstöchiometrie an die cNMP-abhängigen Proteinkinasen eindeutig zu klären, bedarf es weiterer Bindungsexperimente. Zudem bleibt unklar, ob cCMP eine entscheidende Rolle in physiologischen Abläufen spielt, zumal cCMP nur in geringen Konzentrationen *in vivo* detektiert werden konnte [84, 153] und die Konzentrationen in Zellen stark schwanken

[86, 154]. Dies wiederum legt die Vermutung nahe, dass die cCMP-Synthese je nach verwendeter Gewebeart/Zelllinie stark variiert und hier an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist. Da aber weiterhin wenig über den Abbau und die interagierenden Proteine von cCMP bekannt ist, wären z. B. eine Akkumulation im Zellinneren und eine daraus resultierende (ausschließlich) pathophysiologische/toxische Bedeutung des cCMPs durchaus möglich. Daher war es umso wichtiger, im weiteren Verlauf der Arbeit spezifische cCMP-aktivierte und -bindende Proteine zu identifizieren.

D.2 Identifizierung von cCMP-interagierenden Proteinen

Bisher identifizierte cCMP-interagierende Strukturen sind HCN-Kanäle 2 und 4 [90, 173], MRP5 [92], PDE7A1 [93], sAC [85]/sGC [76] und die Kinasen cAK [87, 88] und cGK [88, 89]. Voraussetzung für die Identifikation dieser Proteine war eine Verbesserung und Weiterentwicklung der Methoden zur Quantifizierung und Detektion von zyklischen Nukleotiden. In dieser Arbeit wurden cCMP-bindende Proteine via Kompetitionsassay und Affinitätschromatographie identifiziert. Das Prinzip der Kompetition beruht auf einer Methode, die 1971 zuerst von Murad et al. publiziert wurde [174].

Es wurde mit verschiedenen cNMP-beladenen Agarosen gearbeitet, die aufgrund erfolgreicher Studien zur Identifizierung von cNMP-bindenden Proteinen synthetisiert wurden. Auch schwache bis mittelstarke Protein-Ligand-Interaktionen können mit dieser Methode gut detektiert werden [87, 175, 176]. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte zuerst mittels Silber-Gel und anschließend (zur genaueren Untersuchung) mittels Western Blot. Bei Versuchen mit 2'-AHC-cCMP-Agarose konnte keine Bindung beobachtet werden (Abbildung 18). Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten überein, die 2012 von Hammerschmidt et al. publiziert wurden [87]. Grund hierfür sind möglicherweise sterische Probleme oder die Tatsache, dass die 2'-Hydroxy-Gruppe essentiell für die Interaktion mit Proteinen ist [87, 177]. Unter Verwendung der 4-AH-cCMP-Agarose konnte bestätigt werden, dass die regulatorischen Untereinheiten I α und II α der cAK mit cCMP spezifisch interagieren [88]. Zudem wurde gezeigt, dass auch die regulatorische I β Untereinheit spezifisch gefällt wird. Anstelle von Zellextrakten wurde allerdings mit Jejunum-, Lungen-, Nieren- und Hirn-Gewebelysaten gearbeitet, da dies einen besseren Rückschluss auf die Rolle von cCMP in physiologischen Prozessen ermöglicht.

Außerdem konnte bestätigt werden, dass cGKI α , cGKI β und cGKII nicht nur von cCMP stimuliert werden können [88, 89], sondern auch spezifisch mit dem zyklischen Nukleotid in Gewebelysaten interagieren. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu dem von Hammerschmidt et al. erzielten Ergebnis. Hier konnte keine spezifische Interaktion mit cGK

detektiert werden. Grund hierfür könnte die geringe Expression von cGK in den verwendeten Zelllinien sein [87].

Zusätzlich konnte p44/42 MAPK als ein möglicher, neuer cCMP-Effektor identifiziert werden. Diese Ergebnisse erweitern das Feld der möglichen Funktionen von cCMP. Zudem legen sie nahe, dass cCMP als Signalmolekül agieren kann, indem es beispielsweise den cAK- und den cGK-Signalweg in den verwendeten Geweben als nicht-kanonischer „second messenger“ beeinflusst (Abbildung 37). In Jejunum-Gewebe war die spezifische Bindung der Proteine (besonders cGKII) an cCMP besonders gut zu detektieren, was eine mögliche Rolle des cCMPs bei Verdauungsvorgängen oder der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen nahe legt. Interessanterweise konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass der cCMP-Spiegel in der Magenmukosa von Ratten erhöht ist, aber nach Verabreichung von Ranitidin, einem H₂-Rezeptor-Blocker, sank. Verabreichte man Prostaglandin (PGI₂ und PGE₂) schwankten die cCMP-Konzentrationen stark. Die Detektion des cCMP-Spiegels erfolgte hier mittels HPLC und lag im fmol/mg Protein Bereich [178]. Zudem könnte die Interaktion cCMP/cGKII Effekte auf die intestinale Sekretion, aber auch auf die mukoziliäre Clearance haben [61, 179]. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass cCMP via cGKI die Plättchenaggregation hemmen und die glatte Muskulatur relaxieren kann. Dieser Effekt konnte bei cGKI-KO Mäusen nicht beobachtet werden [89]. Bezieht man die Daten aus dieser Arbeit mit ein, legt das eine mögliche Rolle des cCMPs (neben anderen zyklischen Nukleotiden) bei der Relaxation von glatter Muskulatur in Jejunum, Lunge und Niere nahe. Auch in Hirngewebe von Mäusen konnte cCMP spezifisch an cGK und cAK gebunden werden. Möglicherweise ist cCMP an der Steuerung des Verhaltens beteiligt, wie in einer Studie von Brus et al. zu beobachten war, die cCMP direkt in die Ventrikel von Ratten applizierten [180]. Weiterhin wurde von Bond et al. gezeigt, dass die kleine GTPase Rab23 ein Effektorprotein von cCMP ist [96]. Rab23 ist u.a. ein negativer Modulator des Sonic hedgehog Signalwegs [181]. Anhand von KO-Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass Rab23 essentiell für die Gehirnentwicklung ist [182, 183]. Möglicherweise ist cCMP somit an neuronalen Prozessen beteiligt. Ein weiteres Target des cCMPs stellen die HCN-Kanäle dar, Kationenkanäle, die durch zyklische Nukleotide modifiziert werden können. Die HCN-Kanäle 2 und 4 können durch cCMP aktiviert werden und sind besonders im Herzen und im Gehirn zu finden, wo sie die Rhythmik beeinflussen [90]. cCMP verhält sich wie ein partieller Agonist und beschleunigt die Aktivierung, bremst aber auch die Deaktivierung der Kanäle. Dabei wirkt cCMP direkt über die HCN-eigene cNMP-Bindungsstelle im C-Terminus, die auch von cAMP oder cGMP besetzt werden kann. Die cNMP-Bindungsdomäne der HCN-Kanäle weist eine hohe Sequenzhomologie zu der Bindungsdomäne der cGKs auf. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass cCMP auch an die cGKs direkt über die cNMP-Bindungsdomäne binden

und wirken kann. Die HCN-Kanäle 1 und 3 sind nicht sensitiv gegenüber cCMP [90]. Somit könnte cCMP einen Effekt auf die Herzfrequenz, aber auch auf neuronale Prozesse haben. Zusätzlich wurde postuliert, dass cCMP an der Fluidsekretion im „Malpighian tubule system“ beteiligt ist - ein System, das für die Exkretion und Osmoregulation in *Drosophila melanogaster* zuständig ist. Die etablierten zyklischen Nukleotide (cAMP, cGMP) hingegen hatten keinen Einfluss auf die Sekretion [184].

Mittlerweile konnte auch in anderen Geweben und Zelllinien cCMP eindeutig nachgewiesen werden. So wurde besonders in den Ovarien (weibliches Fortpflanzungssystem), im Pankreas und in der Milz hohe cCMP-Spiegel detektiert [153]. In Blastozysten konnte bereits in früheren Studien cCMP gefunden werden [172]. Interessanterweise war in den Hoden kein cCMP nachzuweisen, was in Widerspruch mit früheren Arbeiten steht, die cCMP eine entscheidende Rolle bei der Spermienmotilität zusprechen [98]. Weiterhin konnte in Hirn, Niere und Lunge kein cCMP gefunden werden, was den in dieser Arbeit erzielten Daten widerspricht. Möglicherweise ist die Menge an cCMP in diesen Geweben so niedrig, dass sie mit den, in dieser Arbeit verwendeten, massenspektrometrischen Methoden nicht nachgewiesen werden kann.

Durch den eindeutigen Nachweis von cCMP ist es natürlich wichtig weitere cCMP-bindende Proteine zu finden, um eine physiologische Funktion des zyklischen Nukleotids aufzuklären. Hierzu kann neben den cCMP-Agarose-Studien und anderen Proteomik-Studien auch das sogenannte „Cofactor fingerprinting“, gekoppelt mit einer STD-NMR- (Sättigungstransfer-Differenz-Kernspinresonanzspektroskopie) Methode, angewendet werden [185, 186], durch die u. a. Rezeptor-Ligand-Bindungsprozesse aufgeklärt werden können. Mit dieser Methode konnte RSP2 („radial spoke protein-2) als cCMP-interagierendes Protein identifiziert werden [187]. Dieses Protein stammt aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* und ist für die Geißelbewegung des Flagellaten verantwortlich [188]. Als Cofaktor bei der Identifizierung diente GAF, welches cNMPs bindet [189]. RSP2, eine Kinase, besitzt eine GAF-Domäne und bindet cCMP interessanterweise stärker als cAMP und cGMP. Eine Bindung von cCMP an cAK konnte nicht beobachtet werden [187].

Die Entdeckung weiterer cCMP-Effektoren ist entscheidend, da es dadurch zur Entdeckung der physiologischen Rolle des cCMPs und der weiteren Aufklärung des cCMP-Signalwegs kommen könnte. Ein potentieller cCMP-Signaltransduktionsweg in der Zelle ist in Abbildung 37 dargestellt.

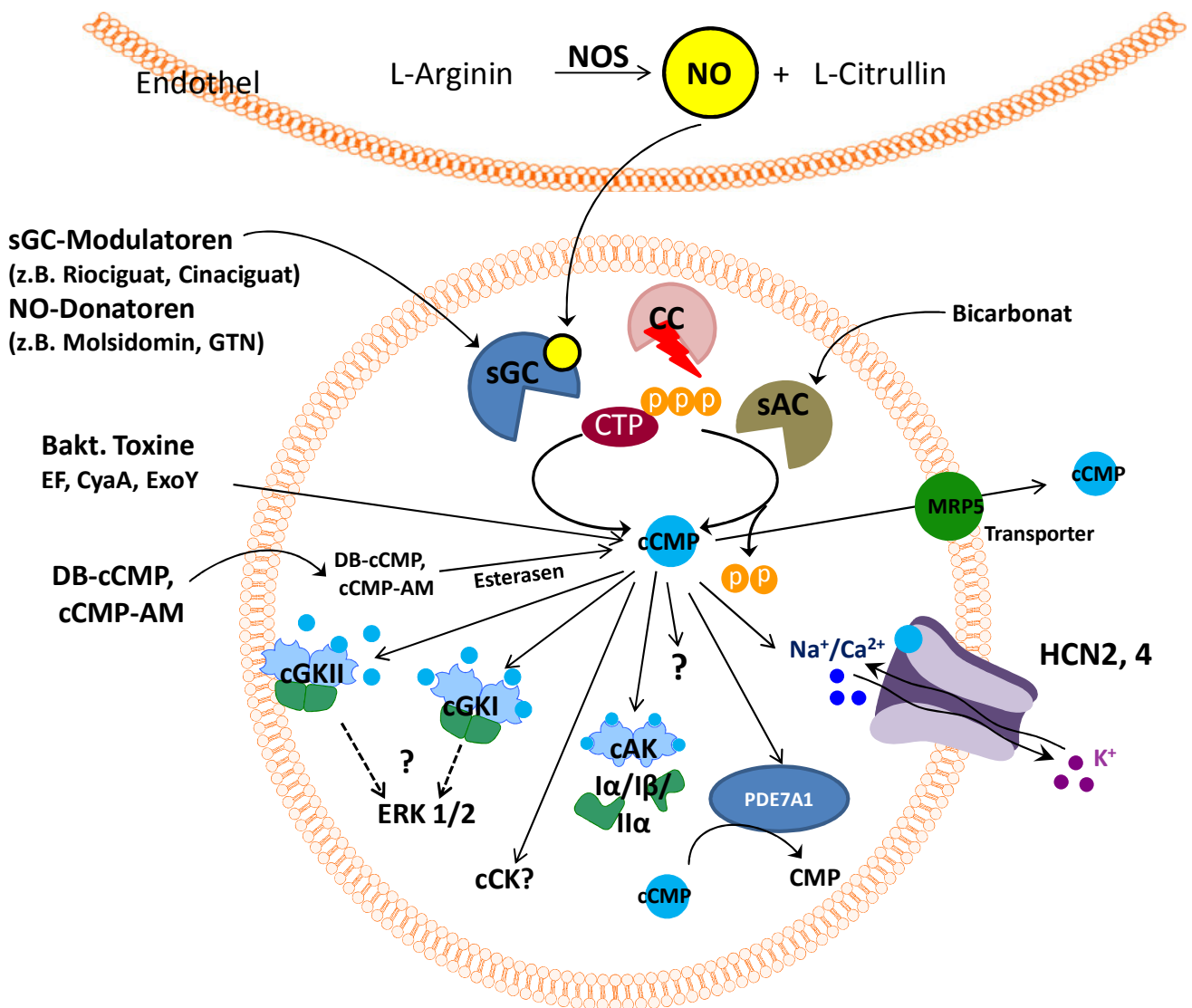


Abbildung 37: Potentieller Signalmechanismus von cGMP. Schematische Darstellung einer Zelle mit möglichen Angriffspunkten für cGMP und Crosstalk zwischen den cNMP-Signalwegen. sGC und sAC generieren aus CTP cGMP. Eine spezifische Cytidylzyklase (CC) existiert nach heutigem Wissensstand nicht. cGMP greift an verschiedenen Targets in der Zelle an und aktiviert cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cAK bzw. cGK) bzw. öffnet spannungsabhängige Kationenkanäle (HCN). Eine cGMP-abhängige Proteinkinase (cCK) konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Der cGMP-Abbau erfolgt über PDE7A1, der cGMP-Transport aus der Zelle über MRP5.

D.3 Interaktion zwischen cCMP und MAPK

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass cGK mit p44/42-MAPK interagiert und dass MAPK spezifisch an die cCMP-Agarose bindet. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob cCMP einen Effekt in der Zellregulation bzw. während des Zellwachstums hat.

Es existieren zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem cGK- bzw. cAK-Signalweg und dem MAPK-Signalweg postulieren [114, 144-146]. Allerdings wird sowohl eine inhibitorische als auch eine aktivatorische Wirkung der zyklischen Nukleotide auf die MAPK beschrieben. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), oder auch ERK („extracellular-regulated kinase) genannt, gegensätzliche Aktionen steuern kann. So wird über MAPK nicht nur die Proliferation und Differenzierung von Zellen gesteuert, sondern auch die Apoptose.

Außerdem wurde gezeigt, dass cAMP aktivierend und inhibierend auf den MAPK-Signalweg wirken kann [114]. Es wurde bereits 1986 ein möglicher stimulatorischer Effekt des zyklischen Nukleotids auf das Zellwachstum beobachtet [190], was später dadurch bestätigt werden konnte, dass cAMP, bzw. die cAK, Rap1 und somit B-Raf aktivieren kann [191, 192]. Zusätzlich wurde bewiesen, dass cAMP Transkriptionsfaktoren, wie Elk1 positiv beeinflussen kann [112]. Hier wurde nun gezeigt, dass cCMP in der Lage ist, cAK direkt zu aktivieren und dass cCMP die MAPK stimulieren kann. Möglicherweise ließe sich diese Wirkung über eine Induktion des cAK-Signalwegs durch cCMP erklären. Die GTPase Rap1 kann jedoch über cAMP auch antiproliferativ wirken und Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren blockieren [193]. Diese diversen Wirkungen korrelieren mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. Stimulierte man p44/42 MAPK direkt mit einem cAMP-Analogen konnte in Jejunum-WT-Gewebe keine bzw. nur eine verminderte Phosphorylierung der MAPK beobachtet werden. In Lungengewebe (WT) hingegen konnte die p42-Isoform deutlich mit cAMP stimuliert werden. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass es durch die unterschiedlichen Effekte von MAPK und von Rap1 in einigen Geweben bzw. Zellen vorzugsweise zu einer Stimulation der Proliferation kommt, wohingegen in anderen Geweben die MAPK-Signalweiterleitung gehemmt wird [114].

Nach wie vor wird dieses Thema kontrovers diskutiert, da eine eindeutige aktivierende bzw. inhibierende Rolle der zyklischen Nukleotide im MAPK-Signalweg weder bewiesen noch entkräftet werden kann. So ist es inzwischen zwar klar, dass p44/42-MAPK ein Target der cGK darstellt [144], jedoch ist die genaue Rolle von cGK in diesem Transduktionsweg noch unklar. Es wurde einerseits in verschiedenen Krebszelllinien gezeigt, dass cGK, insbesondere cGKII, die Aktivierung des EGFR („endothelium growth factor receptor“)

blockiert, darüber den MAPK-Weg hemmt und somit antiproliferativ wirkt [146, 194]. Man vermutet, dass cGKII VASP am Ser239 phosphoryliert und somit die Bindung zwischen Sos1 und Grb2, bzw. die Ras-Aktivierung verhindert [195]. Sos1 und Grb2 verbinden den Ras/MEK-Signalweg mit z.B. dem EGF-Signalweg (siehe A.5 Der MAP-Kinase-Signalweg). Arbeitete man mit einem cGK- oder einem PKC-Inhibitor, konnte die MAPK-Phosphorylierung gesteigert werden [150], was auf eine entscheidende Rolle der Kinasen in diesem Signalweg hindeutet. Andererseits wurde in zahlreichen Publikationen ein proliferativer Effekt von cGMP/cGK postuliert [196, 197]. So wird über cGK die Tyrosinkinase Src aktiviert, dadurch der MAPK-Signalweg, die Produktion von Transkriptionsfaktoren und die Proliferation [198]. cGKII-KO-Tiere zeigten ein reduziertes „MAPK-Signaling“ [199]. In Pankreastumorzellen bewirkte der cGK-Inhibitor DT3 eine verminderte Proliferation und Migration, zeigte zytotoxische Effekte und erhöhte die Nekroserate [144]. Auch in Brustkrebszellen konnte mit einem cGK-Inhibitor (KT5823) die Proliferation und das Wachstum reduziert, die Apoptose jedoch erhöht werden. Durch den sGC-Aktivator YC-1 wurde hingegen die Zellviabilität gesteigert [200].

Setzt man nun die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse in Korrelation mit den Literaturdaten, zeigt sich ein unterschiedliches Wirkprofil für cGKI und cGKII. Die Phosphorylierung der MAPK konnte, möglicherweise über den cGK-Signalweg, durch cCMP gesteigert werden. Als Stimulans wurde DB-cCMP verwendet, ein lipophiles, membrangängiges cCMP-Analogon. Kritisch zu sehen ist die Tatsache, dass sich die Wirkform vom eigentlichen cCMP unterscheidet und somit andere Effekte ausüben könnte als cCMP selbst. DB-cCMP reguliert beispielsweise die Superoxid-Anionen Produktion und wirkt auf Immunzellen [94].

Wie oben bereits erwähnt, wirkt aber auch die cAK auf den MAPK-Weg. Durch Einsatz eines cAK-Inhibitors und eines PKC-Inhibitors wurde die cCMP-induzierte MAPK-Phosphorylierung reduziert, wodurch der cAK und PKC eine entscheidende Rolle im MAPK-Transduktionsweg zugewiesen wird. Interessanterweise steigt die MAPK-Phosphorylierung unter Gabe eines PKC-Inhibitors in manchen Zellarten an, was im Widerspruch zu den in dieser Arbeit erhaltenen Daten steht [150]. Es ist aber anzunehmen, dass der Crosstalk zwischen den Signalwegen in isolierten Zelllinien anders abläuft als in Gesamtgewebe. In cGKII-KO-Gewebe konnte eine starke Zunahme der MAPK-Phosphorylierung bei Stimulation mit cCMP beobachtet werden. Somit würde cGKII antiproliferativ wirken, was mit den von Jiang et al. veröffentlichten Daten übereinstimmt [146]. Dieser Effekt war in Jejunum Gewebe besonders ausgeprägt, höchstwahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass cGKII in hohem Ausmaß im Darm exprimiert wird [29]. In cGKI-KO-Gewebe war die cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung vergleichbar mit WT-Gewebe bzw. wurde sogar noch reduziert. Über cCMP/cGKI könnte es somit zu einer erhöhten MAPK-Stimulation kommen und daraufhin

evtl. zu einer erhöhten Proliferation, wie auch in [144] dargestellt. Zusätzlich konnte, analog [177, 197], gezeigt werden, dass cGMP die MAPK stimuliert.

Mittels Affinitätschromatographie konnte die Mitogen-aktivierte Proteinkinase in Lungen- und Jejunumgewebe als spezifischer cCMP-Effektor identifiziert werden. Mit cGMP interagiert MAPK unspezifisch, was in Widerspruch zu einer Arbeit von Kim et al. steht: Um neue Targets für cGMP zu finden, wurde hier mit cGMP-Agarose-Affinitätschromatographie Hirn-, Herz- und Lebergewebe untersucht und MAPK als ein spezifisches cGMP-bindendes Protein identifiziert [177].

Trotzdem ist die Art der Wechselwirkung zwischen den cNMPs bzw. cGK und dem MAPK-Signalweg weiterhin unklar. Mittels Co-Immunopräzipitation konnte zwar eine Interaktion zwischen cGK und p44/42-MAPK detektiert werden, diese kommt aber höchstwahrscheinlich nicht direkt zustande, sondern über ein Adapterprotein. Somit ist MAPK wahrscheinlich ein sogenanntes „Copräzipitat“, der Interaktionspartner eines gefällten, noch unbekanntes Proteins. Auf Kongressen (Vortrag Prof. Dr. Renate Pilz, 7th International Conference on cGMP, 2015) und in einigen Publikationen [201] wird diskutiert, ob eine Phosphatase an der Interaktion beteiligt ist. Wird der NO/cGMP-Signalweg blockiert, so nimmt auch die Aktivität der MAPK-Phosphatase MKP-1, welche MAPK durch Dephosphorylierung inaktiviert, ab. Somit kommt es zu einer steigenden Proliferation und Migration. Allerdings sind diese Überlegungen rein spekulativ und weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die Interaktion zu klären. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Komplexe cGKI/MAPK und cGKII/MAPK durch cCMP aktiviert werden können. Um herauszufinden, ob diese Komplexe in verschiedenen Geweben zelluläre Prozesse regulieren können, bedarf es allerdings weiterer Studien. Außerdem könnte so eine mögliche Rolle des cCMPs bei (patho)physiologischen Vorgängen geklärt werden.

D.4 cNMP-Detektion und (patho)physiologische Relevanz des cCMPs in der Sepsis?

Die Sepsis, oder auch Blutvergiftung, besitzt einen hochkomplexen Krankheitsverlauf, in dessen Verlauf Entzündungsmediatoren, wie NO, Interferone und Leukotriene, hochreguliert werden und dessen pathophysiologischer Mechanismus nach wie vor nicht vollständig geklärt ist. Die NO-Konzentration während einer Sepsis ist beispielsweise um das bis zu 1000-fache höher als der Basalspiegel [124, 151] und wirkt dadurch zytotoxisch bzw. bewirkt einen starken Blutdruckabfall. Ein Sepsis-ähnlicher Zustand wurde in der vorliegenden Arbeit durch intraperitoneale Applikation von Lipopolysacchariden (LPS) ausgelöst. Dies sind Endotoxine, die aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (z. B. *E. coli*) stammen. Das Ziel des Versuchs war es, anschließend die Änderung der zyklischen Nukleotide, u. a. auch cCMP, nachzuverfolgen.

Zyklische Nukleotide können durch bakterielle Toxine im Überschuss gebildet werden und spielen daher in pathophysiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. So kann das hitzestabile Enterotoxin aus *E.coli* die pGC-C aktivieren und so starke Diarrhoe auslösen [202]. ExoY, ein Toxin aus *Pseudomonas aeruginosa*, ahmt die physiologische Funktion von sAC und sGC nach, wodurch verstärkt cAMP und cGMP produziert wird [203, 204]. Bakterielle Toxine, die vermehrt cAMP produzieren, sind CyaA aus *Bordetella pertussis*, EF aus *Bacillus anthracis* und das Cholera-toxin, welches eine permanente AC-Aktivierung bewirkt [79]. Vor Kurzem konnte auch gezeigt werden, dass die bakteriellen AC-Toxine ExoY, CyaA und EF in der Lage sind, cCMP zu synthetisieren [83, 205].

Wie bereits in der Einleitung erläutert, spielt NO bei der Entstehung eines septischen Schocks eine wichtige Rolle. Durch Zytokine und auch LPS wird die induzierbare NO-Synthase stimuliert, wodurch vermehrt NO aus Makrophagen oder auch anderen Immunzellen freigesetzt wird [206]. Dadurch sollte es dann im weiteren Verlauf der Sepsis, über die Aktivierung der sGC zu einem Anstieg der zyklischen Nukleotide kommen (Abbildung 34). Allerdings liegen dazu in der Literatur noch wenige Daten vor. Interessanterweise schützt eine Vorbehandlung mit dem NO-Donor und Vasodilatator Nitrit vor einem tödlichen Verlauf der LPS-induzierten Sepsis [207]. Weiterhin konnte mit sGC-KO-Mäusen gezeigt werden, dass cGMP kardiovaskuläre Funktionsstörungen während einer Sepsis minimieren kann [208]. Cinaciguat, ein sGC-Aktivator, konkurriert mit NO um die Häm-Bindungsstelle des Häm-freien sGCs und schützt das Enzym somit vor einer Proteolyse. Zudem liefert dieser Schutz vor einem endotoxischen Schock, indem u.a. die Interleukin-Konzentration und die Hypothermie vermindert werden. Allerdings muss die Gabe des Aktivators im richtigen Zeitfenster 8 Stunden nach der LPS-Behandlung erfolgen, sonst zeigt sich keine Wirkung

bzw. wird die LPS-Wirkung verstärkt. Versuche mit sGC-Stimulatoren und PDE5-Inhibitoren zeigten keinen positiven Effekt [209].

Dass NO aber entscheidend in diesen Vorgang involviert ist, steht außer Frage. So konnte Hollenberg et al. zeigen, dass iNOS-KO-Mäuse resistent gegenüber LPS-vermittelten, kardiovaskulären Problemen sind [210]. Der NO-Spiegel dieser Mäuse blieb auch nach LPS-Behandlung auf Basalniveau [125]. Auch pGC-A-KO-Mäuse zeigten gegenüber LPS eine „Resistenz“ und entwickelten keinen septischen Schock. Grund hierfür ist eine vermehrte Freisetzung von natriuretischen Peptiden während einer Sepsis [211]. Desweiteren wird eine Rolle der cGK, besonders cGKI, bei der Entstehung von Entzündungsprozessen diskutiert [125, 212]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass zyklische Nukleotide, darunter auch cCMP, während einer Sepsis hochreguliert werden. Es wurden für diese Untersuchungen WT-Tiere verwendet. cGKI-KO-Mäuse waren aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes für dieses Experiment nicht geeignet. Eine zusätzliche Gabe von ODQ, einem sGC-Inhibitor, brachte keine Veränderung der cNMP-Spiegel. Normalerweise wäre jedoch ein starker Abfall der Konzentrationen zu erwarten gewesen. Möglicherweise wird die cNMP-Synthese hier aber von anderen Zyklasten (sAC) übernommen. Dies würde mit den Daten von Glynos et al. übereinstimmen, die unter Gabe von ODQ sogar eine Verschlimmerung der LPS-induzierten Sepsis feststellten. Zusätzlich konnten sie eine verminderte sGC-Expression während eines endotoxischen Schocks detektieren [213]. Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass unter LPS-Behandlung in WT-Mäusen die p44/42 MAPK-Phosphorylierung steigt. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [204, 214], die zudem mittels siRNA nachwiesen, dass MKP-1 an der Regulation der Immunantwort beteiligt ist [215].

Die angewendete Methode zur cNMP-Bestimmung beruht auf dem Verfahren der LC-MS/MS. Hiermit konnte bereits 1996 erfolgreich cCMP nachgewiesen werden [216]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Vermessung mehrerer Analyten (cAMP, cGMP, cCMP) in unterschiedlichen Matrices, wie Gewebe oder auch Plasma [217]. Die Detektionsgrenze ist sehr niedrig. Durch vorgeschaltete Prozesse kann diese weiter gesenkt werden. Der limitierende Faktor bei der cNMP-Bestimmung ist diese Nachweisgrenze. So liegt die basale cCMP-Konzentration in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten höchstwahrscheinlich im pico- bis nanomolaren Bereich und ist daher schwer zu detektieren [153, 160]. In Urin liegen die Basalkonzentrationen für cAMP bei ca. 800-1000pmol/ml, für cGMP bei ca. 100pmol/ml und für cCMP bei ca. 0.3pmol/ml (bzw. n.d.). In verschiedenen Zelllinien, wie HEK293, konnten allerdings basale cCMP-Spiegel von bis zu 30 μ M gemessen werden, die sogar in etwa den gemessenen cGMP-Spiegeln entsprachen [84].

cCMP wurde zuerst via Fast Atom Bombardment, einem Ionisierungsverfahren gekoppelt mit Massenspektrometrie, nachgewiesen [82]. Dies konnte aber in den folgenden Jahren nicht bestätigt werden und man zweifelte die Existenz von cCMP an, da diese Methode zu unspezifisch und ungenau war. Zudem war eine Unterscheidung nur bei Stoffen möglich, die einen Massenunterschied von mehr als 1Da aufwiesen, was beispielsweise bei cCMP und cUMP nicht gegeben ist (cCMP: 306.05Da, cUMP: 307.03Da) (siehe Doktorarbeit Dr. Kerstin Beste). Später wurde versucht, cCMP via Kapillarelektrophorese, HPLC, RIA oder ELISA nachzuweisen, allerdings waren die Verfahren entweder zu unspezifisch, nicht sensitiv genug oder der passende cCMP-Antikörper war nicht vorhanden. Besonders ein cCMP-Antikörper, analog zum cGMP-Antikörper, wie er 1970 von Steiner et al. entwickelt wurde [218, 219], wäre ein großer Fortschritt in der cCMP-Detektion. Mittels HPLC-MS/MS (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie) und HPLC-MS/TOF (HPLC gekoppelt mit Flugzeitmassenspektrometrie) konnte cCMP quantifiziert und identifiziert werden [76]. Da diese Methode zwar eine höhere Selektivität, aber eine geringere Sensitivität besitzt als die LC-MS/MS, wurden die in dieser Arbeit gesammelten Proben mit letztgenanntem Verfahren vermessen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Ergebnisse gewonnen werden, die die Wirkung von cCMP als „second messenger“ weiter bekräftigen. Insbesondere konnten cGKI, cGKII, cAK und MAPK als cCMP-interagierende Proteine identifiziert werden. Möglicherweise ist cCMP an physiologischen Prozessen in der Lunge und im Jejunum beteiligt und auch bei pathophysiologischen Prozessen könnte cCMP eine Rolle spielen. Inwiefern cCMP allerdings für diese (patho)physiologische Prozesse relevant ist, muss in weiteren Studien geklärt werden.

E. Zusammenfassung

Die purinen zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP sind etablierte „second messenger“ und spielen bei zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen, wie z. B. der Regulation des Blutdrucks, des Zellwachstums bzw. der Zelldifferenzierung eine essentielle Rolle. Die Existenz des pyrimidinen zyklischen Nukleotids cCMP wurde Ende der 1970er Jahre postuliert, konnte aber aufgrund der mangelnden Sensitivität der Methoden nicht eindeutig bewiesen werden. Auch das Vorkommen von spezifischen cCMP-interagierenden Proteinen, einer cCMP-spaltenden PDE oder einer cCMP-bildenden Zykklase konnte nicht bestätigt werden. In den Folgejahren wurde die Existenz bzw. physiologische Relevanz von cCMP kontrovers diskutiert und die Forschung auf diesem Feld kam fast vollständig zum Erliegen.

Jahre später gelang es mit verfeinerten massenspektrometrischen Methoden cCMP *in vitro* und *in vivo* eindeutig nachzuweisen. Kurz darauf wurde festgestellt, dass in Bakterien sAC und sGC eine Cytidylzyklase-Aktivität aufweisen, d. h. cCMP generieren können. Vor kurzem wurde die spezifische cCMP-abbauende PDE7A1 gefunden und auch zahlreiche cCMP-interagierende Proteine, wie cAK, cGK, MRPs und HCN-Kanäle, wurden identifiziert. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass cCMP als „second messenger“ an (patho)physiologischen Abläufen beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk darauf gelegt, weitere Belege für die „second messenger“-Funktion des cCMPs zu finden. Hierzu wurde zu Beginn versucht aufgereinigte cNMP-abhängige Proteinkinasen (unter Verwendung von verschiedenen Substraten) mit steigenden cCMP Konzentrationen zu stimulieren. Es konnte bestätigt werden, dass sowohl aufgereinigte cAK, als auch gereinigte cGKI bzw. cGKII durch cCMP aktivierbar sind. Um die physiologische Relevanz des cCMPs weiter zu untersuchen, wurden auch endogene cG-Kinasen in Gewebelysaten mit cCMP konzentrations-abhängig stimuliert. Um eine cAK-vermittelte Phosphorylierung auszuschließen, wurde ein cAK-Inhibitor zugesetzt. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte mittels cCMP-Agarose Fällungsstudien bestätigt werden, dass cGKI, cGKII und cAK I α /I β /II α reg in verschiedenen Geweben spezifisch mit cCMP interagieren können. Desweiteren wurde MAPK als ein spezifisch cCMP-bindendes Protein identifiziert. Mithilfe von Co-Immunpräzipitationen wurde außerdem gezeigt, dass zwischen cGKI α bzw. cGKII und p44/42 MAPK eine Protein-Protein-Interaktion besteht. Stimulierte man die MAP-Kinase direkt mit einem cCMP-Analogen, kam es zu einer erhöhten MAPK-Phosphorylierung, welche bei Zugabe eines cAK-Inhibitors und eines PKC-Inhibitors fast vollständig gehemmt werden konnte. Um die Rolle der cGK in diesem Prozess genauer zu untersuchen, wurde mit cGK-KO-Tieren gearbeitet. Besonders in cGKII-KO-Gewebe konnte eine stark erhöhte MAPK-Phosphorylierung detektiert werden. cGKI-KO-

Gewebe zeigte eine verminderte MAPK-Phosphorylierung im Vergleich zum WT-Gewebe. Bei Stimulation der MAPK mit cGMP und cAMP nahm die Phosphorylierung zwar auch zu, schwankte aber stark.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass cAK und cGKI aktivierend und cGKII inhibierend auf die cCMP-vermittelte MAPK-Phosphorylierung wirken. Somit wird die p44p42 MAPK-Phosphorylierung möglicherweise (neben anderen Vorgängen) über cGMP-abhängige Kinasen reguliert, welche durch cNMPs stimuliert werden.

Um eine mögliche pathophysiologische Relevanz des cCMPs genauer zu klären, wurde in Mäusen mittels LPS eine Sepsis induziert und daraufhin im Urin die cNMP-Spiegel vermessen. Hier zeigte sich die Tendenz, dass sowohl cAMP, cGMP, als auch cCMP im Laufe dieser starken Entzündungsreaktion hochreguliert werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass cCMP als „second messenger“ im cAK/cGK- und im MAPK-Signalweg wirken und bei (patho)physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen könnte.

F. Literaturverzeichnis

F.1 Zitierte wissenschaftliche Veröffentlichungen

1. Murad, F., et al., Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1978. **9**: p. 145-58.
2. Furchgott, R.F., The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1984. **24**: p. 175-97.
3. Ignarro, L.J., et al., Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986. **237**(3): p. 893-900.
4. Ignarro, L.J., et al., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
5. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem*, 1958. **232**(2): p. 1065-76.
6. Smith, M.D., G.I.; Khorana, H.G., Cyclic phosphates. IV. Ribonucleoside 3', 5'-cyclic phosphates. A general method of synthesis and some properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961. **83** (3), pp 698–706.
7. Lloyd-Jones, D.M. and K.D. Bloch, The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*, 1996. **47**: p. 365-75.
8. Griffith, O.W. and D.J. Stuehr, Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 707-36.
9. Walford, G. and J. Loscalzo, Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(10): p. 2112-8.
10. Ghosh, D.K. and J.C. Salerno, Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. d193-209.
11. Villanueva, C. and C. Giulivi, Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(3): p. 307-16.
12. Hanafy, K.A., J.S. Krumenacker, and F. Murad, NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 2001. **7**(4): p. 801-19.
13. Forstermann, U. and W.C. Sessa, Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
14. Klein, C., Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell Signal*, 2002. **14**(6): p. 493-8.
15. Ignarro, L.J., et al., Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta*, 1982. **718**(1): p. 49-59.
16. Kamisaki, Y., et al., Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*, 1986. **261**(16): p. 7236-41.

-
17. Garbers, D.L., Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*, 1979. **254**(1): p. 240-3.
 18. Koesling, D., et al., The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett*, 1988. **239**(1): p. 29-34.
 19. Koesling, D., et al., The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett*, 1990. **266**(1-2): p. 128-32.
 20. Gerzer, R., F. Hofmann, and G. Schultz, Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem*, 1981. **116**(3): p. 479-86.
 21. Krumenacker, J.S., K.A. Hanafy, and F. Murad, Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*, 2004. **62**(6): p. 505-15.
 22. Potter, L.R., et al., Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 341-66.
 23. Schmidt, H.H., P.M. Schmidt, and J.P. Stasch, NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 309-39.
 24. Stasch, J.P. and A.J. Hobbs, NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 277-308.
 25. Megson, I.L. and M.R. Miller, NO and sGC-stimulating NO donors. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 247-76.
 26. Sonnenburg, W.K. and J.A. Beavo, Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, 1994. **26**: p. 87-114.
 27. Biel, M., Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *J Biol Chem*, 2009. **284**(14): p. 9017-21.
 28. Schlossmann, J., R. Feil, and F. Hofmann, Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, 2003. **35**(1): p. 21-7.
 29. Hofmann, F., et al., cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 137-62.
 30. Bender, A.T. and J.A. Beavo, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(3): p. 488-520.
 31. Worner, R., et al., cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(1): p. H237-44.
 32. Butcher, R.W. and E.W. Sutherland, Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 1244-50.
 33. Lucas, K.A., et al., Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 375-414.
 34. Lugnier, C., Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 2006. **109**(3): p. 366-98.
 35. Sager, G., Cyclic GMP transporters. *Neurochem Int*, 2004. **45**(6): p. 865-73.

-
36. Kaupp, U.B. and R. Seifert, Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, 2002. **82**(3): p. 769-824.
 37. Biel, M., et al., Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*, 2009. **89**(3): p. 847-85.
 38. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991. **43**(2): p. 109-42.
 39. Ghofrani, H.A., G. Simonneau, and L.J. Rubin, Riociguat for pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 2013. **369**(23): p. 2268.
 40. Stasch, J.P. and O.V. Evgenov, Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol*, 2013. **218**: p. 279-313.
 41. Abbott-Banner, K.H. and C.P. Page, Dual PDE3/4 and PDE4 inhibitors: novel treatments for COPD and other inflammatory airway diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014. **114**(5): p. 365-76.
 42. Kumar, N., et al., Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases. *BMC Med*, 2013. **11**: p. 96.
 43. Wachtel, H., Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology*, 1983. **22**(3): p. 267-72.
 44. Kanes, S.J., et al., Rolipram: a specific phosphodiesterase 4 inhibitor with potential antipsychotic activity. *Neuroscience*, 2007. **144**(1): p. 239-46.
 45. Pfeifer, A., et al., Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 1999. **135**: p. 105-149.
 46. Wernet, W., V. Flockerzi, and F. Hofmann, The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, 1989. **251**(1-2): p. 191-6.
 47. Orstavik, S., et al., Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics*, 1997. **42**(2): p. 311-8.
 48. Landgraf, W., et al., Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism. *Biochemistry*, 1990. **29**(42): p. 9921-8.
 49. Glass, D.B. and E.G. Krebs, Comparison of the substrate specificity of adenosine 3':5'-monophosphate- and guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases. Kinetic studies using synthetic peptides corresponding to phosphorylation sites in histone H2B. *J Biol Chem*, 1979. **254**(19): p. 9728-38.
 50. Tegge, W., et al., Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry*, 1995. **34**(33): p. 10569-77.
 51. Pohler, D., et al., Expression, purification, and characterization of the cGMP-dependent protein kinases I beta and II using the baculovirus system. *FEBS Lett*, 1995. **374**(3): p. 419-25.
 52. Ruth, P., et al., Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase I alpha. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10522-8.

-
53. Hofmann, F., et al., Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1135**(1): p. 51-60.
 54. Wooldridge, A.A., et al., 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*, 2004. **279**(33): p. 34496-504.
 55. Schlossmann, J., et al., Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, 2000. **404**(6774): p. 197-201.
 56. Geiselhoring, A., et al., Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*, 2004. **575**(1-3): p. 19-22.
 57. Butt, E., et al., 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*, 1994. **269**(20): p. 14509-17.
 58. Lindsay, S.L., et al., Modulation of lamellipodial structure and dynamics by NO-dependent phosphorylation of VASP Ser239. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 17): p. 3011-21.
 59. Lalli, M.J., et al., [Ca²⁺]_i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 2): p. H963-70.
 60. Chikuda, H., et al., Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev*, 2004. **18**(19): p. 2418-29.
 61. Pfeifer, A., et al., Intestinal Secretory Defects and Dwarfism in Mice Lacking cGMP-Dependent Protein Kinase II. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2082-2086.
 62. Weber, S., et al., Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res*, 2007. **101**(11): p. 1096-103.
 63. de Vente, J., et al., Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*, 2001. **108**(1): p. 27-49.
 64. Werner, C., et al., Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci*, 2004. **20**(12): p. 3498-506.
 65. Gambaryan, S., et al., Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *The Journal of clinical investigation*, 1996. **98**(3): p. 662-670.
 66. Vaandrager, A.B., et al., 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*, 1998. **95**(4): p. 1466-71.
 67. Pfeifer, A., et al., Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, 1998. **17**(11): p. 3045-51.
 68. Feil, R., et al., Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 907-16.
 69. Schlossmann, J., R. Feil, and F. Hofmann, Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci*, 2005. **10**: p. 1279-89.
 70. Hardman, J.G., G.A. Robison, and E.W. Sutherland, Cyclic nucleotides. *Annu Rev Physiol*, 1971. **33**: p. 311-36.

-
71. Pierre, S., et al., Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(4): p. 321-35.
 72. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(6): p. 3363-7.
 73. Fimia, G.M. and P. Sassone-Corsi, Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 11): p. 1971-2.
 74. Johnson, D.A., et al., Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev*, 2001. **101**(8): p. 2243-70.
 75. Bos, J.L., Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(9): p. 733-8.
 76. Beste, K.Y., et al., Nucleotidyl cyclase activity of soluble guanylyl cyclase alpha1beta1. *Biochemistry*, 2012. **51**(1): p. 194-204.
 77. Bloch, A., Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP). I. Isolation from extracts of leukemia L-1210 Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974. **58**(3): p. 652-9.
 78. Bloch, A., G. Dutschman, and R. Maue, Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP). II. Initiation of leukemia L-1210 cell growth in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974. **59**(3): p. 955-9.
 79. Seifert, R., E.H. Schneider, and H. Bahre, From canonical to non-canonical cyclic nucleotides as second messengers: pharmacological implications. *Pharmacol Ther*, 2015. **148**: p. 154-84.
 80. Cech, S.Y. and L.J. Ignarro, Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP) formation in mammalian tissues. *Science*, 1977. **198**(4321): p. 1063-5.
 81. Gaion, R.M. and G. Krishna, Cytidylate cyclase: the product isolated by the method of Cech and Ignarro is not cytidine 3',5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979. **86**(1): p. 105-11.
 82. Newton, R.P., et al., Extraction, purification and identification of cytidine 3',5'-cyclic monophosphate from rat tissues. *Biochem J*, 1984. **221**(3): p. 665-73.
 83. Gottle, M., et al., Cytidylyl and uridylyl cyclase activity of bacillus anthracis edema factor and *Bordetella pertussis* CyaA. *Biochemistry*, 2010. **49**(26): p. 5494-503.
 84. Hartwig, C., et al., cAMP, cGMP, cCMP and cUMP concentrations across the tree of life: High cCMP and cUMP levels in astrocytes. *Neurosci Lett*, 2015. **579**: p. 183-7.
 85. Hasan, A., et al., Soluble adenylyl cyclase accounts for high basal cCMP and cUMP concentrations in HEK293 and B103 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **448**(2): p. 236-40.
 86. Bahre, H., et al., Nucleotidyl cyclase activity of soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **443**(4): p. 1195-9.
 87. Hammerschmidt, A., et al., Binding of regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase to cyclic CMP agarose. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e39848.
 88. Wolter, S., M. Golombek, and R. Seifert, Differential activation of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases by cyclic purine and pyrimidine nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **415**(4): p. 563-6.

-
89. Desch, M., et al., Cyclic cytidine 3',5'-monophosphate (cCMP) signals via cGMP kinase I. *FEBS Lett*, 2010. **584**(18): p. 3979-84.
 90. Zong, X., et al., Regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel activity by cCMP. *J Biol Chem*, 2012. **287**(32): p. 26506-12.
 91. Beckert, U., et al., cNMP-AMs mimic and dissect bacterial nucleotidyl cyclase toxin effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **451**(4): p. 497-502.
 92. Laue, S., et al., cCMP is a substrate for MRP5. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014. **387**(9): p. 893-5.
 93. Monzel, M., et al., PDE7A1 hydrolyzes cCMP. *FEBS Lett*, 2014. **588**(18): p. 3469-74.
 94. Ervens, J. and R. Seifert, Differential modulation by N4, 2'-O-dibutyl cytidine 3':5'-cyclic monophosphate of neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **174**(1): p. 258-67.
 95. Ervens, J., G. Schultz, and R. Seifert, Differential regulation of chemoattractant-induced superoxide formation in human neutrophils by cell-permeant analogues of cyclic AMP and cyclic GMP. *Biochem Soc Trans*, 1991. **19**(1): p. 59-63.
 96. Bond, A.E., et al., Mass spectrometric identification of Rab23 phosphorylation as a response to challenge by cytidine 3',5'-cyclic monophosphate in mouse brain. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007. **21**(16): p. 2685-92.
 97. Ding, S., et al., Online immobilized metal affinity chromatography/mass spectrometric analysis of changes elicited by cCMP in the murine brain phosphoproteome. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008. **22**(24): p. 4129-38.
 98. Chan, P.J., et al., Cyclic CMP (cytidine 3',5'-monophosphate) suppresses changes in human sperm amplitude of lateral head displacement and hyperactivation. *Experientia*, 1990. **46**(7): p. 734-6.
 99. Garnett, M.J. and R. Marais, Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 2004. **6**(4): p. 313-9.
 100. Cargnello, M. and P.P. Roux, Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011. **75**(1): p. 50-83.
 101. Cooper, J.A., et al., Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell*, 1982. **31**(1): p. 263-73.
 102. Wan, P.T., et al., Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 2004. **116**(6): p. 855-67.
 103. Wojnowski, L., et al., Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 2000. **91**(1-2): p. 97-104.
 104. Sturgill, T.W., et al., Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 1988. **334**(6184): p. 715-8.
 105. Boulton, T.G., et al., An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, 1990. **249**(4964): p. 64-7.
 106. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, 2010. **429**(3): p. 403-17.

-
107. Bogoyevitch, M.A., et al., c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(3): p. 463-75.
 108. Deak, M., et al., Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J*, 1998. **17**(15): p. 4426-41.
 109. Vermeulen, L., et al., The versatile role of MSKs in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 2009. **34**(6): p. 311-8.
 110. Ben-Levy, R., et al., Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*, 1998. **8**(19): p. 1049-57.
 111. Kolch, W., et al., Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 1993. **364**(6434): p. 249-52.
 112. Vossler, M.R., et al., cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, 1997. **89**(1): p. 73-82.
 113. Ohtsuka, T., et al., Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. *J Biol Chem*, 1996. **271**(3): p. 1258-61.
 114. Stork, P.J. and J.M. Schmitt, Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*, 2002. **12**(6): p. 258-66.
 115. Browning, D.D., N.D. Windes, and R.D. Ye, Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by lipopolysaccharide in human neutrophils requires nitric oxide-dependent cGMP accumulation. *J Biol Chem*, 1999. **274**(1): p. 537-42.
 116. Browning, D.D., et al., Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2811-6.
 117. Suhasini, M., et al., Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(12): p. 6983-94.
 118. Salama, A.K. and K.B. Kim, Trametinib (GSK1120212) in the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother*, 2013. **14**(5): p. 619-27.
 119. Salama, A.K. and K.B. Kim, MEK inhibition in the treatment of advanced melanoma. *Curr Oncol Rep*, 2013. **15**(5): p. 473-82.
 120. Brunkhorst, F.M., [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2006. **41**(1): p. 43-4.
 121. Engel, C., et al., Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 2007. **33**(4): p. 606-18.
 122. Vincent, J.L., A. Yagushi, and O. Pradier, Platelet function in sepsis. *Crit Care Med*, 2002. **30**(5 Suppl): p. S313-7.
 123. Cohen, J., The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
 124. Cobb, J.P., Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)*, 2001. **2**(2): p. 93-100; discussion 100-1.
 125. Hickey, M.J., et al., Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *Faseb J*, 1997. **11**(12): p. 955-64.

-
126. Kilbourn, R.G., et al., Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **172**(3): p. 1132-8.
 127. Chauhan, S.D., et al., Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *Faseb J*, 2003. **17**(6): p. 773-5.
 128. Thiemermann, C., Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol*, 1997. **29**(2): p. 159-66.
 129. Aktan, F., iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, 2004. **75**(6): p. 639-53.
 130. Sutherland, E.W., *Studies on the mechanism of hormone action. Nobel lecture*, 1971.
 131. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
 132. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
 133. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 134. Kerenyi, L. and F. Gallyas, A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. *Clin Chim Acta*, 1972. **38**(2): p. 465-7.
 135. Weiss, W., F. Weiland, and A. Gorg, Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Methods Mol Biol*, 2009. **564**: p. 59-82.
 136. Aye, T.T., et al., Selectivity in enrichment of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits type I and type II and their interactors using modified cAMP affinity resins. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(5): p. 1016-28.
 137. Wentworth, J.K., G. Pula, and A.W. Poole, Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem J*, 2006. **393**(Pt 2): p. 555-64.
 138. Roskoski, R., Jr., Assays of protein kinase. *Methods Enzymol*, 1983. **99**: p. 3-6.
 139. Glass, D.B., et al., 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*, 1989. **264**(15): p. 8802-10.
 140. Vaughn, J.L., et al., The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 1977. **13**(4): p. 213-7.
 141. Landgraf, W., et al., Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem*, 1986. **154**(1): p. 113-7.
 142. Ammendola, A., et al., Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 24153-9.
 143. Cook, A.L. and J.M. Haynes, Protein kinase G II-mediated proliferative effects in human cultured prostatic stromal cells. *Cell Signal*, 2004. **16**(2): p. 253-61.
 144. Karakhanova, S., et al., Interlude of cGMP and cGMP/protein kinase G type 1 in pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas*, 2014. **43**(5): p. 784-94.

-
145. Basu, N., et al., *Intestinal cell proliferation and senescence are regulated by receptor guanylyl cyclase C and p21*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(1): p. 581-93.
146. Jiang, L., et al., *PKG II inhibits EGF/EGFR-induced migration of gastric cancer cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61674.
147. Wolter, S., et al., *N-monobutyl-cGMP activates PKA RIalpha and PKA RIIalpha more potently and with higher efficacy than PKG Ialpha in vitro but not in vivo*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014. **387**(12): p. 1163-75.
148. Schwede, F., et al., *Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs*. *Pharmacol Ther*, 2000. **87**(2-3): p. 199-226.
149. Musashi, M., S. Ota, and N. Shiroshita, *The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis*. *Int J Hematol*, 2000. **72**(1): p. 12-9.
150. Zeng, Z., et al., *The cross talk between cGMP signal pathway and PKC in pulmonary endothelial cell angiogenesis*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(6): p. 10185-98.
151. Russel, J.A., *The current management of septic shock*. *Minerva Med*, 2008. **99**(5): p. 431-58.
152. Beavo, J.A. and L.L. Brunton, *Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(9): p. 710-8.
153. Bahre, H., et al., *cCMP and cUMP occur in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **460**(4): p. 909-14.
154. Bahre, H. and V. Kaefer, *Measurement of 2',3'-cyclic nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in cells*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014. **964**: p. 208-11.
155. Spangler, C., Ladant D., Tang W.-J., Kaefer V., Seifert R., *Nukleotidyl Zyklase Aktivität der bakteriellen Endotoxine CyaA und EF und deren Einfluss auf zelluläre zyklische Nukleotidspiegel*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2010. **381**.
156. Rahman, N., J. Buck, and L.R. Levin, *pH sensing via bicarbonate-regulated "soluble" adenylyl cyclase (sAC)*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 343.
157. Singh, S. and J.S. Tandon, *Coleonol and forskolin from Coleus forskohlii*. *Planta Med*, 1982. **45**(5): p. 62-3.
158. Sutkowski, E.M., et al., *Regulation of forskolin interactions with type I, II, V, and VI adenylyl cyclases by Gs alpha*. *Biochemistry*, 1994. **33**(43): p. 12852-9.
159. Hacker, B.M., et al., *Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9)*. *Genomics*, 1998. **50**(1): p. 97-104.
160. Beste, K.Y. and R. Seifert, *cCMP, cUMP, cTMP, cIMP and cXMP as possible second messengers: development of a hypothesis based on studies with soluble guanylyl cyclase alpha(1)beta(1)*. *Biol Chem*, 2013. **394**(2): p. 261-70.
161. Seifert, R., *cCMP and cUMP: emerging second messengers*. *Trends Biochem Sci*, 2015. **40**(1): p. 8-15.
162. Reinecke, D., et al., *Human cyclic nucleotide phosphodiesterases possess a much broader substrate-specificity than previously appreciated*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(20): p. 3259-62.
163. Kaukel, E. and H. Hilz, *Permeation of dibutyl cAMP into HeLa cells and its conversion to monobutyl cAMP*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972. **46**(2): p. 1011-8.

-
164. Feil, R., S. Muller, and F. Hofmann, High-level expression of functional cGMP-dependent protein kinase using the baculovirus system. *FEBS Lett*, 1993. **336**(1): p. 163-7.
165. Francis, S.H. and J.D. Corbin, Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1999. **36**(4): p. 275-328.
166. Roskoski, R., Jr., A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, 2015.100: 1-23
167. Schmidt, P.M., Biochemical Detection of cGMP From Past to Present: An Overview. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 195-228.
168. Schultz, G., E. Bohme, and K. Munske, Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci*, 1969. **8**(24): p. 1323-32.
169. Murad, F. and A.G. Gilman, Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: a simultaneous protein binding assay. *Biochim Biophys Acta*, 1971. **252**(2): p. 397-400.
170. Schultz, G., et al., A new enzymatic assay for guanosine 3':5'-cyclic monophosphate and its application to the ductus deferens of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. **70**(6): p. 1721-5.
171. Sausbier, M., et al., Mechanisms of NO/cGMP-Dependent Vasorelaxation. *Circulation Research*, 2000. **87**(9): p. 825-830.
172. Chan, P.J., The effect of cyclic cytidine 3',5'-monophosphate (cCMP) on the *in vitro* development, hatching and attachment of the mouse blastocyst. *Experientia*, 1987. **43**(8): p. 929-30.
173. Akimoto, M., et al., A mechanism for the auto-inhibition of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel opening and its relief by cAMP. *J Biol Chem*, 2014. **289**(32): p. 22205-20.
174. Murad, F., V. Manganiello, and M. Vaughan, A simple, sensitive protein-binding assay for guanosine 3':5'-monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(4): p. 736-9.
175. Hanke, S.E., et al., Cyclic nucleotides as affinity tools: phosphorothioate cAMP analogues address specific PKA subproteomes. *N Biotechnol*, 2010. **28**(4): p. 294-301.
176. Bertinetti, D., et al., Chemical tools selectively target components of the PKA system. *BMC Chem Biol*, 2009. **9**: p. 3.
177. Kim, E. and J.M. Park, Identification of novel target proteins of cyclic GMP signaling pathways using chemical proteomics. *J Biochem Mol Biol*, 2003. **36**(3): p. 299-304.
178. Balint, G.A., et al., On a possible new intracellular signal-system in rat gastric mucosa. *J Physiol Paris*, 2001. **95**(1-6): p. 243-5.
179. Nie, H.-G., et al., Regulation of epithelial sodium channels by cGMP/PKGII. *The Journal of Physiology*, 2009. **587**(11): p. 2663-2676.
180. Brus, R., et al., Central action of cyclic: 3',5'-thymidine, 3',5'-uridine and 3',5'-citidine monophosphates in rat. *Acta Med Pol*, 1984. **25**(1-4): p. 1-9.
181. Eggenschwiler, J.T., E. Espinoza, and K.V. Anderson, Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature*, 2001. **412**(6843): p. 194-8.

-
182. Marcos, I., S. Borrego, and G. Antinolo, *Molecular cloning and characterization of human RAB23, a member of the group of Rab GTPases*. *Int J Mol Med*, 2003. **12**(6): p. 983-7.
183. Gunther, T., et al., *Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord*. *Development*, 1994. **120**(11): p. 3119-30.
184. Riegel, J.A., et al., *Stimulation of fluid secretion of malpighian tubules of drosophila melanogaster meig. by cyclic nucleotides of inosine, cytidine, thymidine and uridine*. *J Exp Biol*, 1998. **201** (Pt 24): p. 3411-8.
185. Dalvit, C., et al., *High-throughput NMR-based screening with competition binding experiments*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(26): p. 7702-9.
186. Mayer, M. and B. Meyer, *Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor*. *J Am Chem Soc*, 2001. **123**(25): p. 6108-17.
187. Yao, H. and D.S. Sem, *Cofactor fingerprinting with STD NMR to characterize proteins of unknown function: identification of a rare cCMP cofactor preference*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(3): p. 661-6.
188. Yang, P., C. Yang, and W.S. Sale, *Flagellar radial spoke protein 2 is a calmodulin binding protein required for motility in Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(1): p. 72-81.
189. Martinez, S.E., et al., *The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 13260-5.
190. Gottesman, M.M. and R.D. Fleischmann, *The role of cAMP in regulating tumour cell growth*. *Cancer Surv*, 1986. **5**(2): p. 291-308.
191. Young, S.W., M. Dickens, and J.M. Tavaré, *Differentiation of PC12 cells in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activated protein kinase. Comparison with the effects of insulin, growth factors and phorbol esters*. *FEBS Lett*, 1994. **338**(2): p. 212-6.
192. Schmitt, J.M. and P.J. Stork, *Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(11): p. 3671-83.
193. Wu, J., et al., *Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate*. *Science*, 1993. **262**(5136): p. 1065-9.
194. Lan, T., et al., *Type II cGMP-dependent protein kinase inhibits EGF-induced MAPK/JNK signal transduction in breast cancer cells*. *Oncol Rep*, 2013. **27**(6): p. 2039-44.
195. Tao, Y., et al., *Endogenous cGMP-dependent protein kinase reverses EGF-induced MAPK/ERK signal transduction through phosphorylation of VASP at Ser239*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(5): p. 1104-1108.
196. Spitler, R., et al., *Nitrosyl-cobinamide (NO-Cbi), a new nitric oxide donor, improves wound healing through cGMP/cGMP-dependent protein kinase*. *Cell Signal*, 2013. **25**(12): p. 2374-82.
197. Ota, K.T., et al., *The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase*. *Learn Mem*, 2008. **15**(10): p. 792-805.
198. Brown, M.T. and J.A. Cooper, *Regulation, substrates and functions of src*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1287**(2-3): p. 121-49.

-
199. Rangaswami, H., et al., Type II cGMP-dependent protein kinase mediates osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem*, 2009. **284**(22): p. 14796-808.
 200. Fallahian, F., et al., Cyclic GMP induced apoptosis via protein kinase G in oestrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. *Febs J*, 2011. **278**(18): p. 3360-9.
 201. Jacob, A., et al., Insulin inhibits PDGF-directed VSMC migration via NO/ cGMP increase of MKP-1 and its inactivation of MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(3): p. C704-13.
 202. Steinbrecher, K.A., The multiple roles of guanylate cyclase C, a heat stable enterotoxin receptor. *Curr Opin Gastroenterol*, 2014. **30**(1): p. 1-6.
 203. Ochoa, C.D., et al., *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y is a promiscuous cyclase that increases endothelial tau phosphorylation and permeability. *J Biol Chem*, 2012. **287**(30): p. 25407-18.
 204. Frazier, W.J., et al., MAPK signaling drives inflammation in LPS-stimulated cardiomyocytes: the route of crosstalk to G-protein-coupled receptors. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50071.
 205. Beckert, U., et al., ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **450**(1): p. 870-4.
 206. Mattila, J.T. and A.C. Thomas, Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 478.
 207. Cauwels, A., et al., Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 2915-24.
 208. Buys, E.S., et al., sGC(alpha)1(beta)1 attenuates cardiac dysfunction and mortality in murine inflammatory shock models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(2): p. H654-63.
 209. Vandendriessche, B., et al., The soluble guanylate cyclase activator BAY 58-2667 protects against morbidity and mortality in endotoxic shock by recoupling organ systems. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72155.
 210. Hollenberg, S.M., et al., Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ Res*, 2000. **86**(7): p. 774-8.
 211. Panayiotou, C.M., et al., Resistance to endotoxic shock in mice lacking natriuretic peptide receptor-A. *Br J Pharmacol*, 2010. **160**(8): p. 2045-54.
 212. Werner, C.G., et al., Neutrophil dysfunction in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase I-deficient mice. *J Immunol*, 2005. **175**(3): p. 1919-29.
 213. Glynos, C., et al., Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in LPS-induced lung injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(4): p. R1448-55.
 214. Frazier, W.J., et al., Increased inflammation, impaired bacterial clearance, and metabolic disruption after gram-negative sepsis in Mkp-1-deficient mice. *J Immunol*, 2009. **183**(11): p. 7411-9.
 215. Liu, Y., E.G. Shepherd, and L.D. Nelin, MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(3): p. 202-12.
 216. Witters, E., et al., Ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of cyclic nucleotides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997. **694**(1): p. 55-63.

-
217. Oeckl, P. and B. Ferger, *Simultaneous LC-MS/MS analysis of the biomarkers cAMP and cGMP in plasma, CSF and brain tissue. J Neurosci Methods*, 2012. **203**(2): p. 338-43.
218. Steiner, A.L., C.W. Parker, and D.M. Kipnis, *The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay. Adv Biochem Psychopharmacol*, 1970. **3**: p. 89-111.
219. Richman, R.A., et al., *Preparation of cyclic nucleotide antisera with thyroglobulin-cyclic nucleotide conjugates. J Cyclic Nucleotide Res*, 1980. **6**(6): p. 461-8.

F.2 Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen

F.2.1 Poster

Wolfertstetter, S., Schlossmann, J. (2012), Identification of cCMP binding and activated proteins. cCMP Symposium (Hannover, Germany).

Wolfertstetter, S., Schinner, E., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2013), Identification of cCMP binding and activated proteins. 79. Jahrestagung der DGPT (Halle/Saale, Germany).

Wolfertstetter, S., Schinner, E., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2013), Identification of cCMP binding and activated proteins. 6th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Erfurt, Germany).

Wolfertstetter, S., Schinner, E., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2014), Analysis of cCMP signaling proteins. 80. Jahrestagung der DGPT (Hannover, Germany).

Wolfertstetter, S., Schwede F., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2015), Interaction of cCMP with cGK, cAK and MAPK kinases in murine tissues. 7th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Trier, Germany).

F.2.2 Originalarbeiten

Wolfertstetter, S., Huettner, J.P., Schlossmann, J., cGMP-Dependent Protein Kinase Inhibitors in Health and Disease. *Pharmaceuticals Basel*, 2013. **6**(2): p. 269-86.

Wolfertstetter, S., et al., Interaction of cCMP with the cGK, cAK and MAPK Kinases in Murine Tissues. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0126057.

Schlossmann, J. and Wolfertstetter, S., Identification of cCMP and cUMP substrate proteins and cross-talk between cNMPs. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2015 (in preparation)

G. Anhang

G.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
8-Br	8-Bromo
A	Adenosin oder Ampere
AA	Acrylamid
AC	Adenylylzyklase
AK	Antikörper
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BA	N,N'-Methylenbisacrylamid
bidest	Zweimal destilliert
BNP	Brain derived natriuretic peptide, B-Typ natriuretisches Peptid
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytidin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CC	Cytidylzyklase
cCMP	Zyklisches Cytidin-3',5'-monophosphat
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
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
Ci	Curie
cNK	cNMP-abhängige Proteinkinase
CNG	Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle
cNMP	Zyklisches Nukleosid-3',5'-monophosphat
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cpm	counts per minute/ Zähler pro Minute
CREB	cAMP response element-binding protein/Transkriptionsfaktor
Ctrl., ctrl.	Kontrolle

cUMP	Zyklisches Uridin-3',5'-monophosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DB	Dibutyryliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC50	Mittlere effektive Konzentration
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDRF	Endotheler Relaxationsfaktor/endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Edema Faktor
EGF/EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor/Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzymimmunoassay/Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Elk	ETS Domäne-enthaltendes Protein
EMA	European Medicines Agency
Epac/GEF	Guanosintriphosphat-Austauschfaktor
ERK	extracellular-signal regulated kinase
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
g	Gramm oder Gravitationskonstante
G	Guanosin
GC	Guanylylzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
GF	Wachstumsfaktor/growth factor
GPcR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb	Wachstumsfaktassoziiertes Adapterprotein
GTN	Glyzeroltrinitrat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCN	cNMP-gesteuerte Kationenkanäle
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Hinge-Region
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
HWZ	Halbwertszeit
I.E.	International Einheit
i. p.	Intraperitoneal

IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IRAG	IP ₃ Rezeptor assoziiertes cG-Kinasesubstrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
k	Kilo (10 ³)
K _a	Aktivierungskonstante
K _i	Inaktivierungskonstante
kb	Kilo-Basenpaare
KG	Körpergewicht
KO	Knock-out
L	Liter
LBP	LPS-bindendes Protein
LC	Flüssigchromatographie
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotrien
LZ	Leuzin-Zipper
m	Milli (10 ⁻³) oder Meter
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
Mio	Millionen
MLCK	Myosin leichte Kette Kinase
MM	Master Mix
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
MNK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase interagierende Kinase
MRP	Multidrug resistance-related protein
MS	Massenspektrometrie
MSK	Stress-aktivierte Kinase
MW	Molekulare Masse
MWCO	Molmassenabhängige Abtrennungsgrenze
MYPT1	Myosin-bindende Untereinheit der Myosin leichte Kette Phosphatase
myr	Myristoyliert
n	Nano (10 ⁻⁹)
NAPDH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF	Nukleärer Faktor
NO/NOS	Stickstoffmonoxid/ NO-Synthase

OD	Optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-on
p	Pico (10^{-12})
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor/platelet-derived growth factor
PG	Prostaglandin
PH	Pulmonale Hypertonie
PI	Proteaseinhibitoren
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R/reg	Regulatorisch
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s, sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9-Zellen
SPF	Spezifisch pathogenfrei
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/TBST	Tris gepufferte Salzlösung ohne/mit Tween
TEMED	Tetraethylenmethyldiamin
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor/toll like receptor
TN	Tris-Natriumchlorid-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
UE	Untereinheit
ü. N.	Über Nacht
us	Unstimuliert
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes-Phosphoprotein
WT	Wildtyp
ZFA	Zentrale Forschungseinrichtung
z. T.	Zum Teil
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium

G.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Strukturformel cGMP</i>	6
<i>Abbildung 2: Modell des NO/cGMP/cGK-Signalwegs</i>	9
<i>Abbildung 3: Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinasen</i>	10
<i>Abbildung 4: Strukturformel cAMP</i>	13
<i>Abbildung 5: Strukturformel cCMP</i>	13
<i>Abbildung 6: Modell des MAPK-Signalwegs</i>	18
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung des Toll-like Rezeptor (TLR4)-Signalwegs</i>	20
<i>Abbildung 8: Proteintransfer mittels Semidry-Verfahren</i>	40
<i>Abbildung 9: Schnelldachweis auf Anwesenheit von cGKIα/β in der Sf9-Zellsuspension mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung</i>	59
<i>Abbildung 10: Analyse der aufgereinigten Kinasen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung</i>	60
<i>Abbildung 11: In vitro-Aktivierung von aufgereinigten Kinasen durch cGMP unter Verwendung des Substratpeptides VASptide</i>	61
<i>Abbildung 12: In vitro-Aktivierung von aufgereinigten Kinasen durch cCMP unter Verwendung des neuartigen Substratpeptides IRAGtide</i>	63
<i>Abbildung 13: Aktivitätsbestimmung endogener Kinasen</i>	64
<i>Abbildung 14: Aktivitätsbestimmung endogener Kinasen</i>	65
<i>Abbildung 15: Aktivierung von cGMP-abhängigen Kinasen durch cCMP in Gewebe von WT- und cGKI-KO-Mäusen</i>	66
<i>Abbildung 16: Aktivierung von cGMP-abhängigen Kinasen durch cGMP bzw. cAMP in Gewebe von WT- und cGKI-KO-Mäusen</i>	68
<i>Abbildung 17: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in WT-Lungen-Gewebelysate via cCMP-Agarosefällung, SDS-PAGE und Silberfärbung</i>	70
<i>Abbildung 18: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in WT Gewebe unter Verwendung von verschiedenen cCMP-Agarosen</i>	71
<i>Abbildung 19: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in verschiedenen WT-Gewebelysaten</i>	72
<i>Abbildung 20: Identifizierung von cCMP-bindenden Proteinen in verschiedenen WT-Gewebelysaten</i>	73
<i>Abbildung 21: Agarose-Fällung unter cAMP-Kompetition</i>	74
<i>Abbildung 22: Identifizierung von MAPK als cCMP-bindendes Protein in verschiedenen WT-Gewebelysaten</i>	75
<i>Abbildung 23: Identifizierung von MAPK als cCMP-bindendes Protein in verschiedenen KO-Gewebelysaten</i>	76
<i>Abbildung 24: Detektion der Protein-Protein-Interaktion zwischen cGK und MAPK mittels Co-Immunpräzipitation</i>	78
<i>Abbildung 25: Identifikation von cGMP-bindenden Proteinen in verschiedenen WT-Gewebelysaten</i> ..	79
<i>Abbildung 26: Stimulation von Jejunum-Gewebelysaten (WT) durch DB-cCMP</i>	80
<i>Abbildung 27: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP</i>	82

<i>Abbildung 28: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP</i>	83
<i>Abbildung 29: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP unter cAK-Blockade</i>	84
<i>Abbildung 30: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP unter cAK- und PKC-Blockade</i>	85
<i>Abbildung 31: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP</i>	86
<i>Abbildung 32: Aktivierung der MAPK durch DB-cCMP in WT- und KO-Gewebe</i>	88
<i>Abbildung 33: Aktivierung der MAPK durch cGMP- bzw. cAMP-Analoga in WT Gewebe</i>	90
<i>Abbildung 34: Schematische Darstellung der NO-Signalkaskade während einer LPS-induzierten Sepsis.</i>	91
<i>Abbildung 35: Simultane Quantifizierung zyklischer Nukleotide in WT- und cGKI-KO-Urin mittels LC-MS/MS</i>	93
<i>Abbildung 36: Stimulation der MAPK-Phosphorylierung durch LPS in WT- Gewebe</i>	94
<i>Abbildung 37: Potentieller Signalmechanismus von cCMP</i>	102

G.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Geräte</i>	24
<i>Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien</i>	25
<i>Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Arzneistoffe und Kits</i>	28
<i>Tabelle 4: Verwendete Antikörper</i>	28
<i>Tabelle 5: Verwendete Software</i>	29
<i>Tabelle 6: Verwendete Datenbanken</i>	29
<i>Tabelle 7: Verwendete Proteaseinhibitoren (Aufschluss)</i>	34
<i>Tabelle 8: Verwendete cNMP-/ Kontroll-Agarosen</i>	44
<i>Tabelle 9: Verwendete Proteaseinhibitoren (Sf9-Zellaufschluss)</i>	54
<i>Tabelle 10: Verwendete Primer für die Genotypisierung</i>	132
<i>Tabelle 11: Massenspektrometrische Auswertung spezifisch gefällter Proteine (Abbildung 17) mittels LC-MS/MS Analyse.</i>	133

G.4 Formelverzeichnis

<i>Formel 1: Zunahme der Phosphorylierung</i>	47
<i>Formel 2: Gehalt an Kinase</i>	51
<i>Formel 3: Faktor für maximale cNMP-Stimulation</i>	51
<i>Formel 4: Max. Umsatzrate</i>	51
<i>Formel 5: Zellzahl pro ml</i>	53

G.5 Weitere Anhänge

G.5.1 PCR-Protokoll

Um DNA aus Gewebeproben zu extrahieren, wurden die Gewebeproben zunächst lysiert. Die Lyse wurde entweder mit Proteinase K oder Natronlauge durchgeführt, wodurch Peptidbindungen der Proteine gespalten werden und DNA freigesetzt wird.

Mastermix (Proteinase K)	1 x [μ l]	
H ₂ O	40	→ Je Probe 50 μ l des MM → Inkubation ü. N. bei 55°C → Am nächsten Tag bei 3000rpm Abzentrifugieren
Puffer	5	
MgCl ₂	3	
Proteinase K	2	

Mastermix (NaOH)	[mM]	
NaOH	25	→ Je Probe 75 μ l des MM → Lyse für 1h bei 98°C → Neutralisierung mit 75 μ l 40mM Tris (pH 5.5) → Am nächsten Tag bei 4000rpm
EDTA	0.2	

Im Anschluss erfolgte die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion mit folgendem Standard-PCR-Ansatz und PCR-Programm:

PCR-Ansatz	Konzentration	1 x [μ l]
H ₂ O		31.95
Puffer 10 x		5
MgCl ₂	25 mM	5
dNTPs	10 mM	1
Primer 1		0.6
Primer 2		0.6
Primer 3		0.6
Taq-Polymerase	5u/ μ l	0.25
DNA		5

PCR-Programm	Temp. [°C]	Zeit	
Initiale Denaturierung	94	5 min	} 35x
Denaturierung	94	15 sec	
Primerhybridisierung (Annealing)	55	30 sec	
Polymerisation (Elongation)	72	30 sec	
Finale Polymerisation	72	5 min	

G.5.2 Protokoll zur Herstellung von Agarose-Gelen

4g Agarose wurde auf 200ml 1 x TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C, wurde EtBr (10mg/ml in H₂O, 2µl pro 100ml) zugegeben und die Flüssigkeit in eine Gelkammer (Casting System Compact Biometra) gegossen. Zur Taschenbildung wurde ein Kamm aufgesetzt und das Gel bis zur Aushärtung abgedunkelt und bei RT gelagert. Die PCR-Ansätze, Positiv- (Proben eines bekannten Genotyps) und Negativkontrolle (Wasser, Reinheitsnachweis) wurden mit 5 x Loading Dye versetzt und jeweils 20µl zusammen mit einem Größenstandard (10µl 1kb und 100bp Ladder) in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 120V für 60min in TAE-Puffer. Das fertige Gel wurde unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

TAE-Puffer 50 x	pH 8.0
Tris	242 g
Eisessig	57.1 ml
EDTA-Lösung (0.5 M, pH 8.0)	100 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

G.5.3 Verwendete Primer für die Genotypisierung

Alle in der nachfolgenden Tabelle genannten Primer wurden von der Firma Entelechon, Regensburg synthetisiert.

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Konz. [pmol/µl]	Bemerkung
AV9R	ATT AAG GGC CAG CTC ATT CC	25	cGKII-Primer
118E2FB-AV	GGT GAA GTT TTA GGT GAA ACC AAG	50	cGKII-Primer
AV3R	CTG CTT AAT GAC GTA GCT GCC	50	cGKII-Primer
RF49	GTC TTT GCT GTT CAG GTT	25	cGKI-Primer
RF118	AAA TTA TAA CTT GTC AAA TTC TTG	25	cGKI-Primer
RF122	TCT TTT TCA TGT GCT CTT GG	25	cGKI-Primer

Tabelle 10: Verwendete Primer für die Genotypisierung

G.5.4 Massenspektrometrische Auswertung des Silbergels

Band	Sequence Coverage [%]	Accession	Name	Species	Peptides(95%)	Peptide Confidence [%]	Peptide Sequence
1	8,2	P0C605	cGMP-dependent protein kinase 1	MOUSE	1	99 77,4 64,2	EDSPSEDPVFLR GDTFFISK GIDM(ox)IEFPK
2	3,6	P02769	Serum albumin	BOVIN	2	99	LVNELTEFAK
3	27,2	P02769	Serum albumin	BOVIN	9	99 99 99 99 99 99 98,6 98,5 97,8 91 80,4	TVM(ox)ENFVAFVDK DDPHACYSTVFDK KVPQVSTPTLVEVSR LGEYGFQNALIVR LVNELTEFAK TVM(ox)ENFVAFVDK YICDNQDTISSK CCTESLVNR EACFAVEGPK CCAADDKEACFAVEGPK AEFVEVTK
	12,9	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	MOUSE	6	99 99 99 97,7 95	DAGTIAGLNVLIR IINEPTAAAIAYGLDK VEIANDQGNR STAGDTHLGGEDFDNR TTPSYVAFTDTER
	3,5	Q61503	5'-nucleotidase	MOUSE	2	98,2 99	NQVAM(ox)NPTNTVFDAK VVYPAVEGR
4	8,9	P02769	Serum albumin	BOVIN	2	99 99 99	YPFIVTADDGR LVNELTEFAK YICDNQDTISSK
						85,7 89 99	EYEATLEECCA TVM(ox)ENFVAFVDK AATIIATSEGLWGLDR
5	26,2	P12367	cAK type II-alpha regulatory subunit	MOUSE	3	96,6 95 84,5	GTYDILVTK CLVMDVQAFER IVDVIGEK
						80,1 99	GSFGELALM(ox)YNTPR SENEEFVEVGR
6	27,3	Q9DBC7	cAK type I-alpha regulatory subunit	MOUSE	1	94,1 93,8 76,2	LTVADALEPVQFEDGQK GAISAEVYTEEDAASYVR VSILESLDK
						50	VLGPCSDILK
7	40	P63260	Actin, cytoplasmic 2	MOUSE	8	99 99 99 99 99 99 71,8 64,1	AGFAGDDAPR EITALAPSTMK GYSFTTTAER (p)QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLYANTVLSGGTTM(ox)YPGIADR AVFPSIVGR
	27,2	Q9D8E6	60S ribosomal protein L4	MOUSE	6	99 99 99 99 98,9 96,2 73,3	LCYVALDFEQEMATAASSSLEK GPCIIYNEDN(deam)GIK IEEVPELPLVVEDK NIPGITLLNVSK (p)QPYAVSELAGHQTSAESWGTR MMNTDLSR SGQGAFGNMCR NVTLPVAFK

Tabelle 11: Massenspektrometrische Auswertung spezifisch gefällter Proteine (Abbildung 17) mittels LC-MS/MS Analyse.

G.6 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung der Mittel und die aufmerksame Betreuung, ohne die diese Arbeit mit Sicherheit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Dr. Jörg Reinders vom Institut für funktionelle Genomik an der Universität Regensburg für die Sequenzierung von Proteinproben.

Herrn Prof. Dr. Peter Ruth vom Institut für Pharmazie an der Universität Tübingen für die Versorgung mit aufgereinigtem cGKII Enzym und cGKII Antikörper.

Der Firma Biolog für die zur Verfügung gestellten cCMP Agarose Proben.

Der ZFA Metabolomics an der MHH Hannover, insbesondere Herrn Prof. Dr. Volkhard Kaefer, für die schnelle und zuverlässige Vermessung der cNMP-Spiegel.

Herrn Prof. Dr. Frieder Kees für die wertvollen Tipps und Tricks zur Bewältigung des Doktorandenalltags und für die witzigen und abwechslungsreichen Mittagspausen.

Unseren beiden Sekretärinnen, Rita und Martina, die einem stets hilfsbereit zur Seite standen, wenn z. B. das Fax mal wieder streikte.

Außerdem möchte ich mich bei den TA's Astrid, Gertraud und Katharina, meiner Praktikantin Franziska und sämtlichen aktuellen und ehemaligen Kollegen, insbesondere Lisa, Franziska, Katharina, Jessica, Julia, Petra, Vroni, Higgel, Johannes und Matthias (für die Einarbeitung zu Beginn) für die Unterstützung bedanken.

Ein weiterer Dank geht an die Mädels (und Stefan) aus der Dom Apotheke in Regensburg, besonders Sonja, die mir die Möglichkeit gaben, nach dem PJ weiterhin in der Apotheke zu arbeiten.

Merci an alle Korrekturleser, ihr habt was gut bei mir!

Ein herzlicher Dank geht natürlich auch an alle meine Freunde, die mir immer zur Seite standen und mich aufgemuntert haben, wenn es mal nicht so lief, wie gewünscht.

Zuallererst natürlich Andrea, die es über 4 Jahre mit mir in einem Büro ausgehalten hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Dann natürlich auch meine Stammtischmädels, die seit der Schulzeit immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meinen Freund Tobi, der es immer wieder schafft, mich aufzubauen und mir Mut zu geben.

Schlussendlich geht mein größter Dank an meine Familie: meinen beiden Schwestern Karina und Christine und meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht und immer an mich geglaubt haben. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid und mich unterstützt.

G.7 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)