

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Die Funktion des cGMP-Kinase Substrates IRAG und der Isoformen
der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I im vaskulären System**



**von
Dominik Bernhard
aus
Oberstdorf**

2007

Meinen Eltern

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann und Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am

.....
Dominik Bernhard

Dissertation eingereicht am: 09.11.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Hofmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am: 04.12.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IIIIV
Abbildungsverzeichnis	VI
A. Einleitung	1
A.1. Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg	1
A.1.1. Die Proteinkinasen G	4
A.1.2. Substrate und Effekte der Proteinkinasen G	5
A.1.3. Das IP ₃ -Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG	8
A.2. Ziele dieser Arbeit	10
B. Material und Methoden	11
B.1. Mäuse	11
B.2. Analyse und Detektion von Proteinen	11
B.2.2. Westernblot	13
B.2.2.1. Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren	13
B.2.2.2. Immundetektion:.....	14
B.3. Untersuchung der Arteria tibialis von Wildtyp- und IRAG Δ 12 Mutanten	15
B.4. Hinterbein Perfusion.....	18
B.5. Invasive Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie Transmittern	20
B.6. Herzfrequenzmessung mittels EKG von perfundierten, isolierten murinen Herzen	23
B.7. Statistik.....	24
C. Ergebnisse.....	25
C.1. Charakterisierung von IRAG Δ 12 Tieren	25
C.1.1. Westernblotanalyse von IRAG mittels Immunodetektion	25
C.1.2. Einfluss der Deletion der IRAG Interaktionsstelle auf die NO vermittelte Relaxierung der A. tibialis.....	26
C.1.3. Perfusion der Hinterbeine von Wildtyp und IRAG Δ 12 Mäusen	28

C.1.4. Effekt von $[cGMP]_i$ erhöhenden Pharmaka auf den Blutdruck von IRAG $\Delta 12$ und Wildtyp-Mäusen	30
C.1.5. Basaler Blutdruck	34
C.1.6. Herzfrequenz-, Aktivitäts- und Pulsdruckmessung mit IRAG Deletionsmutanten und Kontrolltieren	36
C.1.7. Frequenzmessung mit isolierten Herzen von $\Delta 12$ und IRAG knockout Tieren mittels EKG-Transmittern	39
C.2. Telemetrie Experimente mit $cGKI\alpha$ und $cGKI\beta$ „Rescue“ Mäusen	40
D. Diskussion	55
D.1. Die Rolle von IRAG im vaskulären glatten Muskel	55
D.2. Bedeutung der $cGKI\alpha$ und $cGKI\beta$ im vaskulären System	58
E. Zusammenfassung	62
Verwendete Antikörper	64
F. Literaturverzeichnis	65
F.1. Zitierte Veröffentlichungen	65
F.2. Eigene Publikationen	74

Abkürzungen

[...]	Konzentration an ...
$\Delta 12$	Delta 12, Abkürzung für: $\Delta 12/\Delta 12$:= Deletion von Exon 12 des IRAG Gens in beiden Allelen
α -SMA	α -Actin in glatten Muskelzellen
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Ach	Azetylcholin
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ACS	Arteria carotis communis sinistra
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BA	N,N'-Methylenbisacrylamid
$BK_{Ca^{2+}}$	Kalziumsensitiver Kaliumkanal
BSA	Rinderserumalbumin
Ca^{2+}	Kalziumionen
$[Ca^{2+}]_i$	zytosolische Kalziumkonzentration
$Ca_v1.2$	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals
cAK	(cAMP-abhängige) Proteinkinase, Synonym: Proteinkinase A
CCh	Carbachol
Ctr	Kontrolltiere
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase, Synonym im deutschen Sprachraum: PKG
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
cGKI α	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I Isoform Alpha
cGKI β	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I Isoform Beta
cGKII	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
Cre	Cre Rekombinase (cyclization recombination)
DEA/NO	2-(N,N-diethylamino)-diazennolat-2-oxid

DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diolat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Natriumethyldiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
IP₃	Inositol-1,4,5,-triphosphat
IP₃RI	Inositol-1,4,5,-triphosphat Rezeptor Typ I
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein
kDa	Kilodalton
KH	Krebs-Henseleit Puffer
KO	knockout
l	Liter
M	Mol
m	Mili (10 ⁻³), Masse z.B. Masse pro Volumen (m/V)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
MAPK	„p42/p44 mitogen activated protein kinase“
MG	relative molare Masse
min	Minute
MLCK	„myosin light chain kinase“
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MYPT1	“myosin targeting subunit”
n	nano (10 ⁻⁹)
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO-GC	NO abhängige Guanylatzyklase
n.s.	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDEs	Phosphodiesterasen
PE	Phenylephrin
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
PLCβ	Phospholipase C β
PKG	Proteinkinase G, im deutschen Sprachraum Synonym für cGK
RNS	Ribonukleinsäure
R	Rezeptor
RGS	“regulator of G-protein signalling”
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Natriumnitroprussid
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SR	sarcoplasmatisches Reticulum
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit
üN	über Nacht
V	Volumen
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1: Synthese von cGMP und dessen zelluläre Zielstrukturen.....	4
Abb. A-2: Schema der cGKI-abhängigen Relaxierung von glatten Muskelzellen.....	7
Abb. A-3: Das IP ₃ -Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG.....	8
Abb. B-1: Apparativer Aufbau zur Untersuchung von isolierten Gefäßen unter annähernd physiologischen Bedingungen.....	16
Abb. B-2: Bildsequenz aufgenommen während einer Messung mit einer isolierten <i>Arteria tibialis</i>	18
Abb. B-3: Das Hinterbeinperfusions-Modell.....	19
Abb. B-4: Lage der Maus in der feuchten Kammer.....	20
Abb. B-5: Durchführung der Transmitter Implantation.....	23
Abb. C-1: Westernblots von homogenisierten murinen Wildtyp bzw. IRAG Δ 12 Geweben.....	25
Abb. C-2: Relaxierung der isolierten <i>Arteria tibialis</i> bei WT- und Δ 12-Mäusen.....	26/27
Abb. C-3: Vasodilatation durch DEA/NO in den perfundierten Hinterbeinen von WT- und Δ 12-Mäusen.....	28/29
Abb. C-4: Blutdruckabfall durch SNP bei wachen, sich frei bewegenden WT- und Δ 12-Mäusen.....	30/31
Abb. C-5: Blutdruckabfall in wachen, sich frei bewegenden Tieren durch DETA/NO.....	32
Abb. C-6: Effekt von Sildenafil auf den Blutdruck wacher, sich frei bewegender WT- und Δ 12-Mäusen.....	33
Abb. C-7: Mittlerer arterieller Blutdruck wacher, sich frei bewegenden WT- und Δ 12-Mäusen.....	34/35
Abb. C-8: Herzfrequenz und Pulsdruck von wachen, sich frei bewegenden WT- und Δ 12-Tieren.....	36
Abb. C-9: Lokomotorische Aktivitätsmessung von wachen sich frei bewegenden WT- und Δ 12 –Mäusen.....	37

Abb. C-10: Reflextachykardie durch NO-Donatoren in wachen, sich frei bewegenden WT- und $\Delta 12$ –Mäusen.....	38
Abb. C-11: Herzfrequenz isolierter Herzen von WT- und $\Delta 12$ –Mäusen.....	40
Abb. C-12: Basaler Blutdruck von wachen sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues	41
Abb. C-13: Pulsdruckmessung mit wachen sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues	42/43
Abb. C-14: Herzfrequenzmessung mit wachen sich frei bewegende $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues.....	44/45
Abb. C-15: Aktivitätsmessung von wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues	46/47
Abb. C-16: Aktivitätsmessung von wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues	47/48
Abb. C-17: Blutdruckabfall durch SNP in wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues	49
Abb. C-18: Blutdruckabfall durch DETA/NO in wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues.....	50/51
Abb. C-19: Effekt von Carbachol auf den MAP von wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues	52/53
Abb. C-20: Effekt von Y-27632 in wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues.....	54

A. Einleitung

„Es klingt wie eine Ironie des Schicksals, dass man mir Nitroglyzerin innerlich verschrieben hat“, schrieb Alfred Nobel an einen Freund. Er litt an Angina pectoris und schon vor über 100 Jahren wurde dieser NO-Donator als Pharmakon zur Reduzierung von Angina pectoris Schmerzen eingesetzt. Die dem Arzneistoff zugrundeliegende Pharmakologie und das wirksame Agens war damals noch nicht bekannt. Vielleicht die größere Ironie ist es, dass das aus dem Verkauf von Dynamit erwirtschaftete Privatvermögen Nobels von ihm zur Stiftung des gleichnamigen Preises verwendet wurde. Ein Preis, den 1998 die drei Amerikaner, Furchgott, Ignarro und Murad erhielten, für die Entdeckung und Identifizierung eines endogenen Botenstoffes im kardiovaskulären System, der zunächst als EDRF („endothelium-derived relaxing factor“) bezeichnet wurde. Genau dieser Faktor ist es, der aus der Metabolisierung des exogen zugeführten Sprengstoffes Nitroglyzerin freigesetzt wird und den Stifter vor seinen pektanginösen Schmerzen bewahrte. Seit dieser Entdeckung (Ignarro et al., 1987) war das Radikal Stickstoffmonoxid Ziel intensiver Forschung.

A.1. Der NO/cGMP/cGKI-Signalweg

Endogen wird NO von den NO-Synthasen (NOS) gebildet, durch die katalysierte Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin in der Gegenwart von Sauerstoff und NADPH als Substraten und den Cosubstraten FAD, FMN, Calmodulin und Tetrahydrobiopterin. Als Produkte dreier verschiedene Gene sind bisher drei NOS-Isoformen bekannt: die neuronale (nNOS oder NOS1), die induzierbare (iNOS oder NOS2) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS3). Von einer zusätzlichen, mitochondrialen NO-Synthase (mtNOS) wurde berichtet, die als Alpha-Isoform der nNOS angesehen wird. (Giulivi, 2003)

Diese Vertreter der Enzymfamilie kommen in den unterschiedlichsten Geweben vor, bestehen jeweils aus zwei identischen Untereinheiten, wobei NOS 1 und 3 Kalzium-

Calmodulin abhängig sind, konstitutiv exprimiert werden und eine autoinhibitorische Schleife besitzen.

Die induzierbare NOS findet sich vor allem in Makrophagen und Neutrophilen, ist weder kalziumabhängig, noch verfügt sie über Autoinhibition. Ihre Bezeichnung gilt jedoch mittlerweile als überholt, da eine konstitutiv exprimierte iNOS in Herzmuskelzellen gefunden wurde. (Buchwalow et al., 2001)

Die ubiquitäre Verteilung dieser Enzyme deutet schon an, dass ihr Produkt, Stickstoffmonoxid, eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielt: bei der Motilität des Gastrointestinaltrakts, der Immunabwehr, da das Radikal in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt, beim Lernen und der Gedächtnisbildung, bei der Regulation des Blutdrucks und der Thrombozytenaggregation. (Hofmann et al., 2006; Pacher et al., 2007)

Therapeutisch werden indirekt oder direkt freisetzende NO-Donatoren in erster Linie zur kurz- oder längerfristigen Anfallsprophylaxe bei Angina pectoris eingesetzt.

Ausgelöst durch die Scherkräfte des Blutstroms wird im Endothel des vaskulären Systems kontinuierlich NO gebildet, welches schnell durch biologische Membranen diffundiert und zum Beispiel in den sich unter dem Endothel befindenden glatten Muskelzellen an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase bindet. Dadurch wird die sGC aktiviert und die Synthese des sekundären Botenstoffes cGMP (zyklisches Guanosin-3'5'-mono-phosphat) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) induziert.

Diese Zyklenen setzen sich jeweils aus einer von zwei Alpha-Untereinheiten (α_1, α_2) und einer von zwei Beta-Untereinheiten (β_1, β_2) zusammen. Die Bezeichnung „löslich“ für im „Zytosol gelöst“ hat sich als irreführend herausgestellt, da im Gehirn der Maus eine membrangebundene Form (α_2, β_1) gefunden wurde. Deshalb wurde die Bezeichnung „NO-sensitive Guanylatzyklen“ (NO-GC) vorgeschlagen. (Koesling et al., 2004) An der pharmakologischen Modulation dieser Enzyme wird intensiv geforscht. Auf dem Weg zur Arzneimittelzulassung befinden sich bereits die NO-unabhängigen sGC Aktivatoren und die NO-abhängigen sGC Stimulatoren. Sie verursachen bei Abwesenheit bzw. die zuletzt genannten bei Anwesenheit von Stickstoffmonoxid eine Erhöhung der zellulären cGMP-Spiegel. Für diese neuen Klassen von Pharmaka werden viele Indikationen diskutiert, wie z.B. die Therapie der arteriellen und pulmonalen Hypertonie, der Herzinsuffizienz, der Arteriosklerose, der erektilen Dysfunktion, der renalen Fibrose, der Niereninsuffizienz, der Leberzirrhose oder die Prophylaxe von Thrombosen. (Evgenov et al., 2006; Stasch et al., 2006)

Neben den sGCs existieren die als membranständig bekannten, partikulären Guanylatzyklasen (pGC), die durch die natriuretischen Peptide aktiviert werden, keinen NO bindenden Protoporphyrin IX-Ring besitzen und ebenfalls nach Aktivierung cGMP synthetisieren. Bisher sind sieben Isoformen dieser Enzymfamilie bekannt. Alle vereinen die katalytische und die peptidbindende Einheit in einem Molekül und besitzen eine transmembranäre Domäne. (Cerra and Pellegrino, 2007; Kuhn, 2003)

Neben den cGMP synthetisierenden Enzymen existieren Phosphohydrolasen, die Phosphodiesterasen (PDEs), die die sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP durch Ringöffnung des zyklischen Phosphat-Esters am 3'-Ende hydrolysieren.

Bisher sind elf Familien der PDEs bekannt, mit zahlreichen Isoformen und Splicevarianten. Diese unterscheiden sich in ihrer räumlichen Struktur, den kinetischen Eigenschaften, ihrer zellulären Lokalisation und Expression, in ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Inhibitoren, sowie ihrer Substratspezifität und Modulation ihrer Aktivität. (Bender and Beavo, 2006; Rybalkin et al., 2003) Die Phosphodiesterasen als pharmakologische Zielstruktur werden seitens der Pharmaindustrie intensiv beforscht.

1998 wurde unter dem Namen Viagra® auf dem deutschen Markt ein selektiver Inhibitor der PDE 5 eingeführt. Bei dieser PDE handelt es sich um ein cGMP stimuliertes, ausschließlich cGMP abbauendes Enzym. Ein neues Arzneimittel mit demselben Wirkstoff wurde Anfang 2006 als Ravatio® zur Therapie der pulmonalen Hypertonie eingeführt. Mit Cialis® (Tadalafil) und Levitra® (Vardenafil) sind zwei weitere PDE 5-Inhibitoren neben Viagra® (Sildenafil) auf dem deutschen Markt zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen.

Auch finden die Inhibitoren der PDE 3, Amrinon, Enoximon und Milrinon, die sogenannten Inodilatoren, bei Herzinsuffizienz (NYHA IV) Anwendung.

Das zyklische GMP kann auch cAMP abbauende PDEs hemmen, zum Beispiel die PDEs 3. Dadurch ist ein „crosstalk“ zwischen dem cGMP und cAMP System möglich und damit eine Vernetzung zweier Signalwege. Hohe Konzentrationen an zyklischem Guanosinmonophosphat sind ausserdem in der Lage, die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase, der Proteinkinase A, zu modulieren. (Bender and Beavo, 2006)

Eine weitere Zielstruktur von cGMP stellen „cyclic nucleotide-gated“, CNG-Kanäle dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kationen-

kanäle in olfaktorischen und visuellen Neuronen durch Bindung des sekundären Botenstoffs moduliert werden kann. (Biel et al., 1998)

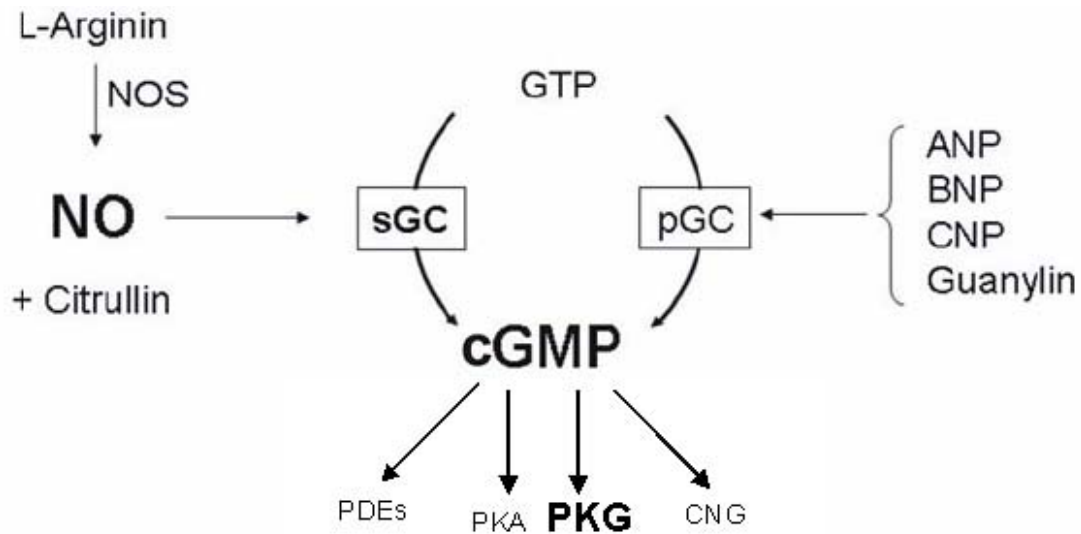


Abb. A-1: Synthese von cGMP und dessen zelluläre Zielstrukturen.

NO wird von den NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin synthetisiert und aktiviert die „lösliche Guanylatzyklase“ (sGC), was zur Bildung von cGMP aus GTP führt. Das cGMP kann auch nach Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase (pGC) durch die Natriuretischen Peptide (ANP, BNP, CNP) oder Guanylin synthetisiert werden. Die Effektoren von cGMP sind Phosphodiesterasen (PDEs), die Proteinkinase A (PKA) oder die cGMP-abhängigen Kinasen (Proteinkinase G, PKG) oder Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG).

A.1.1. Die Proteinkinasen G

Schließlich stellen die Proteinkinasen G, auch als cGMP-aktivierte Proteinkinasen (cG-Kinasen) bezeichnet, die wichtigste Zielstruktur dieses zyklischen Nukleotids dar. (Pfeifer et al., 1999)

Sie phosphorylieren spezifisch Serin- und Threoninreste der Substratproteine und werden zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen gezählt. In Säugern führt die Expression zweier Gene *prkg1* und *prkg2* zu drei verschiedenen cG-Kinasen.

Während die Isoformen cGKI α und cGKI β Produkt des gleichen Gens (*prkg1*) sind, wird die cGKII von *prkg2* kodiert. Die Isoformen I α und I β unterscheiden sich durch ihre N-terminale Aminosäuresequenz und durch die unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Geweben. Die I α -Isoform wird vor allem in Herz, Lunge und Cerebellum, die I β -Isoform in hippocampalen Neuronen, dem Bulbus

olfactorius und in Thrombozyten exprimiert. Beide Isoformen werden in glatten Muskelzellen gebildet, wie sie zum Beispiel im gesamten arteriellen System als Bestandteil der Gefäßwand vorkommen. (Hofmann et al., 2006) Die Proteinkinasen G sind Homo-dimere, und aus 3 funktionellen Domänen aufgebaut:

- der am aminoterminalen Ende gelegenen autoinhibitorischen Sequenz, die gleichzeitig für die Bindung am Zielprotein und für die stabile Dimerisierung der Monomere der Proteinkinase verantwortlich ist.
- der regulatorischen Domäne, die zwei Tandembindungstaschen für cGMP besitzt.
- dem katalytischen Abschnitt, mit einer Bindungsstelle für ATP von dem der endständige Phosphatrest auf das Substrat übertragen wird.

Die Proteinkinasen G Typ I und II unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebsverteilung und subzellulären Lokalisation. Typ II ist durch Myristoylierung an die Membran gebunden.

Die cGKI kommt im vaskulären Endothel, in Monocyten, Makrophagen, in Neutrophilen, in der Niere, im Herz, in den Hinterhornganglien, in der Retina und daneben im Gehirn zum Beispiel Hippocampus (Feil et al., 2005a; Kleppisch et al., 1999) der Amygdala, der Hypophyse und im cerebralen Cortex vor. (Feil et al., 2005b; Keilbach et al., 1992)

A.1.2. Substrate und Effekte der Proteinkinasen G

Neben ihrer wichtigen Funktion in glatten Muskelzellen (s.u.) regulieren die cG-Kinasen eine Vielzahl weiterer physiologischer Mechanismen. (Hofmann et al., 2000; Hofmann et al., 2006)

Die cGKII spielt eine Rolle in der enchondralen Ossifikation (Pfeifer et al., 1996) und bei der Unterdrückung der Reninfreisetzung durch NO in der Niere. (Wagner et al., 1998) Daneben ist sie an der Regulation der intestinalen Chloridionen- und Wasser-Sekretion beteiligt. Die durch das hitzestabile Enterotoxin von *Escherichia coli* (STa) ausgelöste Diarrhoe wird über die cGKII vermittelt. STa bewirkt eine pathologische Erhöhung der cGMP-Konzentration durch die pGC-C. Dies aktiviert die PKG II und der CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“)-Chlorid-Kanal wird durch das aktive Enzym phosphoryliert (Vaandrager et al., 1997) und geöffnet,

was eine erhöhte Wassermenge im Intestinum und Diarrhoe zur Folge hat. (Pfeifer et al., 1996)

Die cGKI ist an zahlreichen Signalmechanismen im glatten Muskel beteiligt, die zur Relaxierung von glatten Muskelzellen führen. (Koeppen et al., 2004; Murthy, 2006; Ny et al., 2000; Pfeifer et al., 1998; Sausbier et al., 2000)

Durch Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit MYPT1 „myosin targeting subunit 1“ der glattmuskulären Myosinphosphatase (SMPP-1M, „smooth muscle phosphatase“) (Surks et al., 1999) durch die cGKI α wird eine relaxierende Wirkung erreicht. (Surks and Mendelsohn, 2003)

Die α -Isoform phosphoryliert dabei den Serin-Rest 695, verhindert dadurch die Kontraktion via Phosphorylierung des benachbarten Threonin-Restes 696 durch die Rho-Kinase. (Wooldridge et al., 2004) Neben dieser von der zytosolischen Kalziumkonzentration unabhängigen Relaxierung, vermittelt die Proteinkinase G1 Mechanismen, die über die Reduktion der $[Ca]_i$ den gleichen Effekt erzielen.

Die Offenwahrscheinlichkeit Kalzium-aktivierter Kaliumkanäle (BK_{Ca}) wird durch Phosphorylierung erhöht. Der dadurch vermehrt stattfindende Kaliumausstrom aus der Zelle bewirkt eine Hyperpolarisation, eine Negativierung des Membranpotentials, und führt damit unter anderem zum Schließen von spannungsabhängigen L-Typ Kalzium-Kanälen. (Alioua et al., 1998) Die $[Ca]_i$ wird als Folge dessen nicht weiter erhöht und wirkt der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase entgegen. (Somlyo and Somlyo, 2003)

Das RGS 2-Protein („regulator of G-protein signalling“) ist ein weiteres Substrat der cGKI. (Tang et al., 2003) Eine Aktivierung G_q -gekoppelter Rezeptoren durch endogene Agonisten wie Noradrenalin oder Angiotensin II führt zur Stimulation der Phospholipase $C\beta$, die Synthese von Inositol-1,4,5,-trisphosphat (IP_3) und Diazylglyzerol ist die Folge. IP_3 triggert nach Bindung an den IP_3 -Rezeptor den Kalzium-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum glatter Muskelzellen.

Phosphorylierung von RGS-2 durch die cGKI führt zur Erhöhung der GTPase-Aktivität (Faktor 10^2 bis 10^3) (Hepler, 1999; Heximer et al., 1999) der Alpha-

Untereinheit des G_q -Proteins, dadurch zu einer Hemmung der IP_3 -Synthese und hemmt damit konsekutiv den Kalzium-Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum.

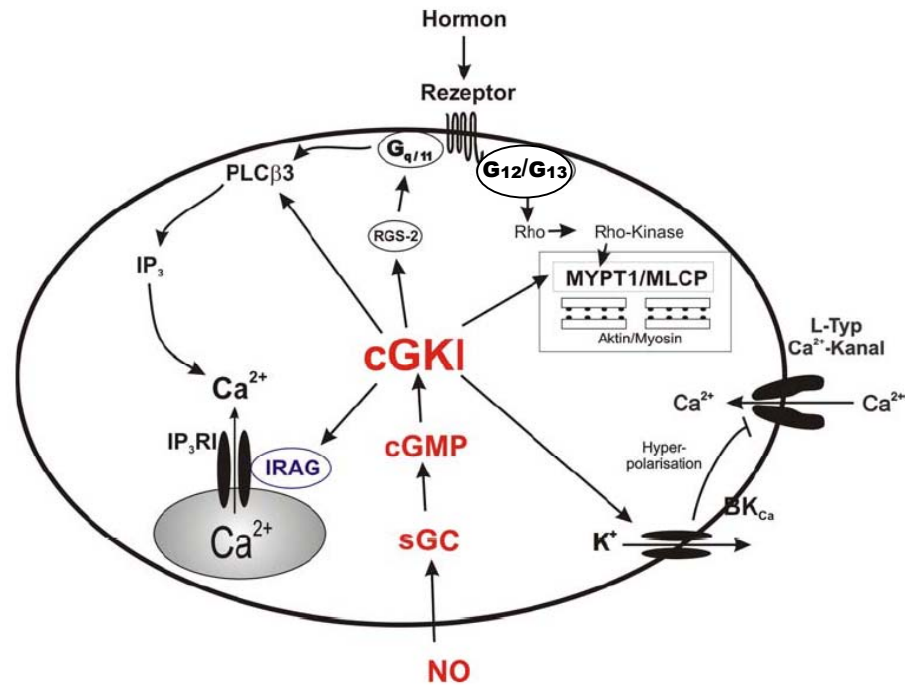


Abb. A-2: Schema der cGKI-abhängigen Relaxierung von glatten Muskelzellen. BK_{Ca}, RGS-2, MYPT1, PLC β 3 und IRAG sind Substratproteine der cGKI. Die Phosphorylierung dieser Substrate bewirkt eine Relaxierung der glatten Muskulatur. (Siehe Text)

Der IP_3 vermittelte Kalzium-Ausstrom kann auch direkt gehemmt werden. Dies wird durch IRAG (IP₃-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat), ein am SR verankertes Protein, bewirkt. Nach Phosphorylierung durch cGKI β unterdrückt IRAG den Kalziumausstrom aus Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums über den IP_3 -Rezeptor. (Geiselhöringer et al., 2004b)

A.1.3. Das IP₃-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG

Identifiziert wurde das 125 kDa schwere Protein IRAG zum ersten mal im Jahr 2000 durch Isolation mittels Affinitätschromatographie aus mikrosomalen Membranen von glatten Muskelzellen der bovinen Trachea. Durch Co-Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass das Protein in einem trimeren Komplex zusammen mit dem IP₃RI und der cGKI β im glatten Muskel vorliegt. (Schlossmann et al, 2000) Im Yeast-Two-Hybrid System konnte die Interaktion von IRAG mit cGKI α und cGKI β ausgeschlossen werden. (Ammendola et al., 2001)

Dies konnte unabhängig davon einige Jahre später eine andere Arbeitsgruppe nochmals bestätigen. (Casteel et al., 2005)

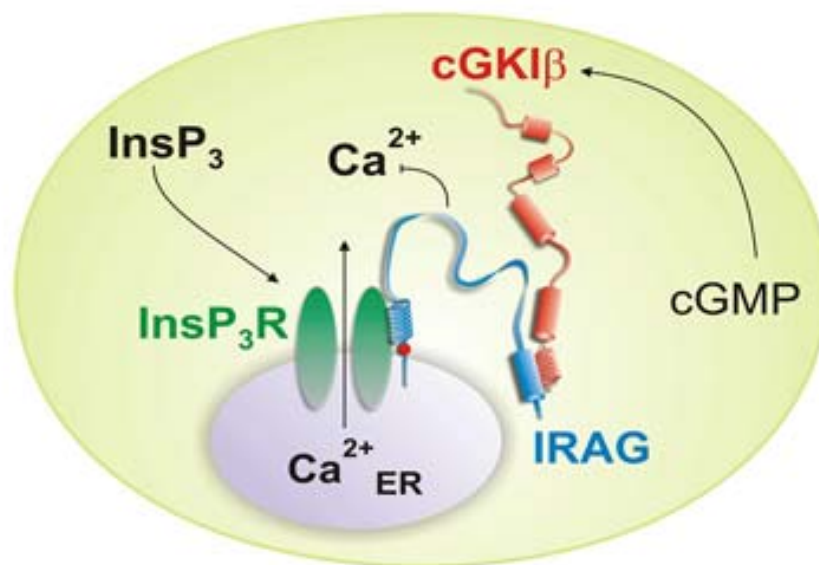


Abb. A-3: Das IP₃-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG.

cGKI β wird durch cGMP aktiviert und interagiert mit ihrem N-Terminus mit IRAG. IRAG ist am endoplasmatischen Retikulum verankert und besitzt eine Interaktionsstelle mit dem Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor. (hier:InsP₃R) InsP₃ führt zum Kalzium-Ausstrom, der nach der Phosphorylierung von IRAG unterdrückt wird.

Mit funktionellen Studien in COS-7 Zellen, in welchen IRAG heterolog exprimiert wurde, konnte die Hemmung des Kalziumausstroms nachgewiesen werden. Der mittels Bradykinin induzierte Ca^{2+} -Ausstrom konnte durch Aktivierung der cGKI β mittels dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP unterdrückt werden.

Eine C-terminal gelegene Transmembrandomäne verankert IRAG in der Membran des SR. In der zentralen Region des Proteins weist IRAG eine coiled-coil Domäne auf. Ihr N-terminaler Teil ist für die Protein-Protein-Interaktion mit dem IP₃-Rezeptor essentiell.

In vitro konnten durch Proteinsequenzierung mittels Massenspektrometrie 5 putative Phosphorylierungsstellen ermittelt werden, die die entsprechenden Konsensussequenzen der cGKI β besitzen. *In vivo* konnten kürzlich zwei der fünf Phosphorylierungsstellen in intakten humanen Thrombozyten bestätigt werden. (Schlossmann et al., 2000)

Kürzlich wurde gezeigt, dass dem NO/cGKI β /IRAG-Signalweg eine entscheidende Rolle in der NO vermittelten Thrombozytenaggregationshemmung zufällt. (Antl et al., 2007)

Ausser in Thrombozyten ist IRAG vor allem in glatten Muskelzellen lokalisiert, wie zum Beispiel im Uterus, im Gastrointestinaltrakt, in der Blase, in der Trachea, der Lunge und insbesondere auch im arteriellen System. (Geiselhöringer et al., 2004a)

Im Gastrointestinaltrakt resultiert die Deletion von Exon 12 des IRAG Gens in einer stark reduzierten Motilität und einer Dilatation des Verdauungsapparates. Die durch 8-Br-cGMP vermittelte Relaxation vorkontrahierter Muskelpräparate des Colons war nahezu aufgehoben. In Analogie dazu relaxierten mit Norepinephrin vorkontrahierte Aortenringe, in Gegenwart von 8-Br-cGMP nicht mehr. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Interaktion zwischen cGKI und IRAG einerseits und dem IP₃-Rezeptor andererseits essentiell ist, für den relaxierenden Effekt von cGMP im glatten Muskel bei hormoninduzierter Kontraktion. (Geiselhöringer et al., 2004b)

A.2. Ziele dieser Arbeit

Laut der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes führen die Kreislaufkrankungen mit über die Jahre relativ stabilen 45% diese Liste nach wie vor an. Stickstoffmonoxid und der entsprechenden Signalkaskade fällt hierbei sowohl im therapeutischen Bereich als auch im Verständnis der zugrundeliegenden Pathologie eine wichtige Rolle zu. Die Pharmaindustrie betreibt mit großem finanziellen Aufwand und hohem Interesse die Suche nach Möglichkeiten einer pharmakologischen Intervention auf vielen Stufen dieses Signalweges. (sGCs, PDEs, NO-Donatoren)

Nicht nur deshalb ist ein fundamentales Verständnis dieser Signalweges wichtig.

Als zentrale Elemente der Signalkaskade fallen dabei der cGKI und deren Substrate eine große Rolle zu. Um die genaue Funktion der Isoformen I α und I β zu klären, wurden kürzlich cGKI knockout Mäuse generiert, die im glatten Muskel nur jeweils eine Isoform der Kinase exprimieren. (Weber et al. 2007) Ebenso generiert wurde eine IRAG Deletionsmutante (IRAG Δ 12/ Δ 12 Maus), bei der die Interaktionsstelle zwischen IRAG und dem IP₃-Rezeptor zerstört wurde. (Geiselhöringer et al., 2004b) Schließlich existiert seit kurzem eine IRAG knockout Maus, die kein IRAG Protein synthetisieren kann.

Diese Mausmodelle bieten die Möglichkeit zur Untersuchung des NO/cGMP/cGKI/IRAG-Signalweges. Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, wie sich die genetischen Manipulationen auf kardiovaskuläre Parameter wie etwa den Blutdruck oder die Herzfrequenz dieser Mausmodelle auswirken. Insbesondere sollte dabei die Rolle von IRAG bei der NO vermittelten Relaxierung in den Widerstandsgefäßen weiter aufgeklärt werden.

B. Material und Methoden

Sämtliche Chemikalien bzw. Pharmaka stammen, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma Aldrich (München, Deutschland), Axxora (Grünberg, Deutschland), und Biotrend (Köln, Deutschland). Sildenafil stammte von der Firma Pfizer (Karlsruhe, Deutschland). Das chirurgische Besteck wurde von Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland), das Nahtmaterial von Ethicon (Norderstedt, Deutschland) bezogen.

B.1. Mäuse

Die Generierung der $\Delta 12/\Delta 12$ Mäuse wurde von Herrn Matthias Werner, Aldo Ammendola und Jens Schlossmann die der cGKI α /cGKI β -Rescue Linien von Silke Weber vorgenommen. Die Mäuse wurden im Tierhaus des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München gezüchtet und gehalten. Hierzu wurden bis zu 5 adulte Tiere in Makrolon Käfigen gehalten. Als Einstreu wurden autoklavierte Späne (Altromin) verwendet, die bei Bedarf noch mit Nistmaterial („Nestlet“, Emsicon) ergänzt wurden. Die Fütterung („Zuchtdiät-Ratten und Mäuse“) und Wasserversorgung erfolgte ad libitum. Zur Zucht wurden jeweils zwei Weibchen im paarungsfähigen Alter (ab 5 Wochen) zu einem Männchen (ab 6 Wochen) gesetzt. Nachkommen wurden durch PCR-Analyse von Schwanzbiopsien genotypisiert und im Alter von 4 Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Für die Experimente wurden 10-14 Wochen alte Wildtyp, $\Delta 12/\Delta 12$, bzw. cGKI α / β -Rescue Tiere mit dem genetischen Hintergrund 129/Sv verwendet.

B.2. Analyse und Detektion von Proteinen

B.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde standardgemäß mit der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dafür wurde eine Mini-Gel Apparatur (Mini Protean II Cell, Bio-Rad)

verwendet. Je nach gewünschten Trenneigenschaften wurden Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid (7,5% bis 10%) gegossen. Zunächst wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel darauf gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit Laemmli-Puffer (Endkonzentration 1x) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die polymerisierten Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut, die denaturierten Proben aufgetragen und bei 150 V vertikal in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Protein Molecular Weight Marker“ (NEB) verwendet. Dieser Marker enthält Proteine mit dem Molekulargewicht von 6,5 bis 175 kDa. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (Millipore).

10x SDS-Laufpuffer pH 8,3

Tris • HCl	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (m/V)

Acrylamid AA30%/BA 0,2%

40% Acrylamid/ Bisacrylamid (Fluka)	3 Raumteile
in H₂O_{bidest.}	1 Raumteil

11,5% Trenngel

Tris • HCl (pH 8,8) 1,5 M	1,8 ml
SDS 10% (m/V)	83,5 µl
AA 30%/BA 0.2%	3,25 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl
H₂O_{bidest.}	3,25 ml

4x Laemmli-Puffer

Tris • HCl pH 6,8	240 mM
SDS	8% (m/V)
DTT	200 mM
Glyzerin	40% (V/V)
Bromphenolblau	quantum satis

5% Sammelgel

Tris • HCl (pH 6,8) 0,6 M	0,5 ml
SDS (10% m/V)	50 µl
AA 30% (29:1 BA)	830 µl
APS 10%	50 µl

TEMED	10 μ l
H₂O_{bidest.}	3,6 ml

B.2.2. Westernblot

Die Anwesenheit bestimmter Proteine in Zell- und Gewebsextrakten wurde durch Western-blotanalyse nachgewiesen. Dazu wurden die Proteinproben durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore) transferiert. Durch Bindung spezifischer Antikörper an die Membran konnten native wie auch heterolog exprimierte Proteine durch Enzymgekoppelte Sekundärantikörper und anschließende Enzymsubstrat vermittelte Farbreaktion detektiert werden.

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

B.2.2.1. Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren

Für das Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) wurden Filterpapiere (GB001 Gel Blotting Papier; Schleicher & Schüll) und die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, mit den entsprechenden Puffern getränkt und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei von unten (Anode) nach oben (Kathode) zwischen zwei Graphitplatten aufgebaut:

6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 1

4 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 2

Membran

SDS-Gel

6 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte durch Blotten mit konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 1 h.

B.2.2.2. Immundetektion:

Die Membran wurde mit 5% Magermilchpulver (MP) in 1x TBST geschwenkt (üN bei 4°C oder 1 h bei RT), um freie Protein-Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Waschen mit 1x TBST ist die Membran über 90 Minuten mit dem entsprechend verdünnten spezifischen primären Antikörper (in 1x TBST + 3% BSA + 0,05% NaN₃) bei RT inkubiert worden. Im Anschluss an dreimaliges Waschen in 1x TBST/1% MP (je 5 min) wurde der Blot mit einem sekundären Antikörper (Konjugat aus Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG und Meerrettich-Peroxidase oder alkalischer Phosphatase) für 1 Stunde geschwenkt. Es folgten wieder 3 Waschschritte, wobei der letzte nur mit TBST erfolgte.

Um die Meerrettich-Peroxidase nachzuweisen, wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion (Roswell & White, 1978) benutzt. Dazu wurde das Luminol-beinhaltende ECL (enhanced chemiluminescence)-System (Amersham) verwendet. Die beiden enthaltenen Lösungen wurden 1:1 gemischt und für 2 min mit der Membran inkubiert. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert die Peroxidase das Luminol, wobei Chemilumineszenz entsteht. Diese konnte mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert werden.

Zur Sichtbarmachung der alkalischen Phosphatase wurde die Membran mit Entwicklungspuffer (20 ml AP-Puffer + 80 µl BCIP + 80 µl NBT) solange inkubiert, bis ein blauer Farbkomplex nachzuweisen war. Die Färbung wurde durch Waschen mit Wasser oder TBST beendet.

Anodenlösung I

Tris-HCl, pH 10,4	300 mM
Methanol	20% (V/V)

Anodenlösung II

Tris-HCl, pH 10,4	425 mM
Methanol	20% (V/V)

Kathodenlösung

Tris-HCl, pH 7,6	25 mM
γ-Aminohexansäure	40 mM

AP-Puffer

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM

Methanol	20%	MgCl₂	5 mM
-----------------	-----	-------------------------	------

10x TBST-Puffer

Tris HCl, pH 8,0	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween 20	0,1%

BCIP-Lösung

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in 50%	
Dimethylformamid	25 mg/ml

NBT-Lösung**Nitroblau-Tetrazolium**

in 70% DMF	50 mg/ml
-------------------	----------

B.3. Untersuchung der Arteria tibialis von Wildtyp- und IRAG Δ 12 Mutanten

Durch die Regulation des Durchmessers kleiner Arterien und Arteriolen wird hauptsächlich der Gefäßwiderstand und damit der Blutdruck bestimmt. Der Einfluss der NO/cGMP-Signalkaskade auf die Regulation des vaskulären Tonus wurde an der Arteria tibialis der Maus untersucht. Die Arteria tibialis von männlichen Wildtyp und Δ 12/ Δ 12 Mäusen, im Alter zwischen 10-14 Wochen, wurde isoliert und in 4° C kaltem PBS vorsichtig freipräpariert und von anhängendem Binde- und Fettgewebe befreit. Anschließend wurde das Gefäß in ein kleines Organbad mit 10 ml KH-Puffer transferiert. Die Enden des Gefäßes wurden auf eine extrem dünn ausgezogene Glaskapillare aufgezogen und mit chirurgischem Nahtmaterial der Stärke 7/0 an der Glaskapillare fixiert. Mikromanipulatoren an beiden Glaskapillaren erlaubten eine korrekte Fixierung der kanülierten Arteria tibialis in horizontaler Position. Das Organbad mit dem fixierten Gefäß wurde anschließend auf der Plattform eines inversen Lichtmikroskops (Carl Zeiss, Jena) befestigt und die Arterie mit einer Fiberglaslampe (Schott) transilluminert. An das Mikroskop angeschlossen war eine Videokamera (Kappa Messtechnik), deren Signal digitalisiert und anschließend

mittels einer Computersoftware (Myoview, Danish Myo Technology) ausgewertet wurde. Mit Hilfe des Computerprogramms war es möglich, die Änderungen des inneren Gefäßdurchmessers permanent zu analysieren und auszuwerten. Die Glaskapillare mit der aufgezogenen Arterie wurde über einen Schlauch mit einem Behälter, der physiologischen KH enthielt, verbunden, der Puffer während der gesamten Messung mit Carbogen begast. Mittels einer Pumpe wurde ein konstanter intravasaler, Druck von 60mmHg erzeugt. Dabei wurde sichergestellt, dass während der gesamten Versuchsdauer kein Fluss im Gefäß auftrat. Nach einer Equilibrierungsphase von 5 Minuten, wurde die Temperatur des KH langsam auf $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ erhöht und über die gesamte Versuchsdauer gemessen und kontrolliert. Nach ca. 30 Minuten entwickelte die *Arteria tibialis* spontan einen myogenen Tonus. Alle Substanzen wurde, nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes des myogenen Tonus, per Pipette (Abimed, Langfeld) direkt ins Organbad appliziert. Es wurden Konzentrationswirkungskurven für Phenylephrin (PE) und dem schnellfreisetzenden NO-Donor DEA/NO (Maragos et al., 1991; Maragos et al., 1993) erstellt. Bei letzterer war die *Arteria tibialis* durch $3\ \mu\text{M}$ PE Badkonzentration vorkontrahiert. Dabei wurde jeweils nach Zugabe einer definierten Konzentration und 2 Minuten Wartezeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes die nächst höhere Konzentration im Organbad durch Applikation einer entsprechend konzentrierten Lösung an PE bzw. DEA/NO erzeugt.

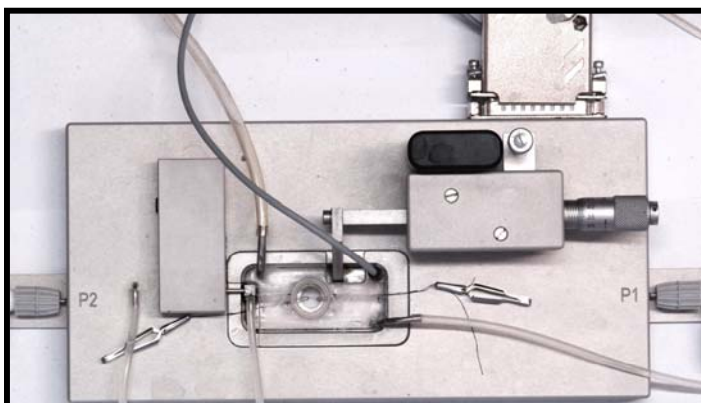
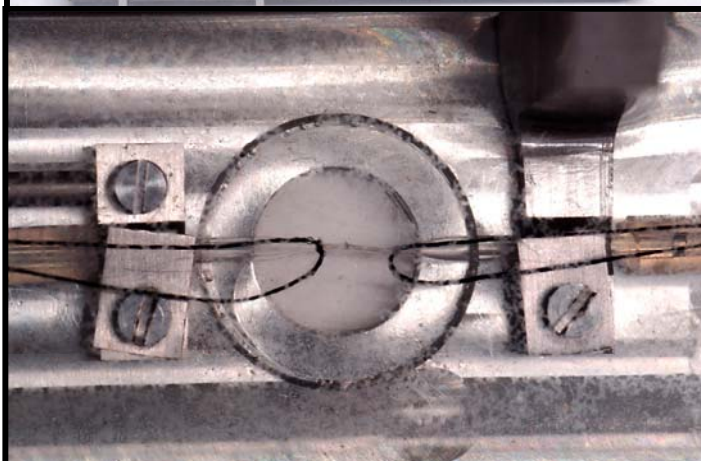
A**B****C**

Abb. B-1: Apparativer Aufbau zur Untersuchung von isolierten Gefäßen unter annähernd physiologischen Bedingungen.

A) Zu sehen ist der Arteriograph in dem sich das Organbad mit der isolierten *A. tibialis* befindet. Mit dem Temperatursensor (dunkelgraues Kabel, von links oben kommend) wird die Badtemperatur auf konstant 37°C gehalten. Der physiologische Puffer im Becken wird mit Carbogen begast (durchsichtiger Schlauch, von links oben) und kann über den Schlauch (rechts unten) abgesaugt werden. Die PC-Schnittstelle ermöglicht die Steuerung der überwachten Parameter und Analyse der Messdaten per Computer. Der Puffer fließt aus dem Vorratsgefäß (nicht zu sehen) über den Eingang P1 durch das Gefäß und verlässt den Arteriographen über den Ausgang P2. Die beiden Bulldog-Klemmen halten durch ihre Masse die Seidenfäden gespannt. (siehe B)

B) In der vergrößerten Darstellung des Organbads lässt sich das Gefäß erkennen. Die Arterie ist auf die beiden Glaskapillaren aufgezogen und mit chirurgischer Seide fixiert. Durch das Sichtfenster lässt sich das Gefäß betrachten.

C) Mit einem inversen Mikroskop und daran angeschlossener Videokamera kann die Arterie während der Messung beobachtet und können die Bilder aufgezeichnet werden. Eine Computer-Software ermittelt den Innendurchmesser der *Arteria tibialis*.

Puffer:

PBS, pH 7,4:

NaCl	135 mM
KCl	3 mM
Na₂HPO₄ • 2 H₂O	8 mM
KH₂PO₄	2 mM

Krebs-Henseleit (CO₂ -begast: pH 7,4)

NaCl	118,3 mM
KCl	4,7 mM
CaCl₂ • 2H₂O	1,8 mM
MgSO₄ • 7H₂O	1,2 mM
KH₂PO₄	1,2 mM
NaHCO₃	25,0 mM
Na₂EDTA • 2H₂O	0,026 mM
Glukose	11,1 mM

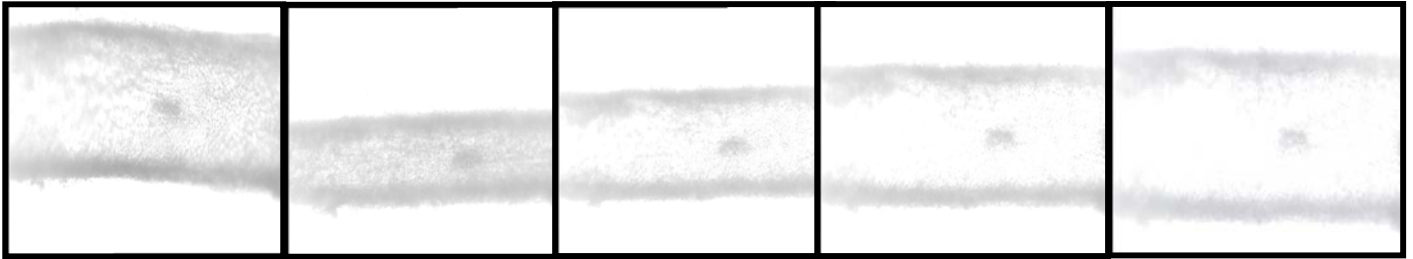


Abb. B-2: Bildsequenz aufgenommen während einer Messung mit einer isolierten *Arteria tibialis*. Nach der Zugabe von Phenylephrin kontrahiert das Gefäß. (zweites Teilbild) Mit steigender DEA/NO Konzentration im Organbad dilatiert die Arterie zunehmend. (nachfolgende Bilder der Sequenz)

B.4. Hinterbein Perfusion

Das Hinterbein Perfusionsmodell stellt eine Methode dar, die Reaktionen der gesamten Widerstandsgefäße in den Hinterbeinen der Maus in Form von Druckänderungen, verursacht durch vasoaktive Pharmaka, zu erfassen. Nach cranialer Dislokation wurde das Tier in die feuchte Kammer der Perfusionsanlage überführt (Hugo Sachs, March-Hugstetten) und die Bauchhöhle eröffnet. Der abdominale Abschnitt der Vena cava inferior und der Aorta wurde von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit, die Vene längs aufgeschnitten, und das austretende Blut mit Sugi® Saugtupfern (Kettenbach) aufgenommen. In die Aorta wurde eine Metallkanüle (Hugo Sachs) eingeführt und dieser mit 7/0 Seide fixiert. Die Kanüle war über ein Schlauchsystem mit einer Pumpe und einem auf 37° C vorgewärmtem Reservoir mit Carbogen begastem KH verbunden. Ein weiterer Abgang des Schlauchsystems ermöglichte eine direkte Injektion von Pharmaka in den Kreislauf der perfundierten Hinterbeine. Die letzte Abzweigung des Schlauchsystems war über einen kalibrierten Druckaufnehmer (Hugo Sachs) mit einem Computer verbunden, über den man mittels der Software HSE-BDAS Ver. 1.0.26.9 (Hugo Sachs) den mittleren Druck im Gefäßsystem der Hinterbeine ermitteln konnte.

Während der gesamten Messung lag die Maus in der verschlossenen, auf konstant 37° C temperierten feuchten Kammer. Zu Beginn der Messung wurde die Pumpleistung innerhalb der ersten fünf Minuten langsam soweit erhöht, bis ein Perfusionsdruck von 100 ± 0.5 mmHg erreicht war. Nach einer Equilibrierungsphase von weiteren fünf Minuten wurde mit der Dosiswirkungskurve von DEA/NO begonnen, wobei die nächsthöhere Dosis stets erst beim Erreichen eines Gleichgewichtszu-

standes injiziert wurde. Die Viabilität der Gefäße in den Hinterbeinen der Nager konnte durch Applikation einer Dosis PE am Ende des Experiments gezeigt werden.

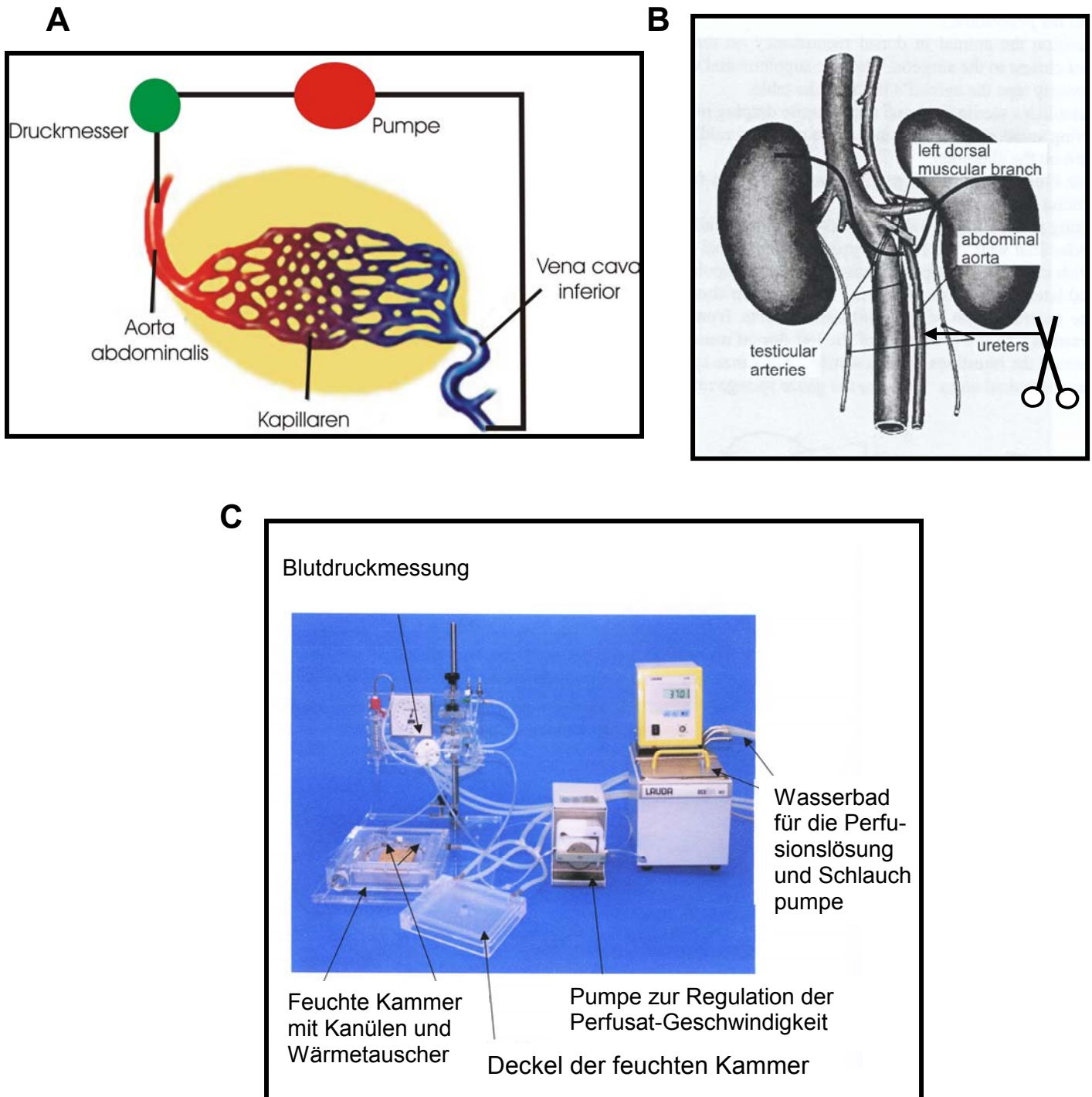


Abb. B-3: Das Hinterbeinperfuisions-Modell

A) Mit Hilfe einer Pumpe und einer Pufferlösung wird über die thorakale Aorte ein künstlicher „Kreislauf“ erzeugt. Das Kapillarnetz der Hinterbeine wird durchströmt und über die Vena cava inferior

verlässt der Puffer den „Kreislauf“. Ein Drucksensor misst die Druckunterschiede, die durch vasoaktive Pharmaka induziert werden.

B) Die stilisierte Schere und der schwarze Pfeil zeigen den Abschnitt an, an dem die Aorta eröffnet und die Metallkanüle eingeführt wird.

C) Gezeigt ist der apparative Aufbau der Messanlage im Überblick.

Puffer:

KH-Puffer siehe B.3.

B.5. Invasive Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie Transmittern

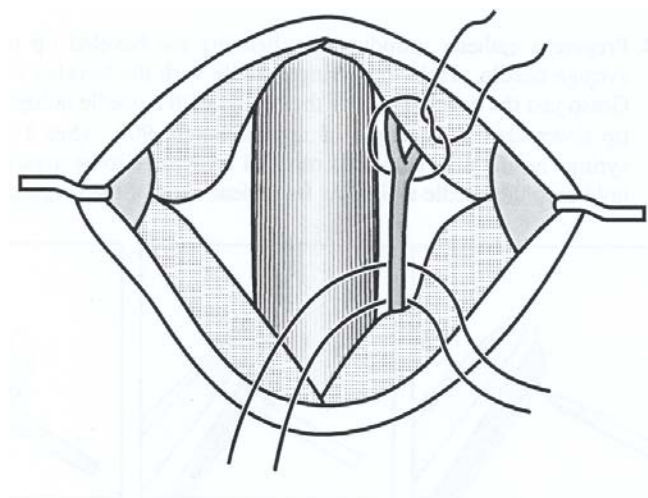
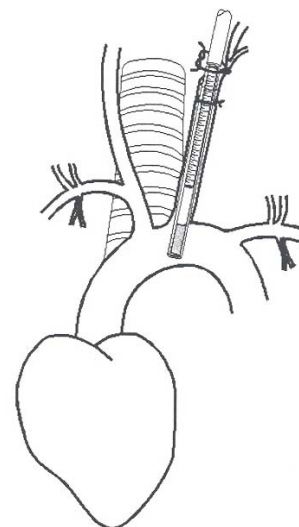
Um die Auswirkungen der genetischen Manipulation *in vivo* in den transgenen Mäusen zu erfassen, wurde invasiv der Blutdruck in den Tieren gemessen. 24 Stunden vor der Implantation der Messgeräte mussten diese aktiviert und auf ihre Funktion hin überprüft werden.

Zu Beginn des operativen Eingriffs, wurden die männlichen Nager mit einem Gemisch von 1.75 Vol. % Isofluran (Forene[®], Abott) und 100 % O₂ narkotisiert. Die Atmung erfolgte spontan. Der Proband wurde auf einer mit 37° C temperierten, mit steriler Auflage (Hartmann, Heidenheim) abgedeckten Wärmematte (Fischer Scientific, Ulm), fixiert. Die Augen der Tiere wurden mit Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe (Bayer, Leverkusen) bedeckt. Die *Arteria carotis communis sinistra* wurde stumpf, unter Schonung des *Nervus vagus* freipräpariert. Der Zugang erfolgte dabei nach vorsichtigem Teilen der beiden Hälften der Glandula mandibularis, zwischen dem *Musculus sternohyoideus* und dem *M. sternomastoideus*. Während die *C. communis* kaudal zur Bifurkation irreversibel mittels 7/0 Seide ligiert wurde, erfolgte ca. 0,75 cm proximal zur ersten Ligatur eine zweite, reversible, unter Verwendung einer Bulldog-Klemme. Nach einem Schnitt in den vom Blutstrom abgetrennten Gefäßabschnitt der Karotis wurde der Katheter des Transmitters (DataSciences Int., Frankfurt, Modell PA-C10) eingeführt, und mit 7/0 Nähfaden am Gefäß fixiert und zum Einschnitt hin abgedichtet. Der Transmitter wurde in einer seitlich geschaffenen Tasche subkutan platziert. Zur Volumensubstitution einerseits und um die Reibung des Transmitters andererseits zu mildern, wurde die Tasche mit 1 ml Ringer-Lactat-Lösung gefüllt (Fresenius), die Drüsen dann in ihre ursprüngliche Position gebracht und die Wunde mit 7/0 Seide vernäht. Die Naht wurde mit steriler, isotoner NaCl-Lösung (Braun) gereinigt, den Mäusen subkutan 5 mg pro kg

Körpergewicht Ketoprofen injiziert und die wachen Tiere vorsichtig in ihre Käfige gesetzt. Die weitere postoperative Analgesie erfolgte ab dem folgenden Tag und für die nächsten 2 Tage durch Zugabe von Ibuprofen (30 mg/kg KG, berechnet auf eine Wasseraufnahme von ca. 5 ml pro Tag) ins Trinkwasser der Mäuse. Nach einer mindestens fünftägigen Regenerationsphase wurden die Nager in ihren jeweiligen Käfigen auf Daten-Empfangsplatten gestellt, die mit einem Computer verbunden waren. Nach dem Aktivieren der Transmitter durch Überstreichen des Käfigs mit einem starken Magneten, ließ sich der Blutdruck in den sich frei bewegenden, wachen Mäusen kontinuierlich (jede Minute, für 20 Sekunden) messen. Die Software Dataquest ART 4.1. (Data-Sciences Int.) ermöglichte die Erfassung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks, sowie die Aktivität der Probanden innerhalb der Plattenebene, und deren Pulsdruck.

Die Tiere wurden abwechselnd in einer 12 Stunden dauernden Licht- und Dunkelphase gehalten. Die Lichtphase der Mäuse dauerte jeweils von 6Uhr bis 18Uhr, die Dunkelphase von 18Uhr bis 6Uhr.

Die Substanzen wurden in steriler, isotoner NaCl-Lösung (Braun) gelöst und als Bolus, abhängig vom Körpergewicht, intraperitoneal appliziert. Als NO-Donoren wurde das kurzwirksame SNP und das stabilere (im Vergleich zu DEA/NO und SNP), länger wirkende DETA/NO verwendet. (Mooradian et al., 1995)

A**B**

C



D

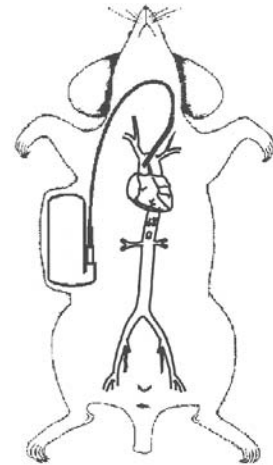


Abb. B-5: Durchführung der Transmitter Implantation

A) Schematisch dargestellt ist die genaue Lokalisation der beiden Ligaturen an der *Arteria carotis*, die in diesem Abschnitt parallel zur Trachea verläuft.

B) Schematische Darstellung zum Zeitpunkt nach der Insertion und Fixierung des Katheters. Die Katheterspitze mündet in den Aortenbogen, ohne die Gefäßwand zu berühren.

C) Größenverhältnis des Transmitters zu einem 1Euro-Cent Stück. Rechts unten im Bild lässt sich ein Teil des insgesamt 5 cm langen Katheters erkennen.

D) Schematisch ist hier die Lage (subkutan) des Transmitters nach Implantation gezeigt.

Verwendete Substanzen und Dosierungen zur i.p. Injektion:

SNP	2 mg/kg KG	7 $\mu\text{mol/kg Kg}$
DETA/NO	60 mg/kg KG	370 $\mu\text{mol/kg KG}$
PE · HCl	3 mg/kg KG	14,7 $\mu\text{mol/kg KG}$
CCh	0,5 bzw. 1 mg/kg KG	2,74 bzw. 5,5 $\mu\text{mol/kg KG}$
Y-27632 · 2HCl	10 mg/kg KG	31.2 $\mu\text{mol/kg KG}$
Ketoprofen	5 mg/kg KG	19,7 $\mu\text{mol/kg KG}$
Isoprenalinbitartrat	1 mg/kg KG	2,8 $\mu\text{mol/kg KG}$
Sildenafilcitrat (Viagra®)	10 bzw. 20mg/kg KG	15 bzw. 30 $\mu\text{mol/kg KG}$
Prazosin · HCl	2 mg/kg KG	4,8 $\mu\text{mol/kg KG}$

Eine Ausnahmegehmigung nach §9 Abs. 1. Satz 4 TierSchG der Regierung von Oberbayern für die oben genannten Eingriffe an der Maus lag für Dominik Bernhard vor.

B.6. Herzfrequenzmessung mittels EKG von perfundierten, isolierten murinen Herzen

Um eventuelle Veränderungen an der hormonellen Frequenzmodulation festzustellen, wurden Herzen aus $\Delta 12$ Tieren beziehungsweise aus IRAG knockout Tieren frisch isoliert und perfundiert. Nach Tötung der Mäuse mittels cranialer Dislokation wurde der Brustraum eröffnet, das noch schlagende Herz vorsichtig entnommen und über den Aortenbogen innerhalb von zwei Minuten an einer Metallkanüle (Aussendurchmesser 1,2 mm, Innendurchmesser 0,7 mm, Hugo Sachs, Deutschland) mittels Nähseide der Stärke 7/0 befestigt. Die Kanüle war über einen Polyethylenschlauch mit einem mit Carbogen begasten KH-Reservoir verbunden. Eine Schlauchpumpe (Abimed) wurde so eingestellt, dass die Flussrate des retrograd perfundierten Herzens 3 ml/min betrug. Der Puffer wurde vor Eintritt in das Organ auf 37° Celsius erwärmt. Nach einer Equilibrierungsphase von 30 Minuten wurden die zwei Elektroden eines EKG-Transmitters (Modell: TA10EA-F20, Data-Sciences International) dem schlagenden Herzen soweit angenähert, dass eine Elektrode das Hohlorgan im Bereich des rechten Atriums berührte, die zweite an der Herzspitze. Nach Aktivierung des Transmitters konnte über eine Empfangsplatte und der Software Dataquest ART 4.1. (Data-Sciences International) ein EKG ermittelt werden, das der zweiten Eindhoven-Ableitung entspricht, und darüber die Herzfrequenz des autonom schlagenden Organs bestimmt werden. Über einen Dreiweghahn konnte das Herz mit KH mit steigenden Konzentrationen an Carbachol perfundiert werden. Die Dosiswirkungskurven wurden bei basaler Schlagfrequenz und an mit 10^{-6} M Isoprenalin stimulierten Herzen von Kontrolltieren, $\Delta 12$ - und IRAG KO Mäusen ermittelt.

B.7.Statistik

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des Student t-Tests untersucht. Ein Stern (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten an, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet wurde. Zwei Sterne zeigen ein Signifikanzniveau von kleiner 1% an ($p < 0,01$), drei Sterne stehen für $p < 0,001$. Der Buchstabe n gibt die Anzahl der untersuchten Tiere von jedem Genotyp an. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Prism Version 4.0 (Graphpad Software Inc.) verwendet.

C. Ergebnisse

C.1. Charakterisierung von IRAG $\Delta 12$ Tieren

C.1.1. Westernblotanalyse von IRAG mittels Immunodetektion

Das Vorkommen von IRAG wurde mit einem spezifischen Antikörper (siehe Anhang) in Gesamtproteinextrakten verschiedener Mausgewebe mittels Immunoblots analysiert. Bei der Gewinnung von Protein aus Mausgeweben wurde stets darauf geachtet, dass die Organe frei von Fremdgewebe (z.B. Fettgewebe) und Blut sind, da dies das Ergebnis verfälschen könnte. Das Fettgewebe bewirkt dabei einen „Verdünnungseffekt“ des Organextraktes, mit scheinbar geringerer IRAG Expression und die sich im Blut befindenden Thrombozyten exprimieren IRAG und können zu einem falsch-positiven bzw. scheinbar höheren Expressionsniveau führen. Es wurden insgesamt verschiedene Gewebe untersucht. Dabei zeigte sich, dass IRAG stark in Uterus, Blase, Magen, Colon und auch in der Aorta exprimiert wird. (Siehe Abb.)

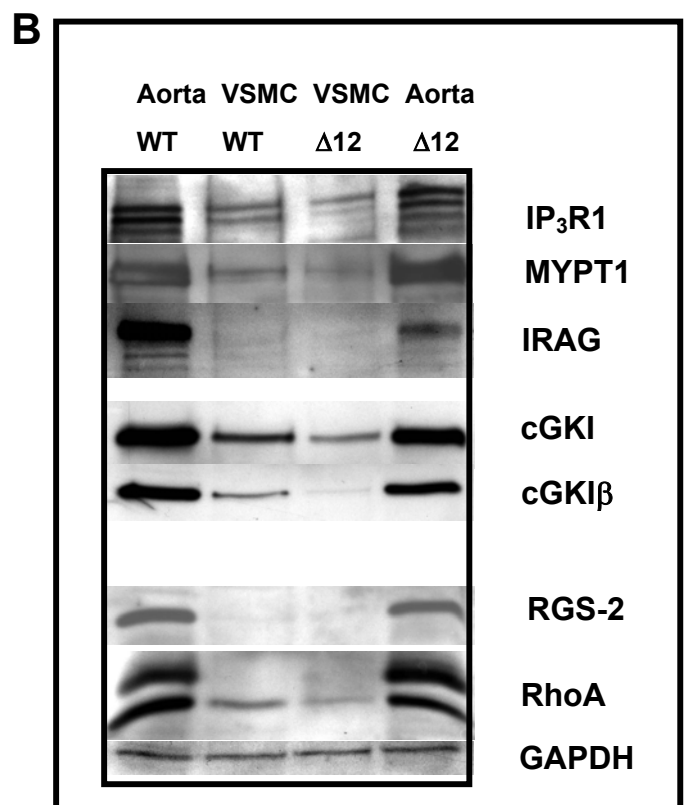
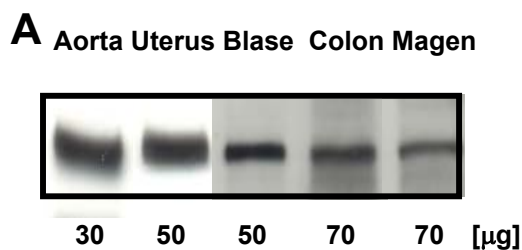


Abb. C-1: Westernblots von homogenisierten murinen Wildtyp bzw. IRAG Δ 12 Geweben

A) Gezeigt ist ein Westernblot verschiedener Gewebe, der mit dem IRAG-Antikörper immundekoriert und mittels ECL-System detektiert wurde. Die jeweilige Gesamtproteinmenge, die aufgetragen wurde, ist angegeben.

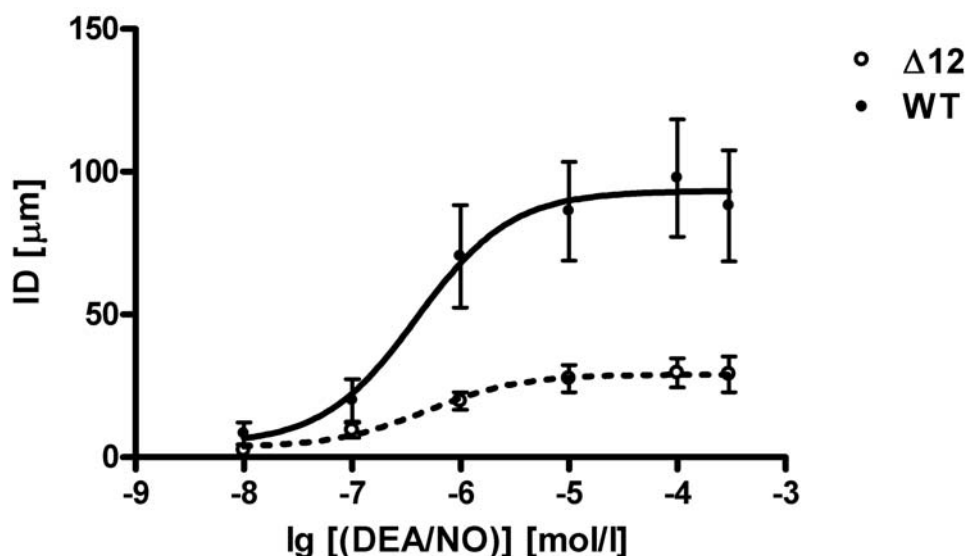
B) Gezeigt ist ein Westernblot (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Katja Sigl) verschiedener Gewebe, der mit den entsprechenden Antikörpern gegen die angegebenen Proteine (rechts) immundekoriert und mittels ECL-System detektiert wurde. Für die beiden mittleren Bahnen wurden Zellkulturen muriner glatter Muskelzellen verwendet.

C.1.2. Einfluss der Deletion der IRAG Interaktionsstelle auf die NO vermittelte Relaxierung der *A. tibialis*

Nicht die Aorta, sondern kleine Arterien und Arteriolen regeln den peripheren Widerstand und damit den Blutdruck. Sie bringen durch ihre geringe Größe und gleichzeitig durch den geringen Grad an Parallelschaltung, dem Blutfluss den größten Widerstand entgegen. Werden solche kleine Arterien isoliert und *in vitro* ein intravasaler Druck aufgebaut, so entwickeln sie nach kurzer Zeit spontan einen myogenen Tonus. (Brayden and Nelson, 1992; Schubert et al., 1999)

Im Folgenden wurden Segmente der *A. tibialis* von Wildtyp und IRAG Δ 12/ Δ 12 Mäusen analysiert, die nach Anlegen eines intramuralen Drucks von 60 mmHg spontan einen myogenen Tonus entwickelten. Diese Tatsache, deutet an, dass die Regulation des Gefäßtonus in diesem Gefäß sowohl im Wildtyp als auch in IRAG Δ 12/ Δ 12 Mäusen ähnlich oder identisch zu der von „echten“ Widerstandsgefäßen ist.

A



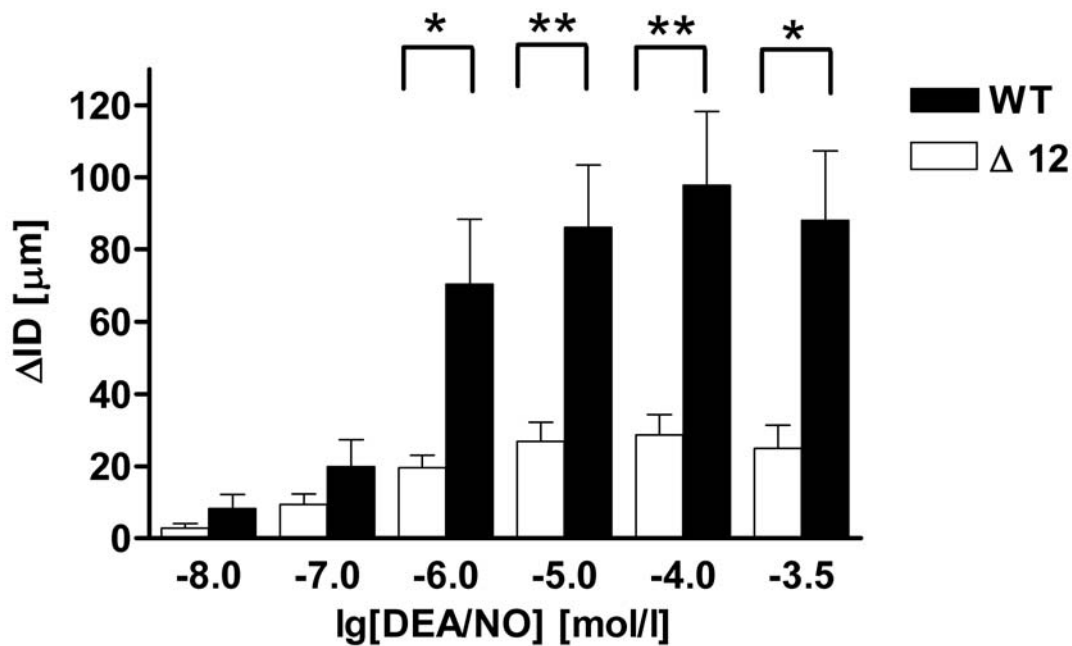
B

Abb. C-2: Relaxierung der isolierten *Arteria tibialis* bei WT- und $\Delta 12$ -Mäusen

A) Dargestellt ist der Unterschied des Innendurchmessers (ID) zwischen vorkontrahierten und dilatierten Arterien in μm in Abhängigkeit der DEA/NO Konzentration im Organbad. (n=8, für die höchste Konzentration (300nM) n=4). Die dicke durchgezogene(WT) beziehungsweise die unterbrochene ($\Delta 12$) sigmoide Linie beschreibt die Näherungskurve zu den tatsächlichen Werten.

B) Auswertung der Dosiswirkungskurven in Form eines Balkendiagramms. * (p<0,05); ** (p<0,01)

Die Applikation des schnellfreisetzenden NO-Donors DEA/NO bewirkte bei den Wildtypgefäßen eine deutliche Relaxierung des glatten Muskels und damit eine Vergrößerung des Gefäßlumens. Bei den Arterienabschnitten der Mutanten war die Dilatation durch den NO-Donor wesentlich geringer (Abb. C-2A)) Die EC_{50} -Werte der beiden Dosiswirkungskurven lagen zwischen $3,9-4,9 \cdot 10^{-7}$ M. Die größte Dilatation erreichten die Arterien beider Genotypen bei einer Badkonzentration von 10^{-4} M DEA/NO. (WT n=8, $97,75 \pm 20,58 \mu\text{m}$ versus $\Delta 12/\Delta 12$ n=8, $28,63 \pm 5,7 \mu\text{m}$; p=0.006). Der Unterschied in der NO vermittelten Relaxierung war schon ab einer Konzentration von 10^{-6} M DEA/NO signifikant. (siehe Abbildung) Dieses Ergebnis zeigt, dass dem cGKI β /IRAG Signalweg in diesem „Quasi-Widerstandsgefäß“ bei der NO vermittelten Relaxierung eine wichtige Rolle zukommt. Um diese Aussage auch auf „echte“ Widerstandsgefäße ausdehnen zu können, bedarf es eines anderen

Modells. Die entsprechenden Gefäße der Maus besitzen einen zu geringen Durchmesser für die eben beschriebene Methode.

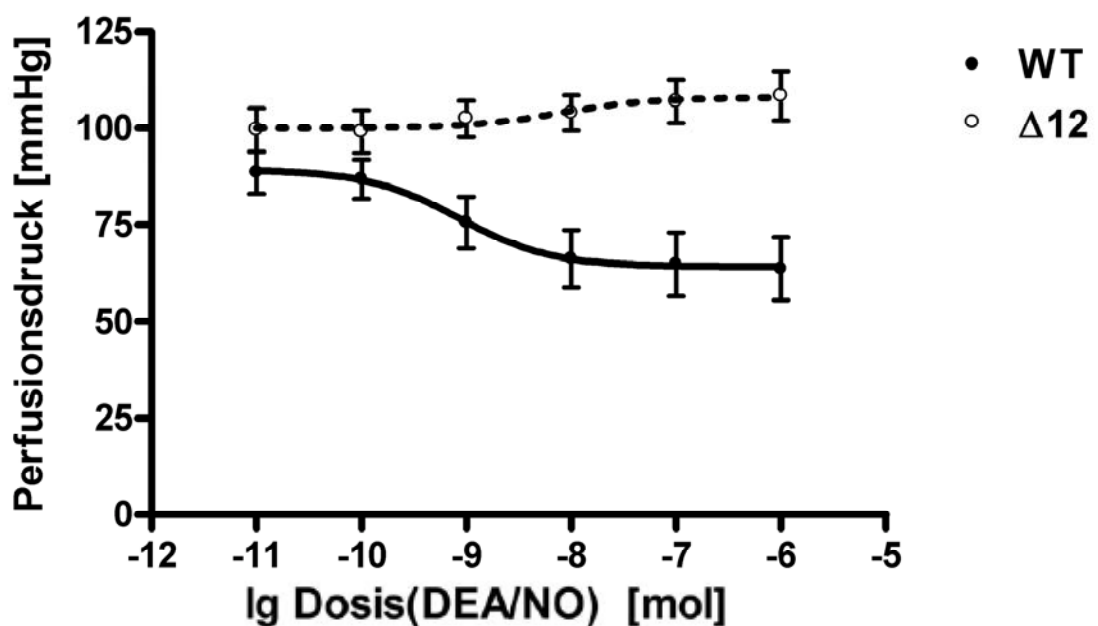
C.1.3. Perfusion der Hinterbeine von Wildtyp und IRAG $\Delta 12$ Mäusen

Bei der Hinterbein-Perfusion handelt es sich um eine Methode, die die Antwort aller Widerstandsgefäße in den Hinterbeinen der Maus nach NO-Donator Applikation erfassen kann.

Dazu wurden bei einem über mehrere Minuten stabilen Perfusionsdruck von 100 mmHg DEA/NO Dosiswirkungskurven ermittelt. (Abb. C-3A)) Bereits bei der geringsten Dosis von 10^{-11} mol zeigen die Hinterbeine der Kontrolltiere einen geringen Abfall des Perfusionsdrucks ($88,63 \pm 5,5$ mmHg), der bei der größten Dosis von 10^{-6} mol $67,9 \pm 8,2$ mmHg erreichte. Der Druck in den entsprechenden Gliedmaßen der mutierten Mäuse führte zu keinem Abfall des Perfusionsdrucks durch die verwendeten DEA/NO Boli. Stattdessen zeigte sich ein tendenziell leichter Anstieg.

Die Druckwerte am Beginn und am Ende der Messung unterschieden sich aber nicht signifikant. (Abb. C-3)

A



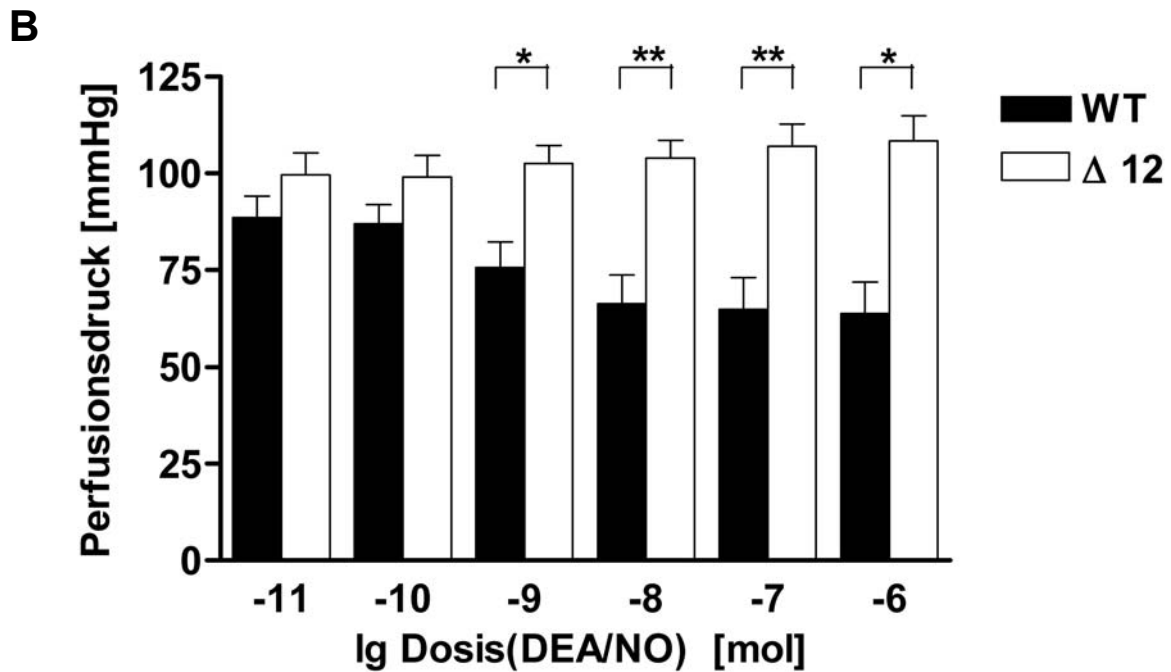


Abb. C-3: Vasodilatation durch DEA/NO in den perfundierten Hinterbeinen von WT- und $\Delta 12$ -Mäusen. **A)** Dargestellt ist der Abfall des Perfusionsdrucks in mmHg in Abhängigkeit der applizierten Stoffmenge an DEA/NO in mol. Die dicke, durchgezogene (Wildtyp) und die gestrichelte Linie ($\Delta 12$) zeigt die jeweilige Näherungskurve. Die n-Zahl beträgt n=8, bei der höchsten Dosis n=4. Was zeigen die anderen Linien? **B)** Statistische Darstellung der Dosiswirkungskurven als Balkendiagramm. * (p<0,05); ** (p<0,01)

Die Deletion von Exon 12 resultiert in der Zerstörung der IP₃-Rezeptor Interaktionsstelle von IRAG. Analog zu der isolierten *Arteria tibialis* zeigte demnach dieses Experiment, dass die IRAG/IP₃-Rezeptor Interaktion für die NO vermittelte Relaxierung der Widerstandsgefäße in den Hinterbeinen der Maus essentiell ist. Um diese Aussage auch auf das lebende Tier ausweiten zu können, war es notwendig, die Veränderung des Blutdrucks der beiden Genotypen nach Applikation von NO-Donatoren zu messen.

C.1.4. Effekt von [cGMP]_i erhöhenden Pharmaka auf den Blutdruck von IRAG $\Delta 12$ und Wildtyp-Mäusen

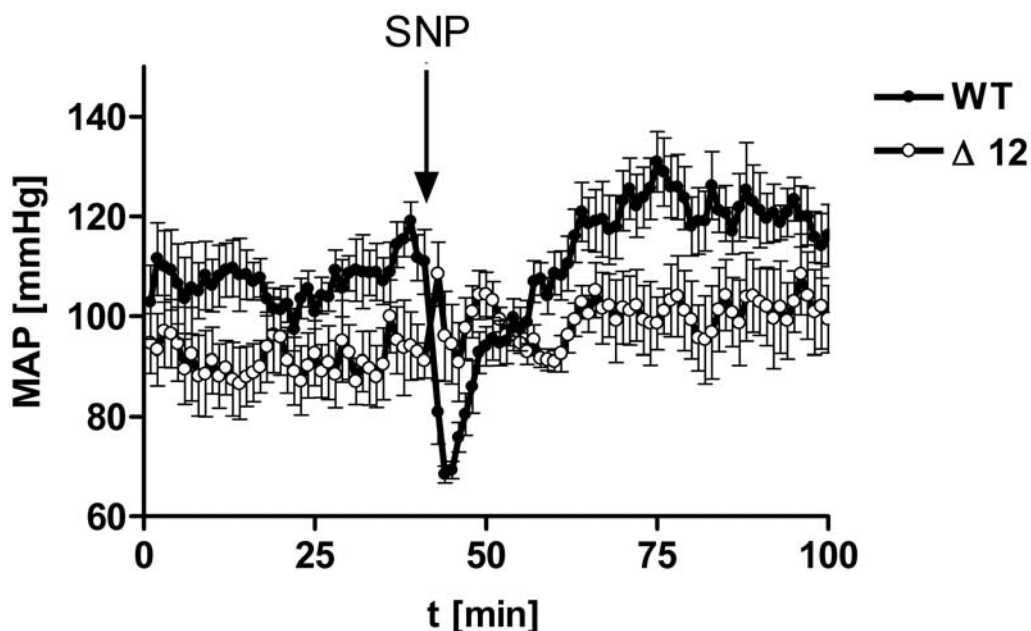
Nach der Implantation der Telemetrie-Transmitter hatten die Mäuse eine Regenerationsphase von mindestens 5 Tagen. Danach erhielten die Versuchstiere einen in der Humanmedizin klinisch etablierten NO freisetzenden Wirkstoff, Natriumnitroprussid intraperitoneal verabreicht in einer Dosierung von 7 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht.

In der nachfolgenden Abbildung ist der Effekt auf den mittleren arteriellen Blutdruck zu sehen. Der MAP („mean arterial blood pressure“) ergibt sich näherungsweise aus diastolischem Blutdruck und dem Drittel der Differenz von systolischem und diastolischem Druck. Genauer gesagt setzt er sich aus dem Produkt der Herzauswurfleistung und der Compliance der Aorta zusammen zu dem der zentrale Venendruck addiert wird.

Beide Kurven zeigen am Ende des Effekts (Abb. C-4A)) einen Anstieg des MAP über den Basalwert vor der Injektion. Dies lässt sich durch die Applikationszeit tagsüber erklären. Die noch schlafenden Mäuse wurden durch die Injektion aufgeweckt und waren nach Abklingen des Effekts noch wach und aktiv und damit der Blutdruck erhöht.

Die Reduktion des Blutdrucks durch SNP ist bei den Mutanten stark beeinträchtigt. Der systolische, diastolische und der mittlere arterielle Druck nimmt im Vergleich zum Wildtyp signifikant weniger ab. (Abb. C-4)

A



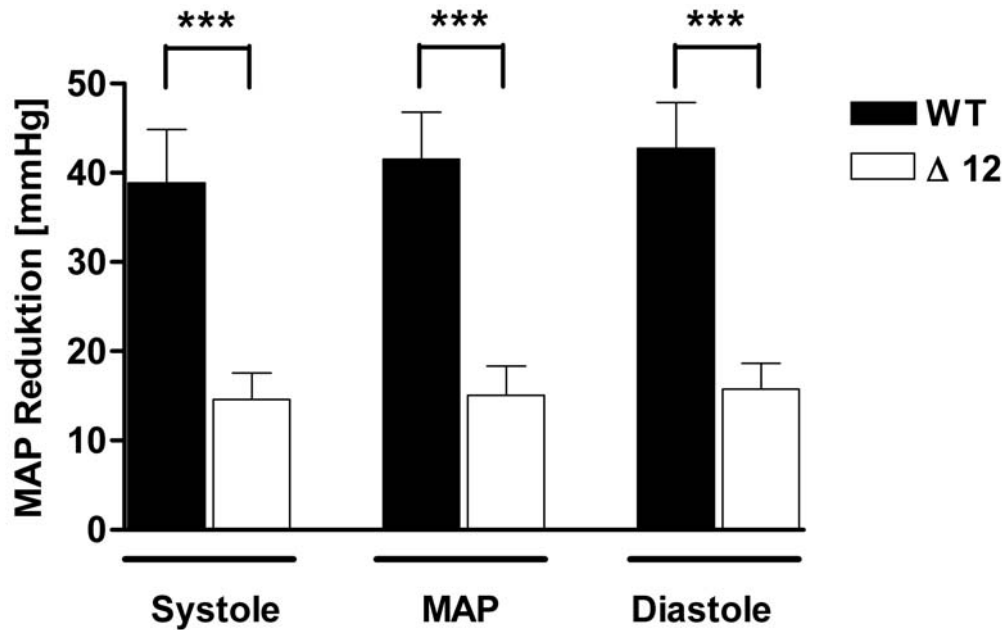
B

Abb. C-4: Blutdruckabfall durch SNP bei wachen, frei beweglichen WT- und $\Delta 12$ -Mäusen

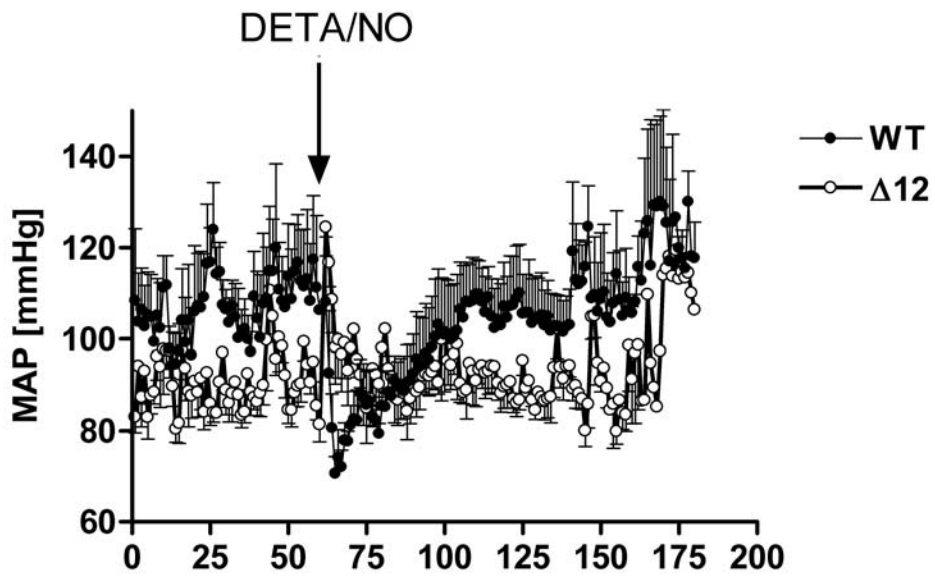
A) Dargestellt ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks über die Zeit. Der schwarze Pfeil zeigt den Zeitpunkt der i.p. Applikation von $7\mu\text{mol/kg}$ KG SNP an. (n=6)

B) Statistische Auswertung von A) als Balkendiagramm, welches den Unterschied der Reduktion des MAP in mmHg durch die SNP Applikation zeigt. ***($p < 0,001$)

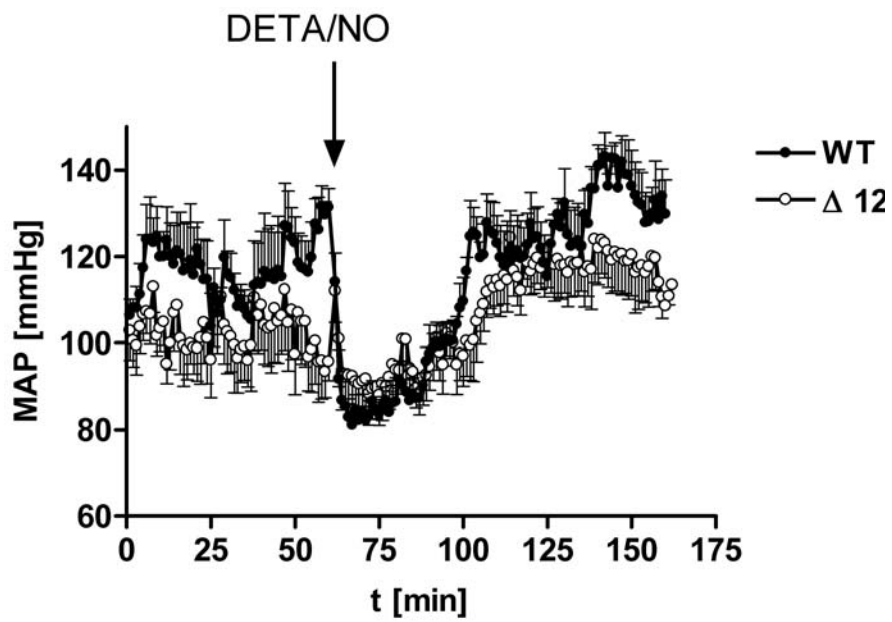
Mit DETA/NO, einem Stickstoffmonoxid freisetzenden Pharmakon mit längerer Halbwertszeit, ließ sich der mit SNP gezeigte Effekt im ähnlichen Umfang reproduzieren. (Abb.C-5) Die Reduktion des Blutdrucks fiel auch hier in den $\Delta 12/\Delta 12$ Mäusen um ca. 70% geringer aus. Wiederholt man die Prozedur in der Dunkelphase, die der aktiven Phase von Nagern entspricht, zeigt sich dieser deutliche Unterschied ebenso. Dieser Unterschied war stets signifikant, sowohl in den mit SNP, wie auch in den mit DETA/NO durchgeführten Experimenten.

Somit ist IRAG ein bedeutender Mediator in der NO/cGMP/cGKI β abhängigen Relaxierung des vaskulären glatten Muskels.

A



B



C

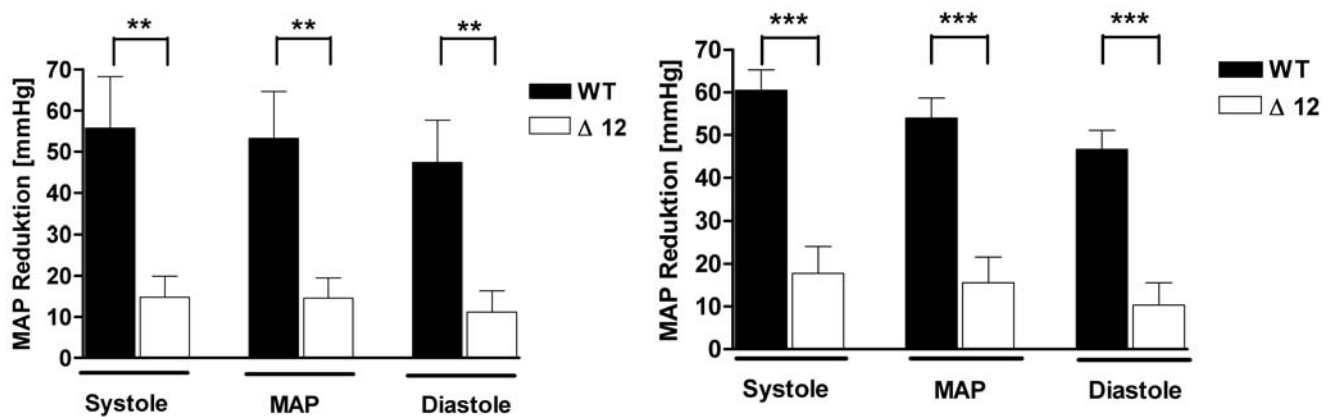


Abb. C-5: Blutdruckabfall in wachen, sich frei bewegenden Tieren durch DETA/NO

A) Gezeigt ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks in Abhängigkeit von der Zeit während eines begrenzten Abschnitts der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt die Applikation von DETA/NO ($370 \mu\text{mol/kg KG}$) an. ($n=6$)

B) Analog zu A), jedoch in der Dunkelphase

C) Statistische Auswertung von A) (linke Abb.) und B) (rechte Abb.) als Balkendiagramm, welches den Unterschied der Reduktion des MAP in mmHg durch die DETA/NO Applikation zeigt.*($p<0,05$); **($p<0,01$);***($p<0.001$)

Um einen möglichen Unterschied in der PDE 5 abhängigen Degradierung von cGMP (durch Veränderung der Aktivierung der PDE 5, Rybalkin et al. 2003) zu untersuchen, wurde den Versuchstieren Sildenafil appliziert.

Es ist bekannt, dass Sildenafil in Abwesenheit von NO nur eine sehr schwache Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel bewirkt. (Cawley et al., 2007) In klinischen Studien an gesunden Probanden bewirkte Sildenafil in der am höchsten in Deutschland zugelassenen Dosierung von 100mg kaum eine Blutdrucksenkung. http://www.pfizer.com/pfizer/download/uspi_viagra.pdf (mittlere maximale Senkung der Systole: 8,5 mm Hg und der Diastole: 5,5 mm Hg)

Die i.p. Verabreichung der zwei verwendeten Dosierungen von Sildenafil bewirkte in der Maus ebenfalls nur einen geringfügigen Abfall des MAP. (Abb. C-6)

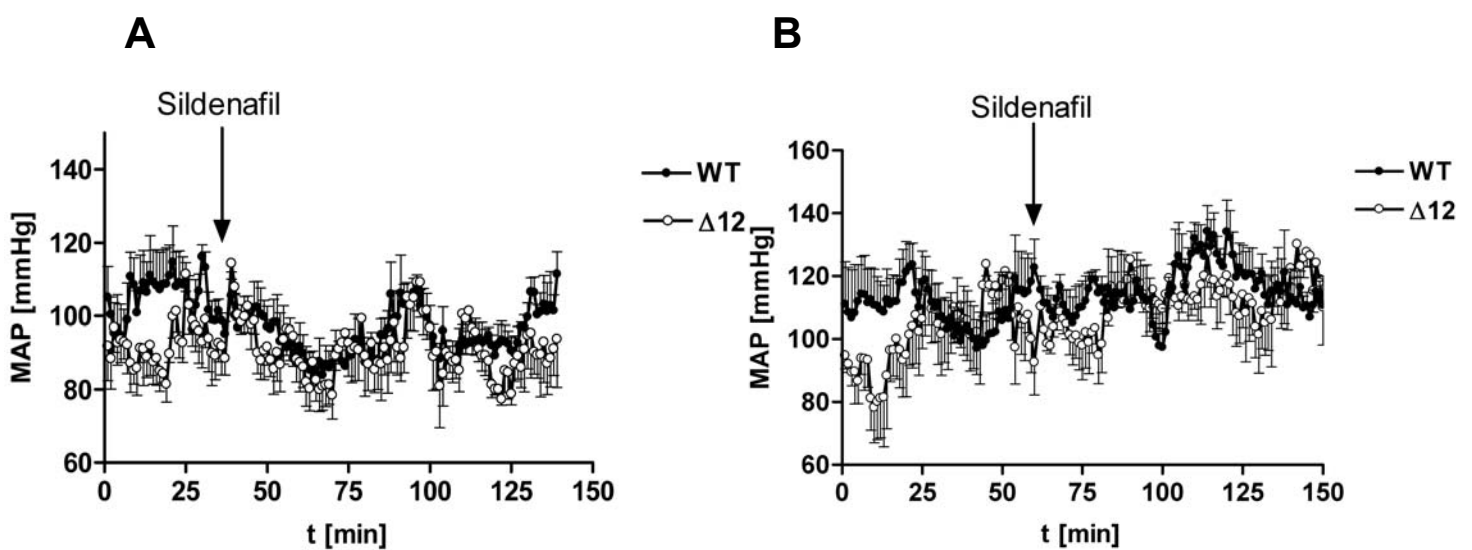


Abb. C-6: Effekt von Sildenafil auf den Blutdruck wacher, sich frei bewegender WT- und $\Delta 12$ -Mäuse.

A) Die Abbildung zeigt in Abhängigkeit der Zeit den MAP. Der schwarze Pfeil verdeutlicht den Zeitpunkt der Injektion von 15 $\mu\text{mol/kg}$ KG Sildenafilzitat. (n=6)

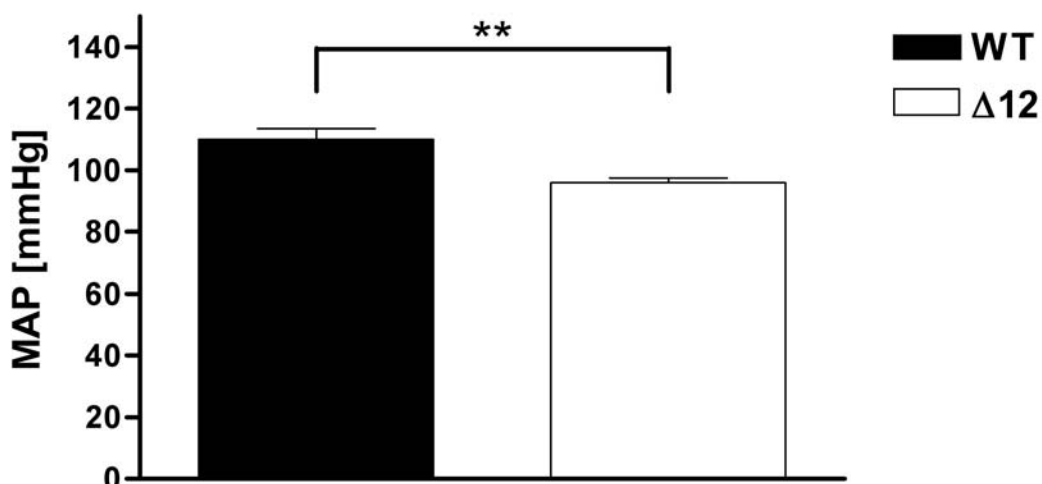
B) Analog zu A), jedoch wurden 30 $\mu\text{mol/kg}$ KG Sildenafilzitat injiziert.

C.1.5. Basaler Blutdruck

Bei der Ermittlung des Blutdrucks der Tiere über 24h, also über eine gesamte Licht- und Dunkelphase, zeigte sich, dass die Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen hypoton sind. Mittels Radiotelemetrie zeigte sich bei den beiden Genotypen ein signifikanter Unterschied im Blutdruck von $14,0 \pm 3,9$ mmHg. (Abb. C-7)

Bereits zuvor wurde eine tendenzielle, nicht signifikante Hypotonie bei einem kleinen Kollektiv dieser transgenen Tiere beschrieben. (Geiselhöringer et al., 2004b) Dabei wurde jedoch die „Tail-cuff-Plethysmographie“ als Methode verwendet, bei der bekannt ist, dass sie zu größeren Abweichungen bei der Blutdruckbestimmung führt. Außerdem sind Blutdruckmessungen über einen längeren Zeitraum mit dieser Methode per se nicht möglich. Mit Einführung der Telemetrie-Transmitter wurde daher diese Methode nahezu obsolet. (Van Vliet et al., 2000)

A



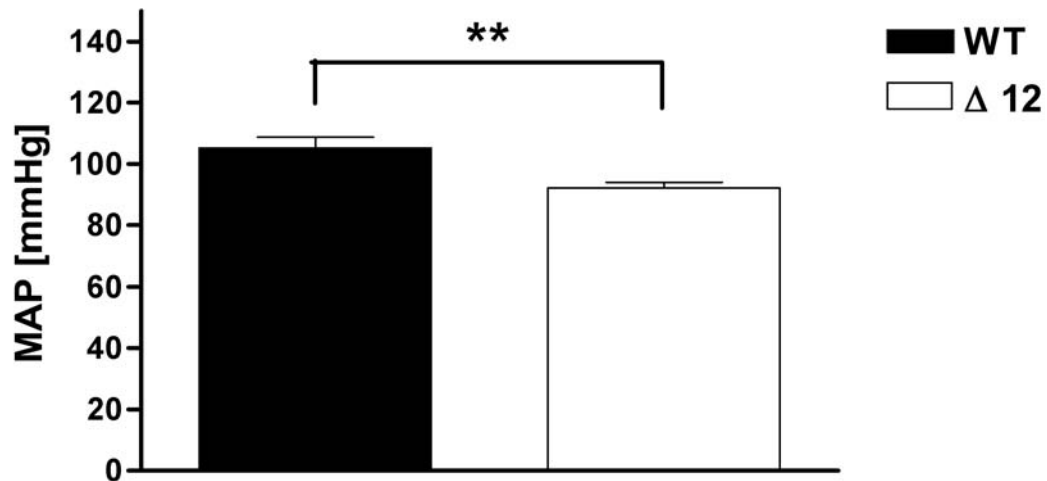
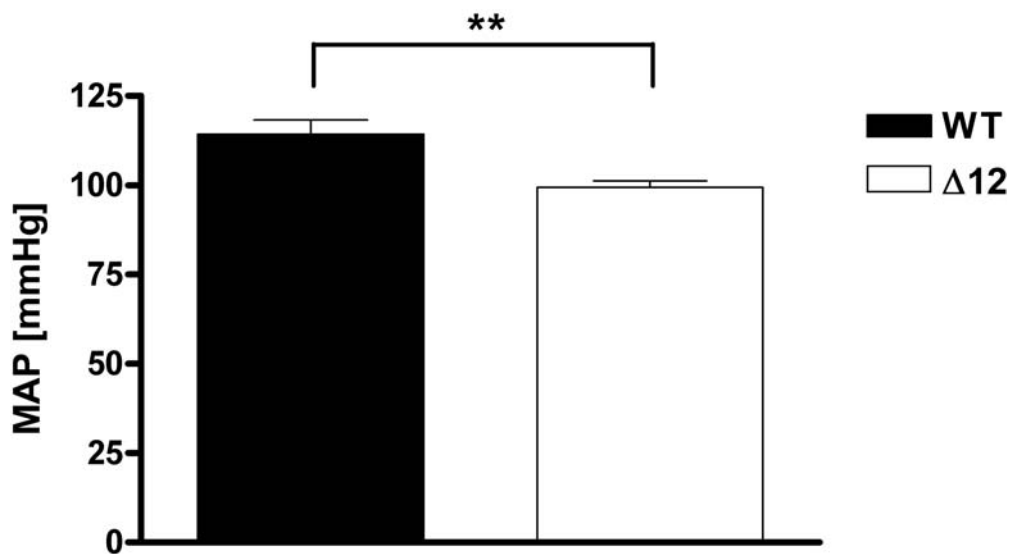
B**C**

Abb. C-7: Mittlerer arterieller Blutdruck wacher, sich frei bewogender WT- und $\Delta 12$ -Mäuse

A) Das Balkendiagramm zeigt den MAP gemittelt über eine volle Licht- und eine Dunkelphase (je 12 Stunden) von Kontrolltieren und $\Delta 12$ Mäusen. (n=6)

B) Dargestellt ist der mittlere arterielle Blutdruck gemittelt über eine volle Lichtphase (12 Stunden, n=6).

C) Gezeigt ist der MAP gemittelt über eine volle Dunkelphase (12 Stunden, n=6)

** (p<0,01)

C.1.6. Herzfrequenz-, Aktivitäts- und Pulsdruckmessung mit IRAG Deletionsmutanten und Kontrolltieren

Mithilfe der Radiotelemetrie-Transmitter war es gleichzeitig möglich den Pulsdruck, die Herzfrequenz und die Aktivität der Nager zu messen. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede bei den Basalwerten dieser Parameter gefunden wurden. (Abb. C-8, C-9)

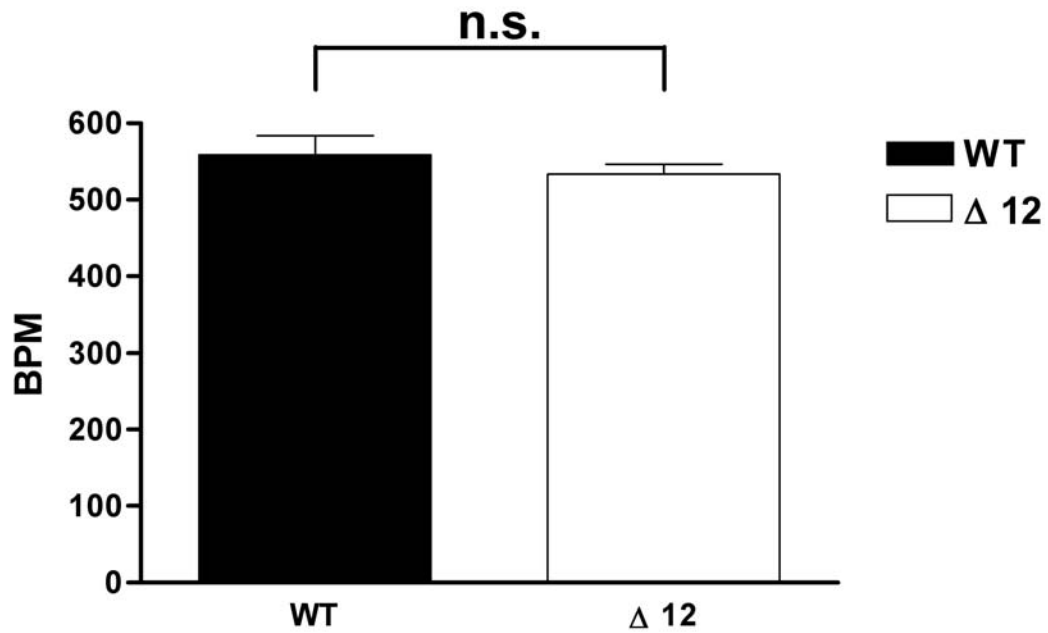
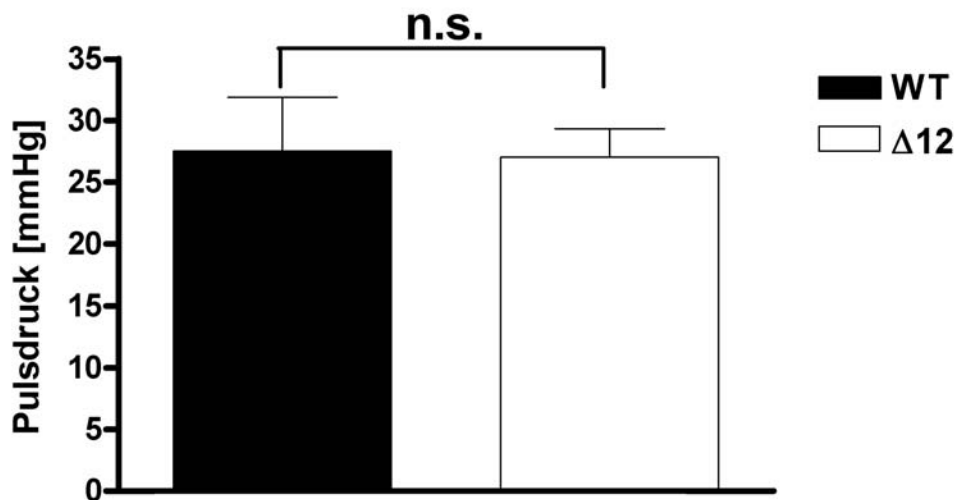
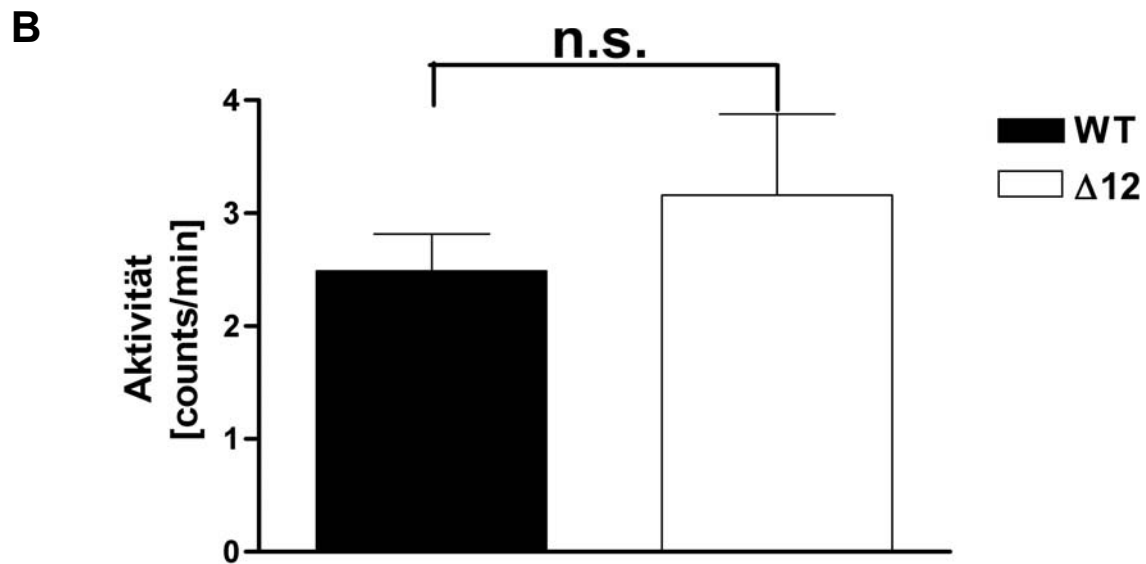
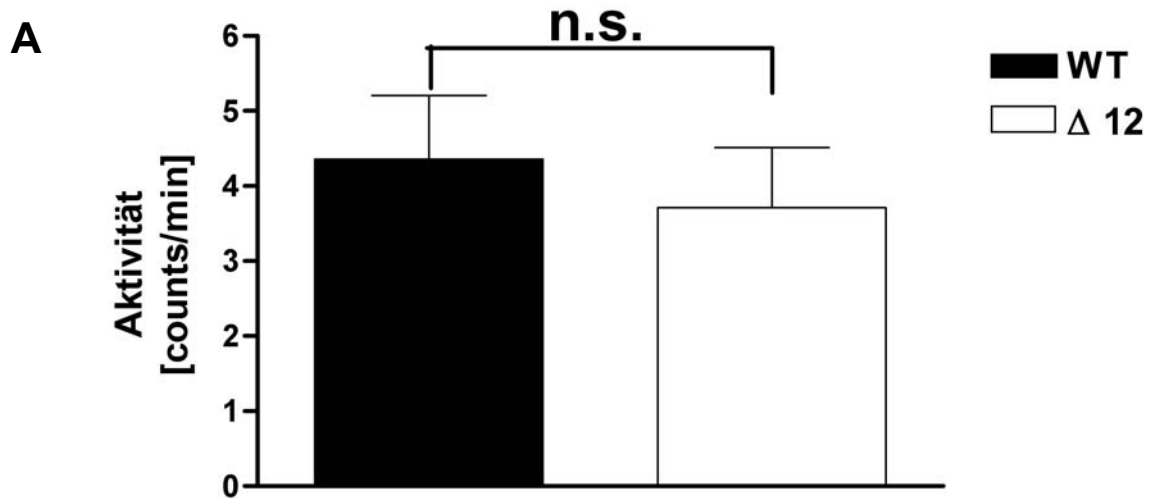
A**B**

Abb. C-8: Herzfrequenz und Pulsdruck von wachen, sich frei bewegenden WT- und $\Delta 12$ -Tieren

A) In dem Balkendiagramm ist die Herzfrequenz als Anzahl der Schläge pro Minute (BPM), gemittelt über eine volle Licht- und eine volle Dunkelphase gezeigt. (24 Stunden, n=6)

B) Die Abbildung zeigt während des gleichen Zeitabschnitts wie bei A) den Pulsdruck der entsprechenden Mäuse.

n.s.: nicht signifikant



C

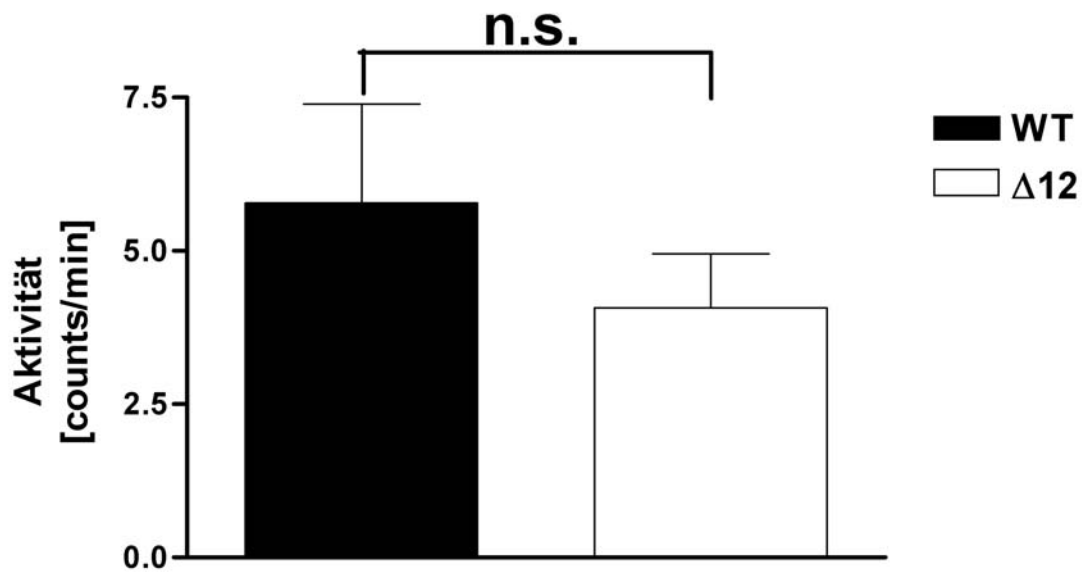


Abb. C-9: Lokomotorische Aktivitätsmessung von wachen, sich frei bewegenden WT- und $\Delta 12$ -Mäusen.

A) Die Abbildung zeigt die Aktivität der Genotypen in Form eines Balkendiagramms über eine gesamte Licht- und Dunkelphase. (24 Stunden) Die Aktivität wird in Form von arbiträren „counts per minute“ (innerhalb der zweidimensionalen Ebene der Empfänger-Platte) dargestellt. (n=6)

B) Das Balkendiagramm bildet die Aktivität analog zu A) ab, jedoch nur während der Lichtphase.

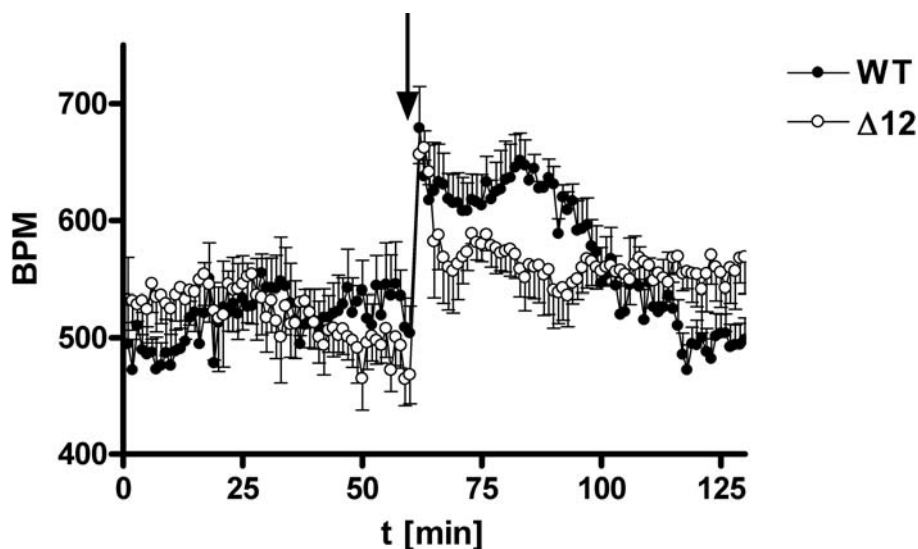
C) Gezeigt ist die gemittelte Aktivität (siehe A), gemittelt über die Dunkelphase.

n.s.: nicht signifikant

Da die NO vermittelte Blutdrucksenkung der IRAG $\Delta 12$ Tiere stark vermindert war, unterschied sich auch die durch den Blutdruckabfall induzierte reflektorische Tachykardie der beiden Mauslinien. (Siehe Abb. C-10)

SNP

A



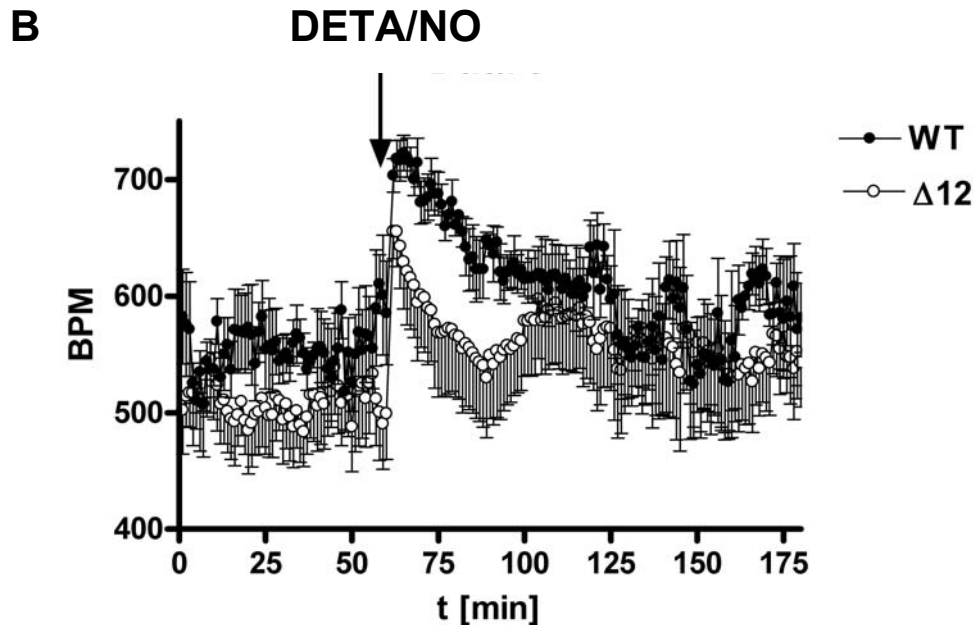


Abb. C-10: Reflextachykardie durch NO-Donatoren in wachen, sich frei bewegenden WT- und $\Delta 12$ -Mäusen.

A) Dargestellt ist der Verlauf der Herzfrequenz in einem Zeitabschnitt während der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt den Zeitpunkt der i.p. Applikation von $7\mu\text{mol/kg}$ KG SNP an. (n=6)

B) Gezeigt ist der Verlauf der Herzfrequenz in Abhängigkeit der Zeit während eines Abschnitts der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt die Applikation von DETA/NO ($370\mu\text{mol/kg}$ KG) an. (n=6)

C.1.7. Frequenzmessung mit isolierten Herzen von $\Delta 12$ und IRAG knockout Tieren mittels EKG-Transmittern

Frühere Untersuchungen an $\Delta 12$ Tieren mit EKG-Transmittern zeigten keinen Unterschied in der Frequenzmodulation durch Isoproterenol, Atropin oder α -Methoxamin (ein selektiver α_1 -Adrenozeptor Agonist). (Persönliche Mitteilung von Juliane Stieber).

In der Literatur wurde beschrieben, dass in neonatalen Myozyten von eNOS knockout Tieren die Reduktion der spontanen Herzfrequenz durch Carbachol ausblieb. (Feron et al., 1998) Auch konnte gezeigt werden, dass in ventrikulären Myozyten von eNOS KO Tieren die Reduktion des L-Typ Kalzium-Kanalstroms durch Carbachol ausblieb. (Han et al. 1998)

Um die Rolle von IRAG, als Bestandteil der Stickstoffmonoxid Signalkaskade, in der Carbachol-induzierten Frequenzreduktion zu klären, wurden Carbachol Dosiswirkungskurven an isolierten Herzen ermittelt.

Zwischen den Herzen von IRAG $\Delta 12$ Tieren und Wildtypen zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied bezüglich der Herzfrequenzen und der Frequenzmodulation mit Carbachol bzw. Isoprenalin. (Abb. C-11) Jedoch konnte wegen der geringen n-Zahl keine Aussage bezüglich der statistischen Signifikanz gemacht werden.

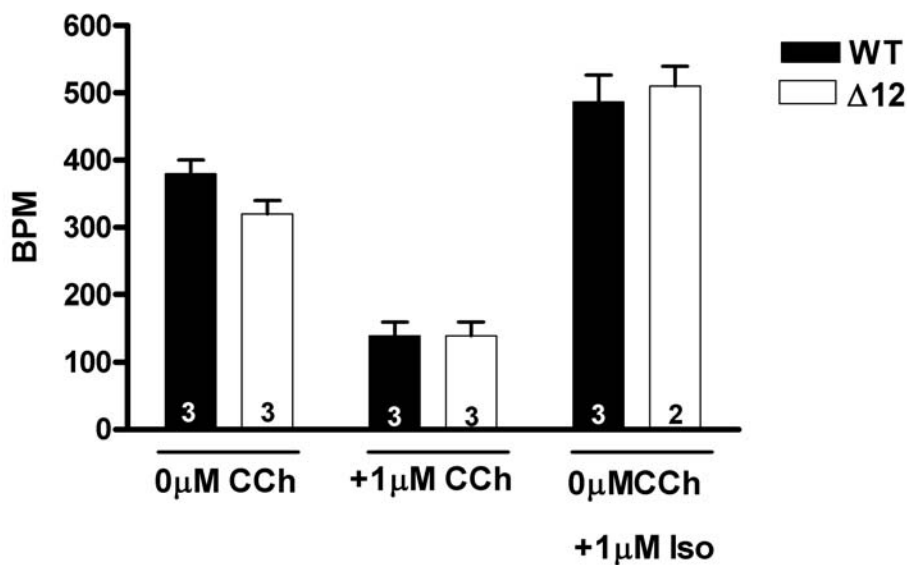


Abb. C-11: Herzfrequenz isolierter Herzen von WT- und $\Delta 12$ -Mäusen.

Abgebildet ist die basale Frequenz pro Minute (linke Balken) von Wildtyp, IRAG knockout und IRAG $\Delta 12$ Mäuseherzen bei Perfusion mit physiologischem Puffer. Bei Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Carbachol (CCh) im Perfusat reduziert sich die Herzfrequenz im gleichen Umfang. (mittlere Balken)

Die rechten Balken zeigen die durch $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin (Iso) ausgelöste Tachykardie.

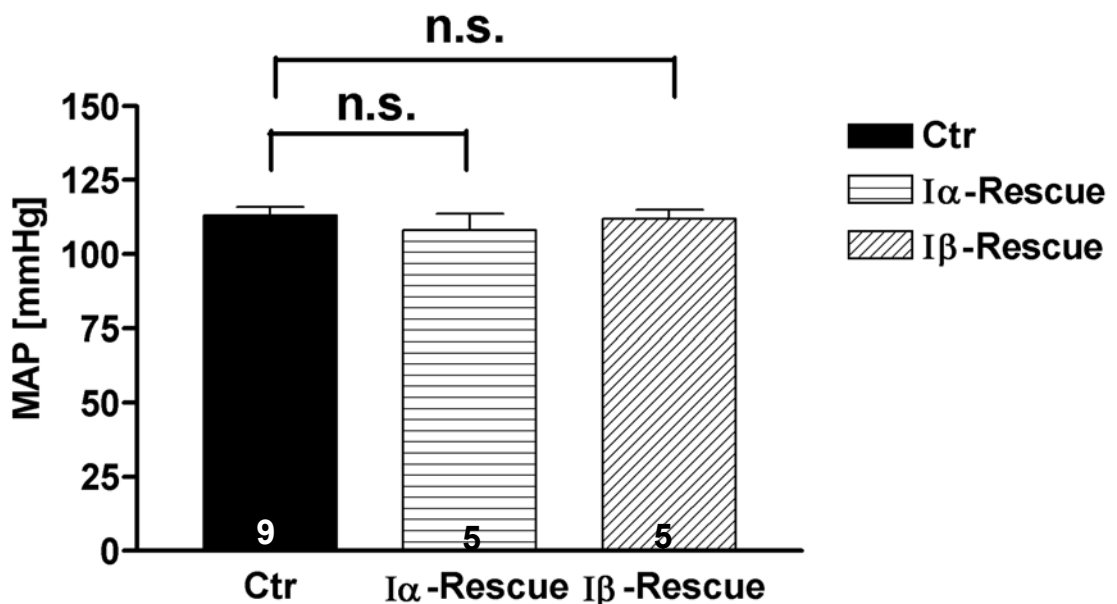
Die n-Zahlen sind innerhalb der Balken angegeben.

C.2. Telemetrie Experimente mit cGKI α und cGKI β „Rescue“ Mäusen

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass IRAG spezifisch mit der Isoform I β der Proteinkinase G (cGKI β) interagiert und durch dieses Enzym phosphoryliert wird. (Antl et al., 2007 Ammendola et al., 2001; Casteel et al., 2005) Die hier gezeigten Untersuchungen mit $\Delta 12$ unterstreichen die bedeutende Rolle von IRAG in dem

NO/cGKI β -Signalweg bei der Vasodilatation und Blutdruckregulation. Damit stellt sich aber die Frage ob und welche Rolle die cGKI α bei der NO vermittelten Blutdrucksenkung spielt. In glatten Muskelzellen von cGKI-defizienten Mäusen konnte nämlich gezeigt werden, dass die gestörte Kalziumregulation nur durch Transfektion mit cGKI α , nicht aber mit I β wiederhergestellt werden konnte. (Feil et al., 2003) Die Autoren folgerten daher, dass die I β -Isoform für die Proliferation von glatten Muskelzellen verantwortlich sein könnte, beziehungsweise für die Differenzierung oder Genexpression.

Um die Bedeutung der cGKI α und cGKI β in glatten Muskelzellen zu klären wurden zwei „Rescue“ Mauslinien generiert. Diese sind cGKI knockout Mäuse, die jeweils eine Isoform der cGKI im glatten Muskelzellen exprimieren. (Weber et al. 2007) An diesen Mausmodellen wurden analog zu den Untersuchungen der IRAG Deletionsmutante mittels Radiotelemetrie der MAP und die Herzfrequenz analysiert und NO-Donatoren, Carbachol bzw. der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 i.p. appliziert.

A

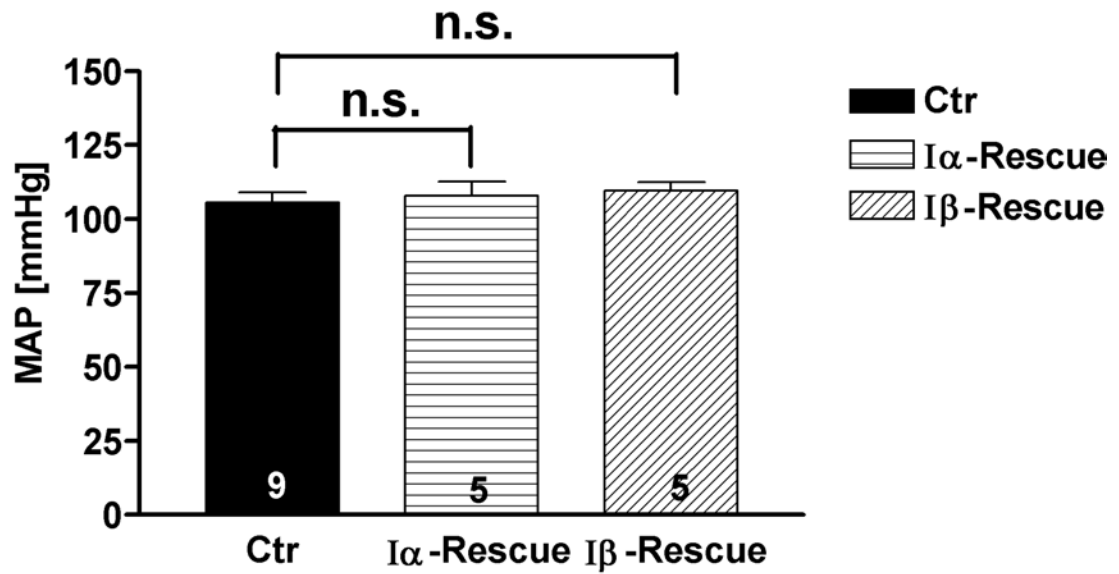
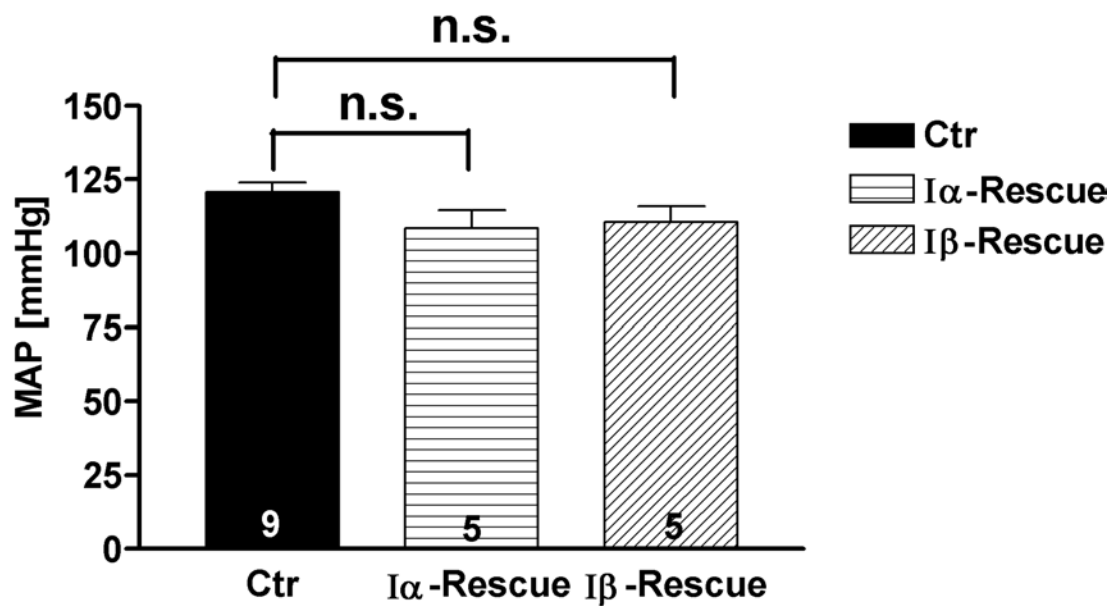
B**C**

Abb. C-12: Basaler Blutdruck von wachen, sich frei bewegenden I α - und I β -Rescues.

A) Gezeigt ist der MAP der beiden Rescue-Linien im Vergleich zu den Kontrolltieren, gemittelt über eine vollständige Licht- und Dunkelphase (24 Stunden, n=9 für die Kontrolltiere, n=5 für die transgenen Tiere).

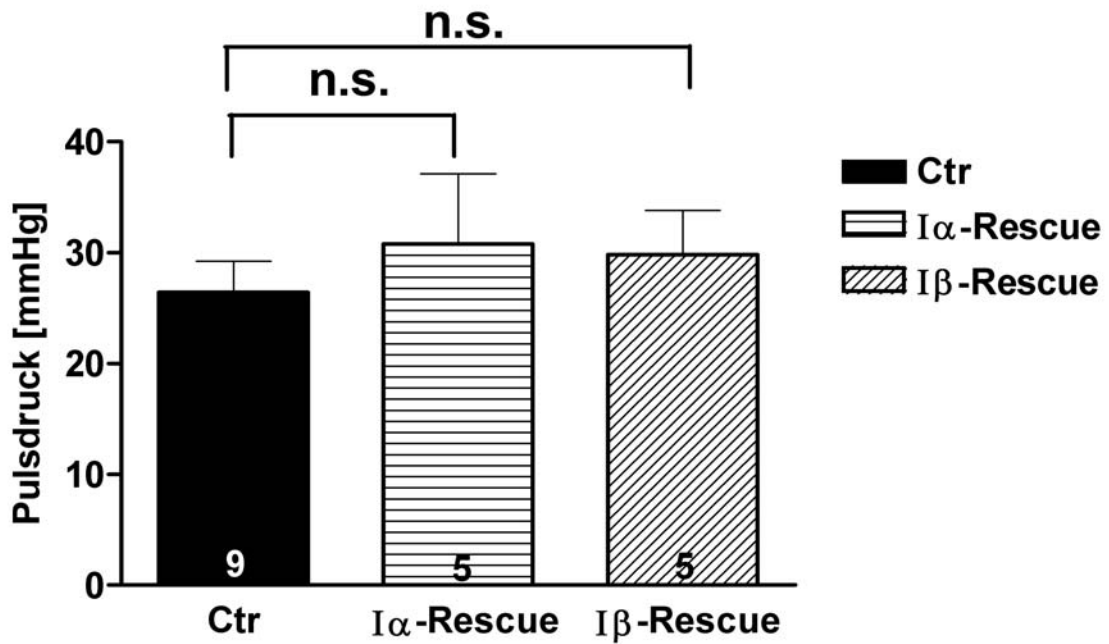
B) Dargestellt ist der MAP gemittelt über die entsprechenden Lichtphase.

C) Die Abbildung zeigt den MAP gemittelt über die entsprechende Dunkelphase.

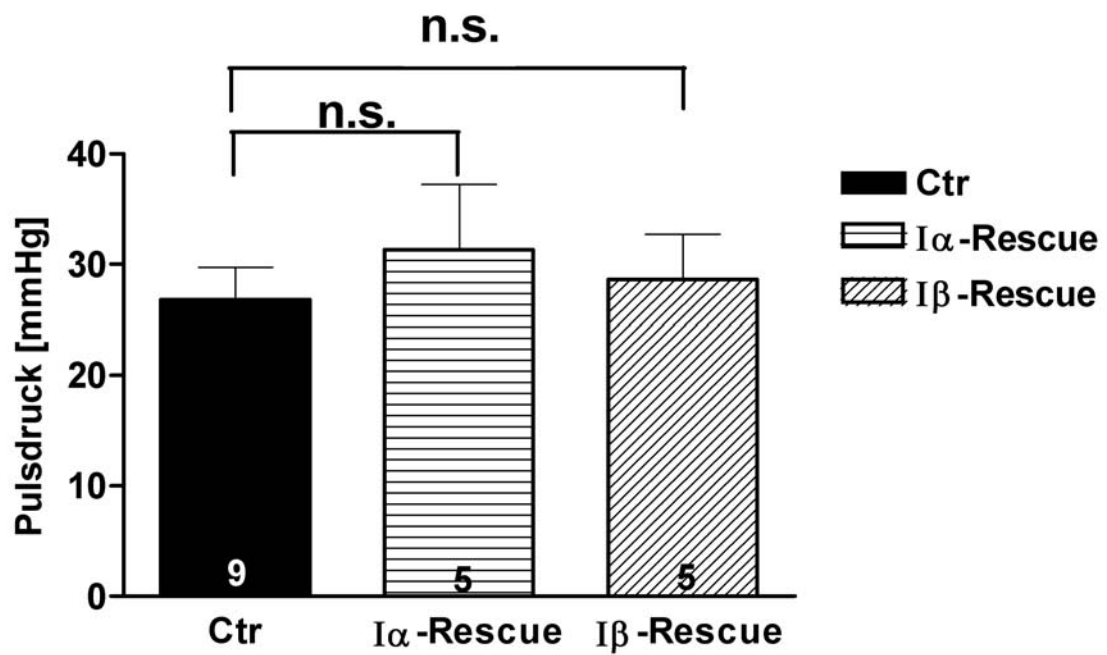
n.s.: nicht signifikant

Der basale Blutdruck und der Pulsdruck war in beiden Rescue Mauslinien im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert.

A



B



C

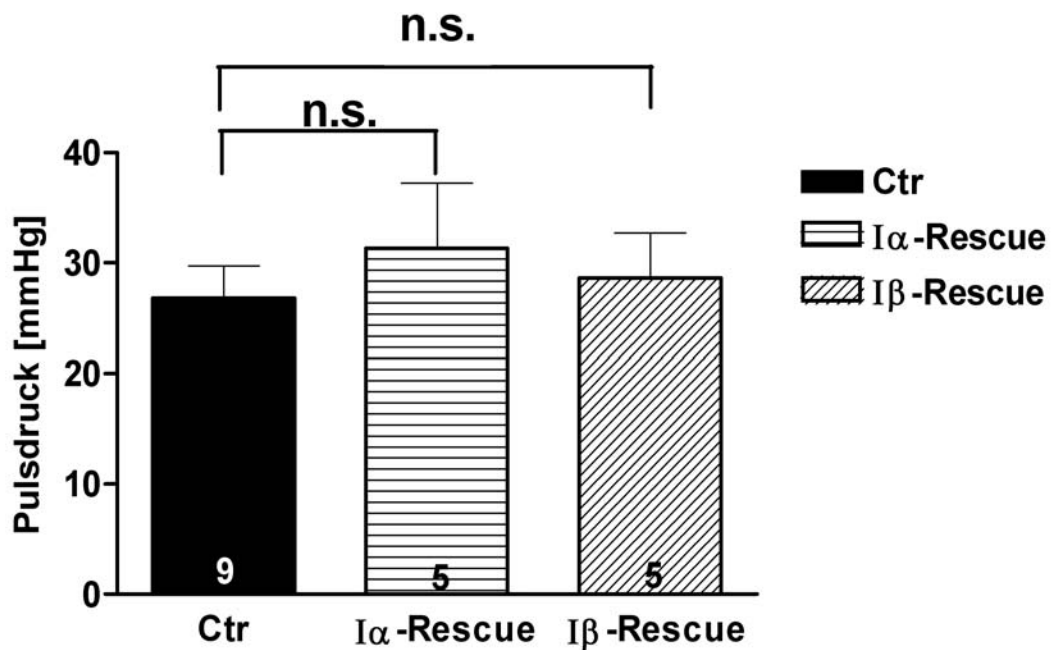


Abb. C-13: Pulsdruckmessung von wachen, sich frei bewegendem I α - und I β -Rescues.

A) Das Balkendiagramm zeigt den Pulsdruck im mmHg gemittelt über eine volle Licht- und Dunkelphase.(24 Stunden)

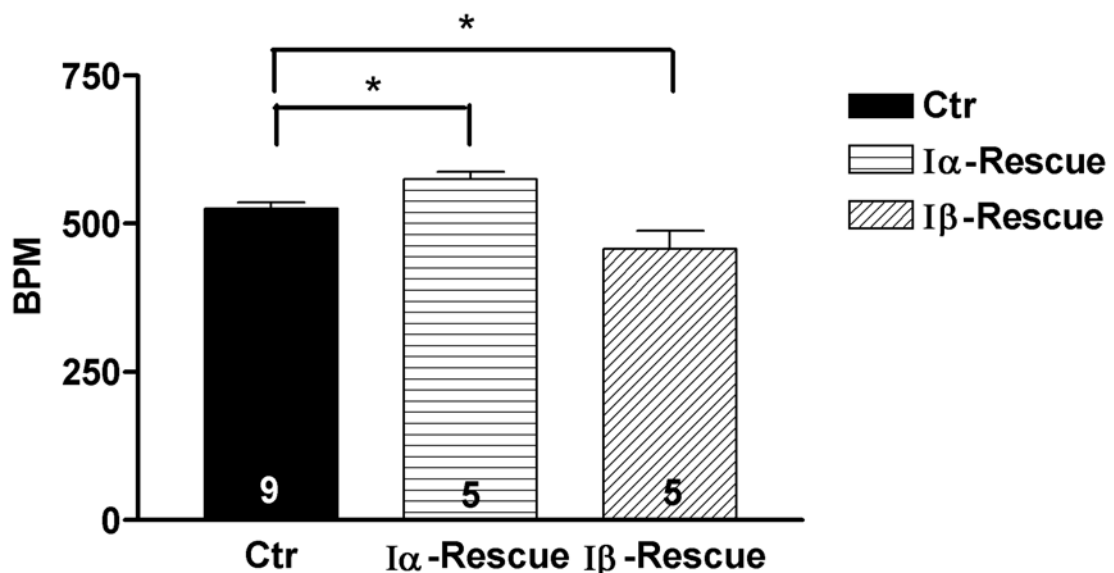
B) Dargestellt ist die entsprechende Lichtphase von A).

C) Die Abbildung zeigt die entsprechende Dunkelphase von A).

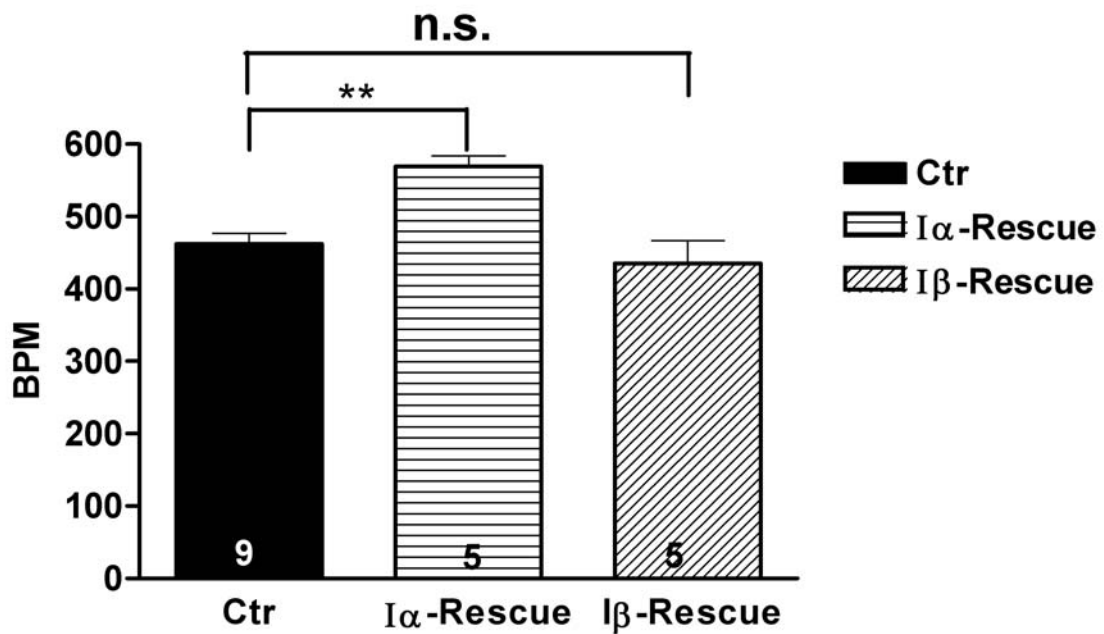
n.s.:nicht signifikant

Die gemittelte Herzfrequenz pro Minute, gemittelt über 24 Stunden, war hingegen in beiden Linien im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verändert. Bei den I α -„Rescue“ Mäusen war die Frequenz gemittelt über 24 Stunden signifikant erhöht. Dieser Unterschied war auf die erhöhte Herzfrequenz tagsüber im Vergleich zum WT zurückzuführen. Dagegen war die Frequenz weder nachts noch gemittelt über 24h signifikant unterschiedlich.

A



B



C

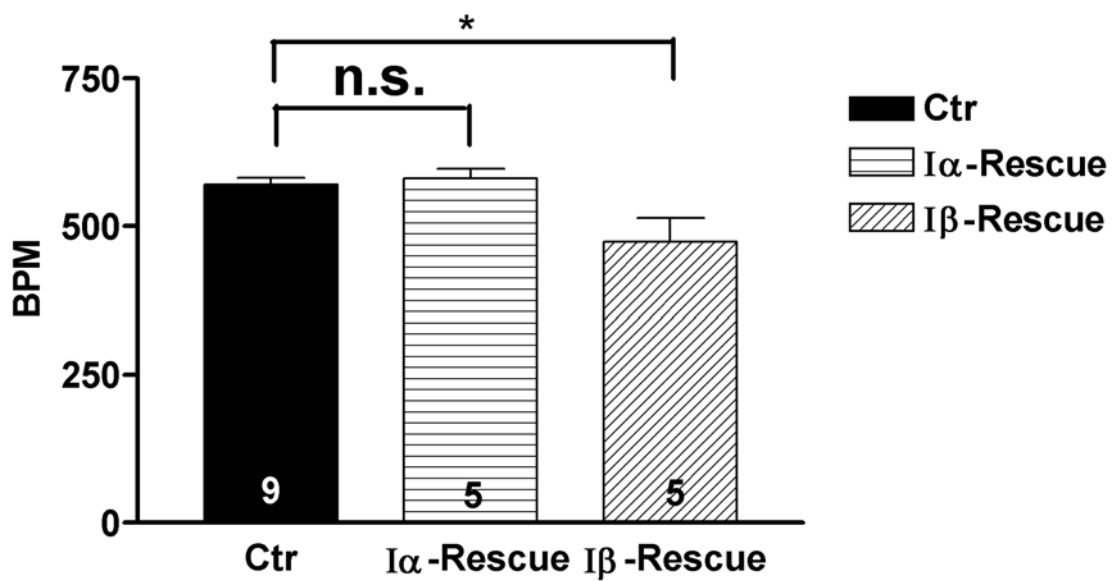


Abb. C-14: Herzfrequenzmessung von wachen, sich frei bewegenden I α - und I β -Rescues.

A) Das Balkendiagramm zeigt die BPM gemittelt über eine volle Licht- und Dunkelperiode 24 Stunden, n=9 für die Kontrolltiere, n=5 für die transgenen Tiere)

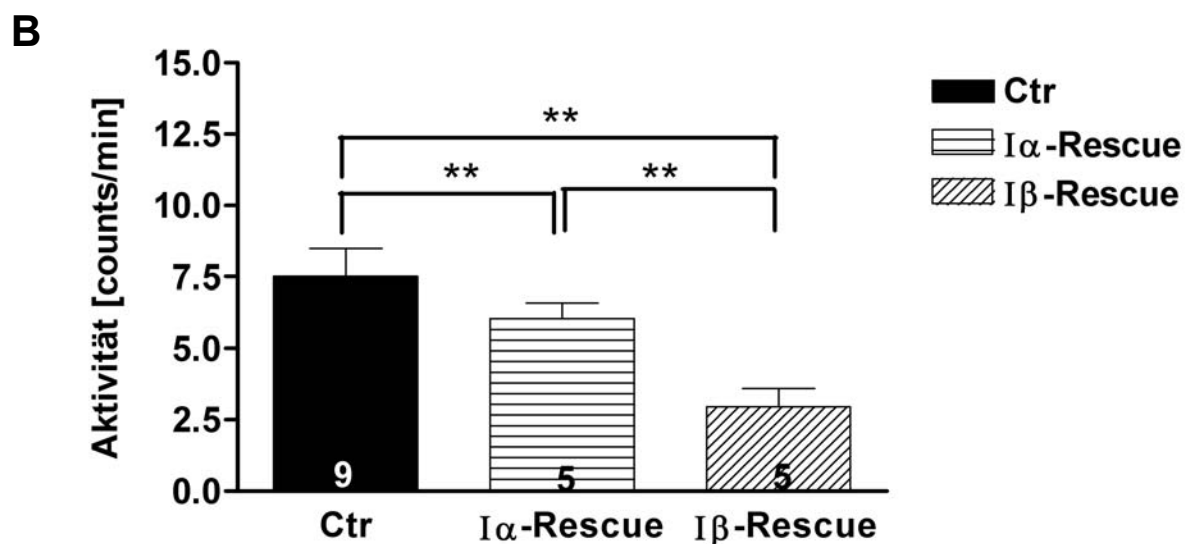
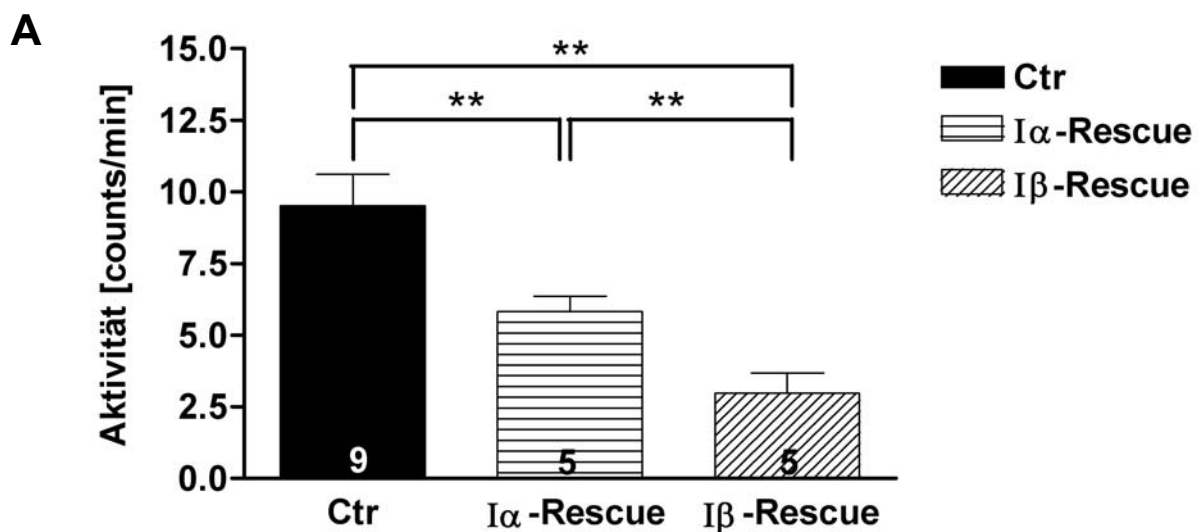
B) Dargestellt ist die Herzfrequenz gemittelt über die entsprechende Lichtphase zu A).

C) Gezeigt sind die BPM der von A) entsprechenden Dunkelphase.

*(p<0,05); **(p<0,01); n.s.: nicht signifikant

Im Gegensatz dazu zeigten die $I\beta$ -Rescue Tiere eine signifikante Bradykardie, sowohl über 24 Stunden, als auch in der Dunkelphase. Während der Lichtphase fand sich kein Unterschied in der Schlagfrequenz zwischen den $I\beta$ -Rescues und den Wildtyp Tieren.

Die Aktivitäten der beiden transgenen Mauslinien war signifikant erniedrigt, sowohl nachts als auch tags. Während die $I\alpha$ -„Rescues“ eine um etwa 50% verringerte Aktivität gemittelt über 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen, war die Aktivität der $I\beta$ -„Rescues“ um 75% verringert.



C

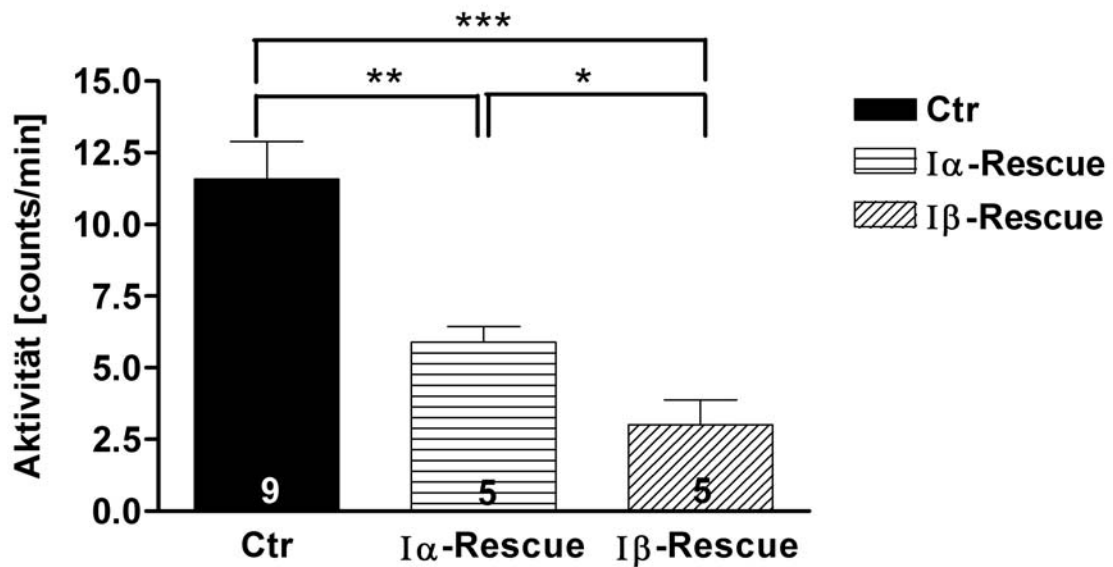


Abb. C-15: Aktivitätsmessung von I α - und I β -Rescues.

A) Die Abbildung zeigt die Aktivität der Genotypen in Form eines Balkendiagramms über eine gesamte Licht- und Dunkelphase. (24Stunden) Die Aktivität wird in Form von arbiträren „counts per minute“ (innerhalb der zweidimensionalen Ebene der Empfänger-Platte) dargestellt. (n=6)

B) Das Balkendiagramm bildet die Aktivität analog zu A) ab, jedoch nur während der Lichtphase.

C) Gezeigt ist die gemittelte Aktivität (siehe A), gemittelt über die Dunkelphase.

* (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001); n.s.: nicht signifikant

Interessanterweise variierte die Aktivität in beiden Mauslinien nicht abhängig vom Aussenlicht. Dies deutet auf einen gestörten Schlaf-Wach-Rhythmus hin. Bei den Kontrolltieren zeigte sich eine tagsüber signifikant geringere Aktivität, was für die nachtaktiven Nager typisch ist.

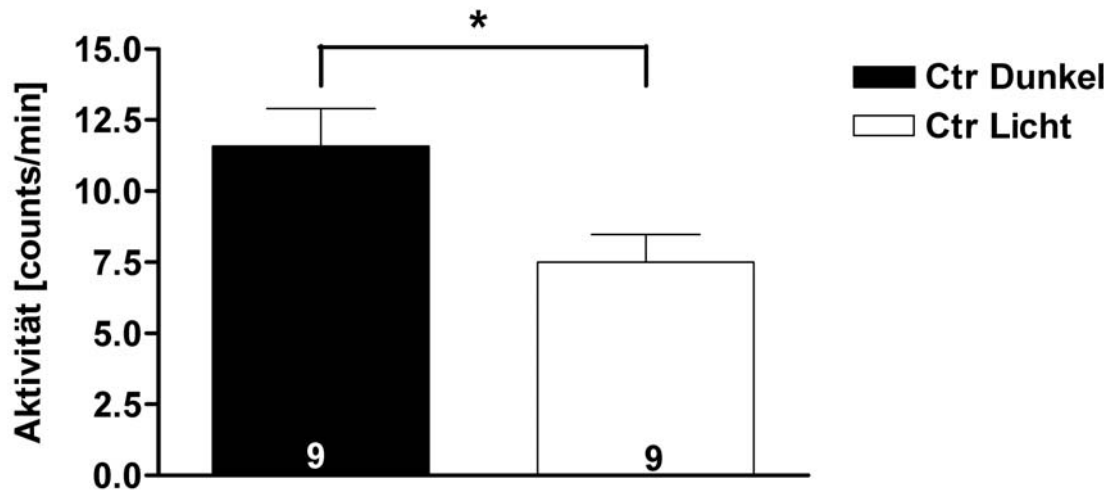


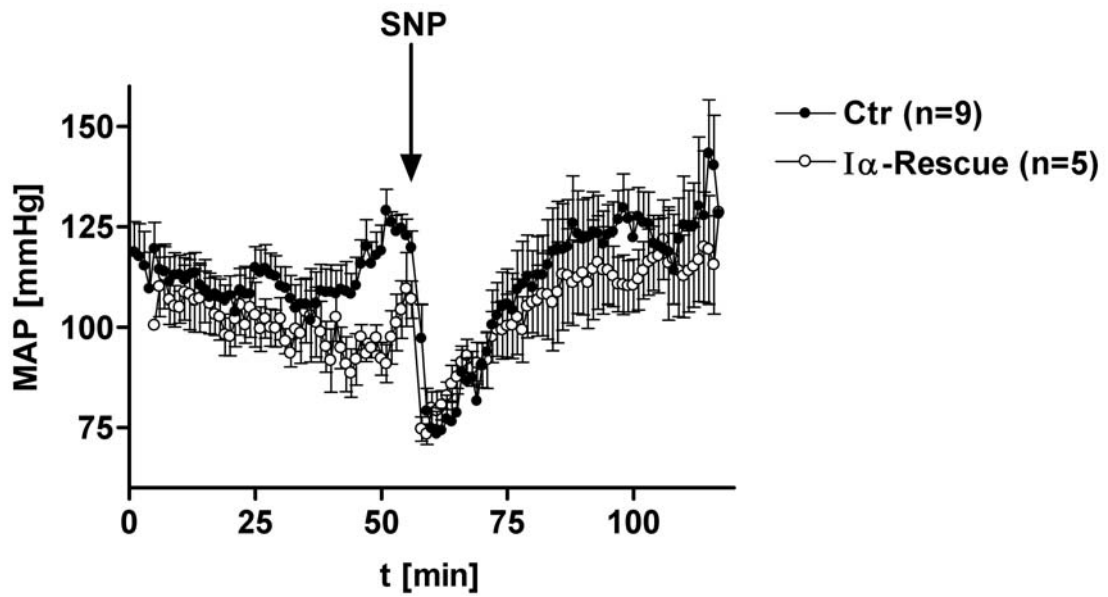
Abb. C-16: Aktivitätsmessung von wachen sich frei bewegenden Wildtyptieren.

Das Balkendiagramm zeigt den Unterschied in der Aktivität von Kontrolltieren während einer vollen Lichtphase und Dunkelphase. (jeweils 12 Stunden, n=9)

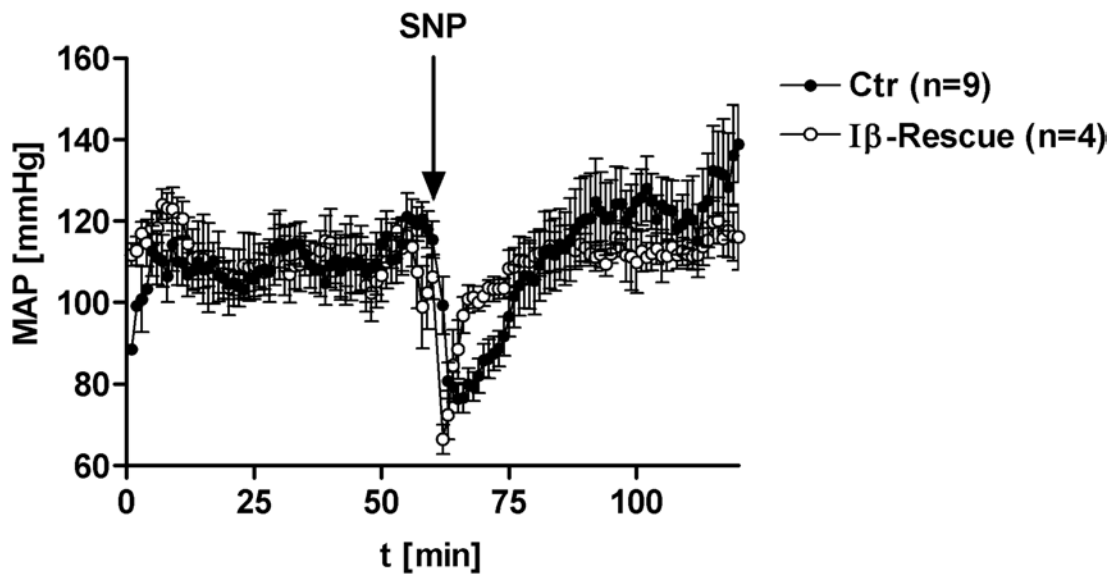
*($p < 0,05$)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Injektionen von verschiedenen NO-Donatoren (SNP und DETA/NO) gezeigt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, mit den verwendeten Boli an NO-Donatoren, in beiden „Rescue“ Linien Blutdruckabfall im gleichen Umfang wie bei den Kontrolltieren erfolgt.

A



B



C

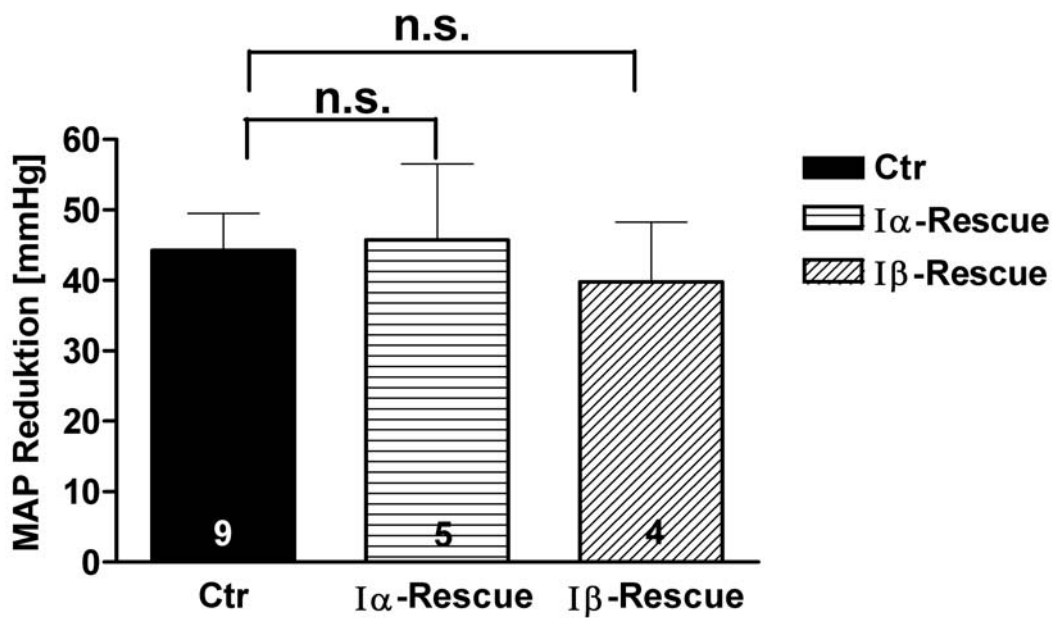


Abb. C-17: Blutdruckabfall durch 7 $\mu\text{M}/\text{kg}$ KG SNP in wachen, sich frei bewegenden $\text{I}\alpha$ - und $\text{I}\beta$ -Rescues.

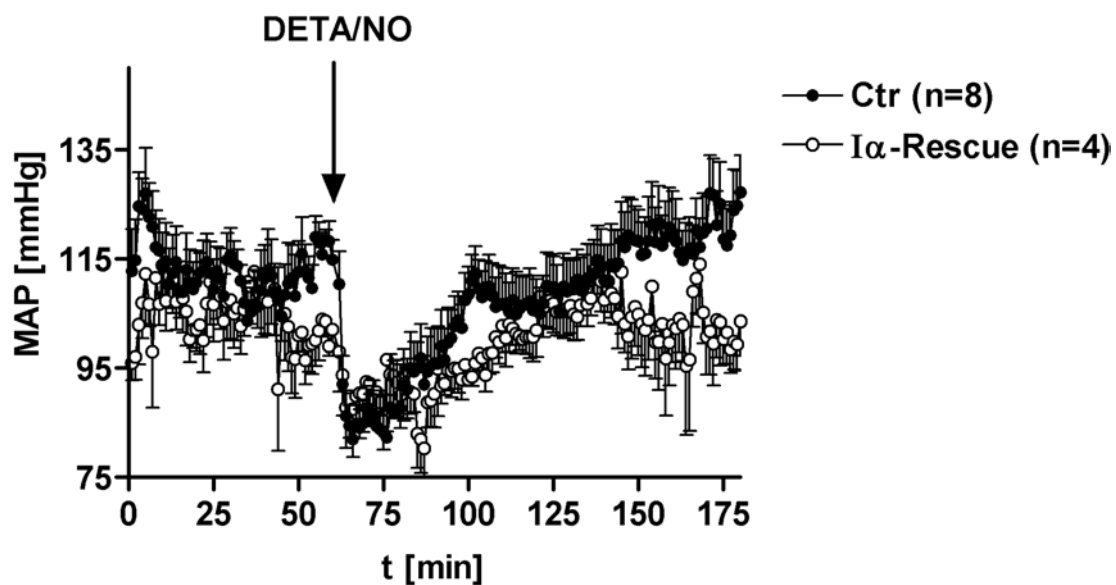
A) Gezeigt ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks in Abhängigkeit von der Zeit während eines begrenzten Abschnitts der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt die Applikation von SNP 7 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KG an. (n=9 für die Kontrolltiere, n=5 für die $\text{I}\alpha$ -„Rescues“)

B) Analog zu A) (n=4 für die $\text{I}\beta$ -„Rescues“)

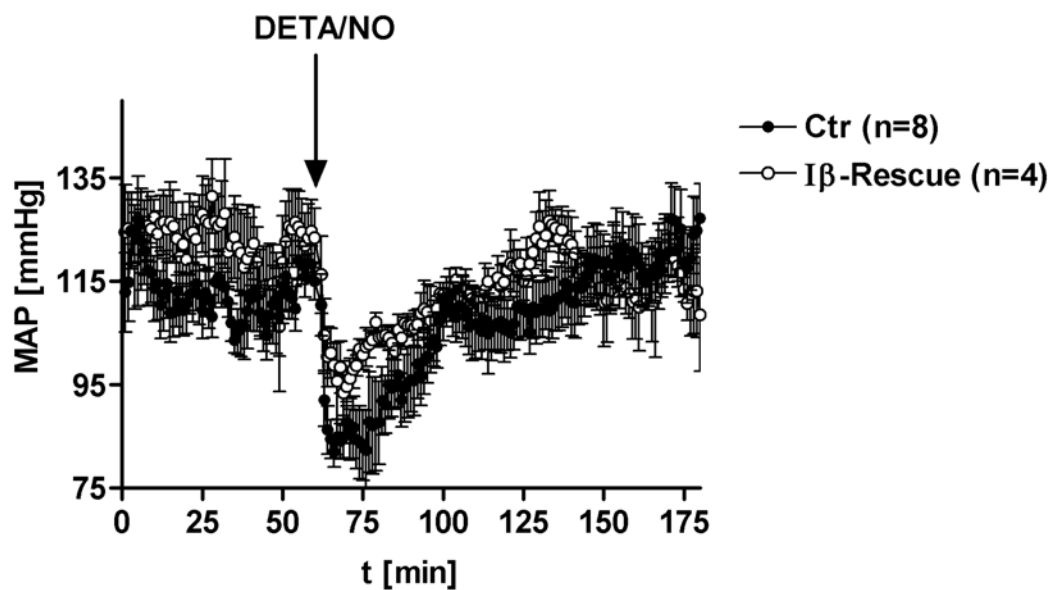
C) Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert der Blutdruckreduktionen in A) und B) durch SNP in mmHg.

*($p < 0,05$); n.s.: nicht signifikant

A



B



C

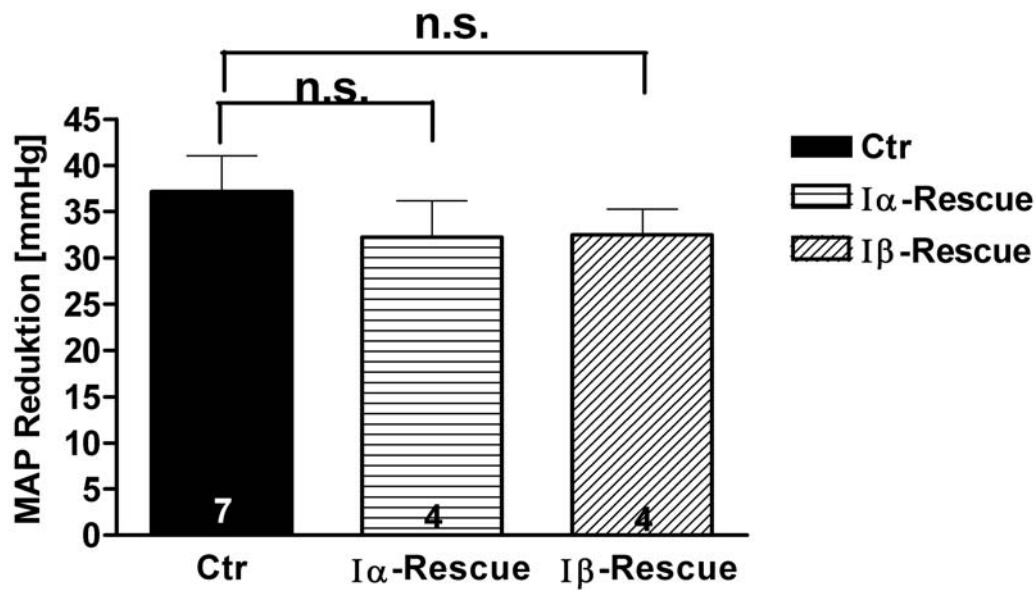


Abb. C-18: Blutdruckabfall durch DETA/NO in I α - und I β -Rescues.

A) Gezeigt ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks in Abhängigkeit von der Zeit während eines begrenzten Abschnitts der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt die Applikation von DETA/NO (370 μ mol/kg KG) an. (n=7 für die Kontrolltiere, n=4 für die I α -„Rescues“)

B) Analog zu A). (n=7 für die Kontrolltiere, n=4 für die I β -„Rescues“)

C) Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert der Blutdruckreduktionen in A) und B) durch DETA/NO in mmHg.

n.s.: nicht signifikant

Die nach Injektion der NO-freisetzenden Pharmaka erfolgende Reflextachykardie war in keiner der Mauslinien unterschiedlich. (nicht gezeigt)

Carbachol, ein Muskarinrezeptoragonist, bewirkt durch Stimulation endothelialer M₃-Rezeptoren nicht nur eine vermehrte Stickstoffmonoxid-Bildung, sondern auch eine Freisetzung von EDHF („endothelium derived hyperpolarizing factor“), welcher über einen alternativen, noch nicht genau aufgeklärten Mechanismus ebenfalls zu einer Vasorelaxation führt. Am Herzen bewirkt Carbachol durch Stimulation von M₂-Rezeptoren eine Bradykardie.

Der Verlauf des MAP nach i.p. Injektion von Carbachol ist in Abb. C-19 dargestellt.

Weder das Ausmaß der Blutdrucksenkung, noch die Bradykardie (nicht gezeigt) war signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren verschieden.

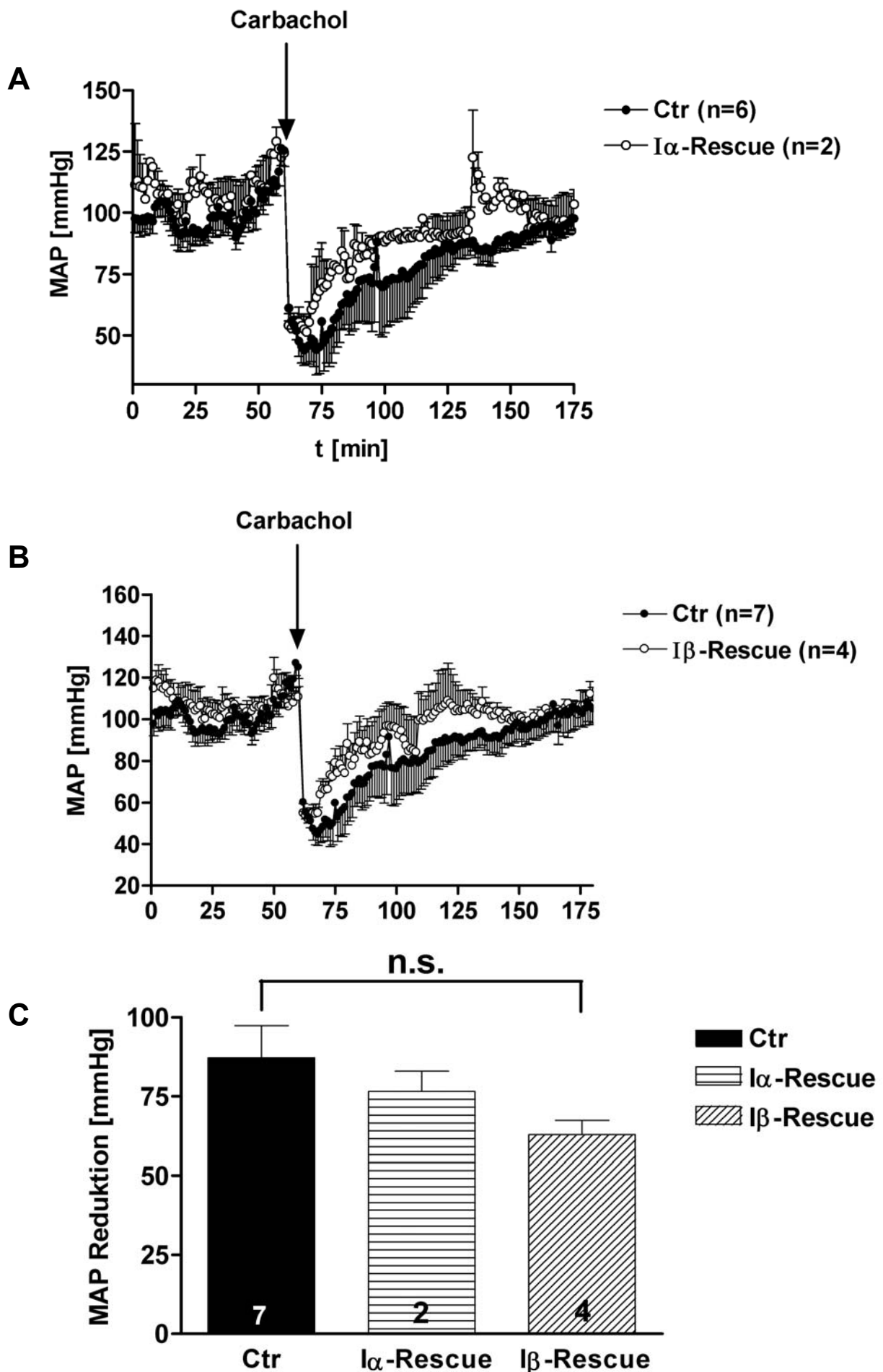


Abb. C-19: Effekt von Carbachol auf den MAP von wachen, sich frei bewegenden $I\alpha$ - und $I\beta$ -Rescues.

A) Gezeigt ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks in Abhängigkeit von der Zeit während eines begrenzten Abschnitts der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt die Applikation von $5,5 \mu\text{mol/kg KG}$ an. (n=7 für die Kontrolltiere, n=2 für die $I\alpha$ -„Rescues“)

B) Analog zu A). (n=7 für die Kontrolltiere, n=4 für die $I\beta$ -„Rescues“)

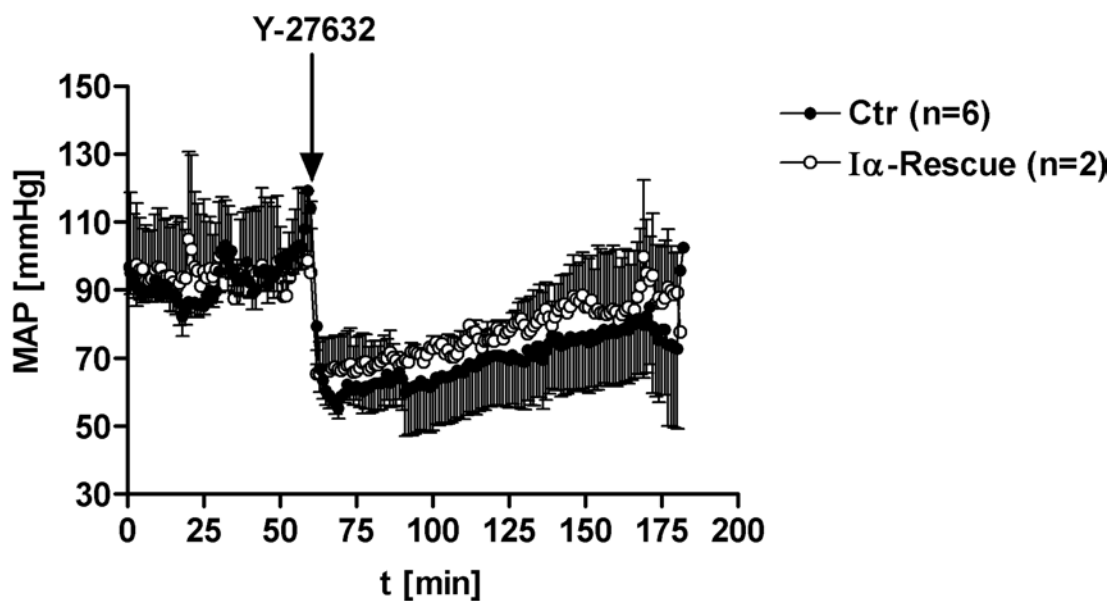
C) Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert der Blutdruckreduktionen in B) durch Carbachol in mmHg.

n.s.: nicht signifikant

Eine Zielstruktur der $c\text{GKI}\alpha$ ist die regulatorische Untereinheit der Myosinphosphatase MYPT1. Diese Phosphorylierung am Serin-Rest 695 verhindert die Phosphorylierung durch die Rho-Kinase am benachbarten Threonin 696 und bewirkt auf diesem Weg eine Relaxierung der glatten Muskulatur und damit einen Blutdruckabfall.

Durch diese Vernetzung der beiden Signalwege (NO/ $c\text{GKI}\alpha$ einerseits und RhoA-Rho-Kinase andererseits) wäre eine verändertes „signalling“ in der Rho-Kinase Signalkaskade denkbar. Deshalb wurde den „Rescue“-Tieren der Rho Kinase Inhibitor Y-27632 intraperitoneal verabreicht. Keine der beiden verwendeten transgenen Mauslinien verhielt sich im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant unterschiedlich.

A



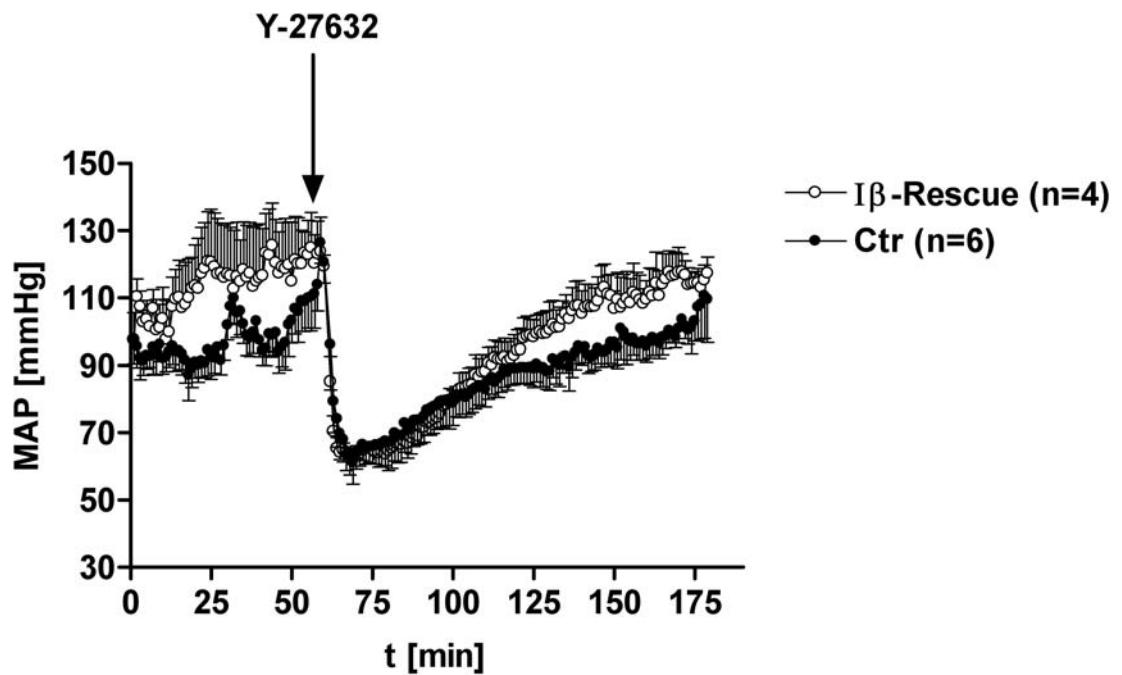
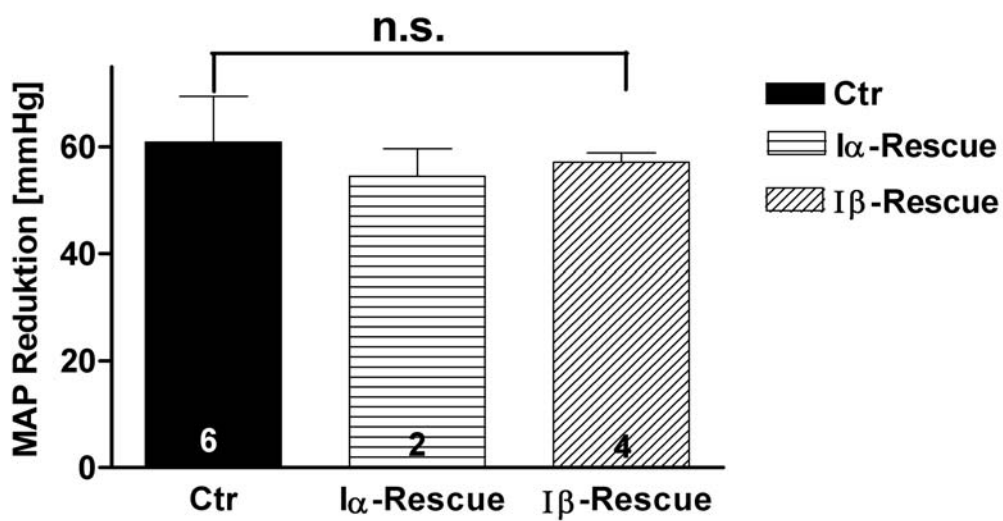
B**C**

Abb. C-20: Effekt von Y-27632 auf den Blutdruck wacher, sich frei bewogender I α - und I β -Rescues.

A) Gezeigt ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks in Abhängigkeit von der Zeit während eines begrenzten Abschnitts der Lichtphase. Der schwarze Pfeil zeigt die Applikation von 31,2 μ mol/kg KG an. (n=6 für die Kontrolltiere, n=2 für die I α -„Rescues“)

B) Analog zu A). (n=6 für die Kontrolltiere, n=4 für die I β -„Rescues“)

C) Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert der Blutdruckreduktionen in B) durch Y-27632 in mmHg. n.s.: nicht signifikant

D. Diskussion

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei der Regulation des Blutdrucks und bei der Genese vieler Erkrankungen. (Barbato and Tzeng, 2004; Benjamin and Vane, 1996; Pacher et al., 2007; Vanhoutte, 2006; Vanhoutte et al., 2005)

Die hauptsächliche Quelle der vaskulären NO Synthese ist die endotheliale NO-Synthase. Durch reaktive Sauerstoff Spezies wird Tetrahydrobiopterin, ein essentieller Cofaktor der Stickstoffmonoxid Produktion, oxidiert. Dies führt zum „Uncoupling“, dem Abkoppeln der Hyperoxid-Radikal Synthese (veraltet: Superoxid-Radikal) von der eigentlichen NO Produktion und damit zu einer kontinuierlichen Entstehung von Radikalen einerseits und zum Erliegen der NO Synthese andererseits. Dieser Pathomechanismus wird als prädisponierender Faktor für Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Arteriosklerose und der Hypertonie diskutiert. (Förstermann, 2006; Li and Förstermann, 2000)

D.1. Die Rolle von IRAG im vaskulären glatten Muskel

In vivo und in vitro Experimente mit entsprechenden Mausmodellen konnten sowohl die sGC (Friebe et al., 2007) als auch die cGKI (Pfeifer et al., 1998) als essentielle Bestandteile der NO vermittelten Vasorelaxation identifizieren. Interessanterweise ist die von anderen Arbeitsgruppen gezeigte sGC unabhängige Vasodilatation durch S-Nitrosylierung von Proteinen bei physiologischen NO Konzentrationen in Aorten von sGC knockout Mäusen nicht zu beobachten (genauer: knockout der für die Funktion der sGC essentiellen β_1 -Untereinheit; von den Autoren auch als NO-GC knockout bezeichnet: Friebe et al. 2007)

Die genaue Bedeutung von IRAG im vaskulären System, als Bestandteil dieses Signalwegs war bisher unbekannt.

Die Untersuchung der isolierten *A. tibialis* zeigte klar die Auswirkung der Deletion des Exons 12 des IRAG Gens. Die durch NO ausgelöste Vasodilatation war stark eingeschränkt.

Im Hinterbeinperfusionsmodell, das im Gegensatz zum erwähnten „Quasi-Widerstandsgefäß“ den Vorteil besitzt die Reaktion aller kleinen Gefäße in den Hinterbeinen der Maus zu erfassen, konnte dieser Effekt der Deletion ebenfalls beobachtet werden. Das Ausmaß der eingeschränkten Antwort auf NO freisetzende Pharmaka war hier sogar noch ausgeprägter.

Analoge Ergebnisse lieferten Kraftmessungen mit isolierten Aorten und Muskelpräparate aus dem Kolon von IRAG $\Delta 12$ Mutanten. Messungen an mit Fura-2 beladenen kultivierten Aortenzellen von $\Delta 12$ Mäusen zeigten, dass der Kalzium-Ausstrom aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums sich nicht durch Aktivierung der cGKI unterdrücken ließ. (Geiselhöringer et al., 2004b) Durch die in vivo Blutdruckmessung im Rahmen dieser Arbeit unter für die Tiere stressfreien Bedingungen im gewohnten Umfeld bei voller Bewegungsfreiheit konnte ebenfalls die kaum vorhandene Vasorelaxierung durch NO freisetzende Substanzen in den IRAG $\Delta 12$ Mäusen gezeigt werden.

Somit scheint die durch Stickstoffmonoxid ausgelöste Vasodilatation überwiegend über die cGMP abhängige Kinase $I\beta$ und IRAG abzulaufen, wobei die Interaktion von IRAG mit dem IP_3R1 für die Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus den Speichern des ER essentiell ist.

Die Inaktivierung von Genen, die für Proteine der NO/sGC/cGKI-Signalkaskade kodieren, führt in vielen Fällen zu Bluthochdruck.

Je nach angewandeter Methode weisen eNOS knockout Mäuse eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks auf, die zwischen 8 und 50 mmHg liegt. (Duplain et al., 2001; Huang and Lo, 1998; Kojda et al., 1999; Kurihara et al., 1998; Shesely et al., 1996; Stauss et al., 2000)

Das Fehlen einer funktionsfähigen löslichen Guanylatzyklase führt bei Mäusen zur Erhöhung des systolischen Blutdrucks im Mittel um 26 mmHg. (Friebe et al., 2007)

Bei RGS-2^{-/-} Mäusen ist die SNP vermittelte Blutdrucksenkung vermindert und der basale Blutdruck leicht erhöht. (Obst et al., 2006; Sun et al., 2005; Tang et al., 2003)

Schließlich sind juvenile cGKI^{-/-} Mäuse ebenfalls hyperten. (Erhöhung des MAP um 16 mmHg. (Pfeifer et al., 1998; Weber et al., 2007)

Überraschender Weise und im Gegensatz zu oben genannten knockout Mausmodellen der gleichen Signalkaskade weisen die IRAG Deletionsmutanten keine Hyper- sondern eine Hypotonie auf.

Eine veränderte Herzfrequenz oder eine veränderte lokomotorische Aktivität der $\Delta 12$ Mäuse kann als Ursache ausgeschlossen werden, da sich die transgenen Tiere nicht von ihren Wildtyp Artgenossen in diesem Parameter unterscheiden.

In Aorten von IRAG $\Delta 12$ Tieren ist das Ausmaß der Expression der cGKI β geringfügig reduziert, das der cGKI α hingegen geringfügig erhöht.

Zusammen mit einer vermehrten Proteinsynthese verschiedener Targets der cGKI α könnte der erniedrigte Blutdruck erklärt werden. Jedoch entsprechen die Expressionsniveaus der wichtigsten Substrate von cGKI im Westernblot aus Aortenextrakten von $\Delta 12$ Tieren denjenigen der Wildtypiere. (RGS-2, MYPT1)

Als weitere Möglichkeit könnte die Gegenregulation über das RAAS-Systems die erwartete Hypertonie nicht nur ausgleichen, sondern überkompensieren und die beobachtete Hypotonie erklären.

In Immunohistochemischen Färbungen von Nierenschnitten ließ sich zudem IRAG im Vas afferens und efferens nachweisen. Die Expression von IRAG in der Macula densa und im restlichen juxtaglomerulären Apparat konnte nicht eindeutig gezeigt aber auch nicht eindeutig ausgeschlossen werden. (persönliche Mitteilung Beate Spießberger)

Die Expression von IRAG allein in den reninsezernierenden Zellen könnte eine Hypotonie erklären, wenn angenommen wird, dass IRAG physiologischer Weise direkt an der Reninsekretion beteiligt ist. Bei indirekter Beteiligung von IRAG an der Reninsekretion könnte eine postulierte kompensierte Hypertonie über zu hohen Druck am Barorezeptor beziehungsweise im Vas afferens zur Verminderung der Reninausschüttung und zu verminderter Aldosteronfreisetzung führen.

Schließlich steht noch die Expressionanalyse von IRAG im murinen Gehirn aus. Eine Expression im Hypothalamus könnte ebenfalls eine Hypotonie verursachen.

Kürzlich konnte mit Ratten gezeigt werden, dass die durch Hämorrhagie verursachte Hypotonie durch intrathekale Injektion von 8-Br-cGMP abgeschwächt werden kann. Die Autoren folgerten, ein NO/cGMP abhängiger Mechanismus erhöht die Aktivität sympathischer Neurone und damit den Blutdruck. (Malik et al., 2007) Dieser könnte die Hypotonie der $\Delta 12$ Mutanten ebenfalls verursachen.

D.2. Bedeutung der cGKI α und cGKI β im vaskulären System

Die Rolle der beiden cGKI Isoformen in glatten Muskelzellen wird intensiv beforscht. Als Produkt des gleichen Gens unterscheiden sich beide Formen in den 100 ersten Aminosäuren. Die Interaktion der cGKI α mit RGS-2 (Tang et al., 2003) und der MYPT1 (Surks et al., 1999) gilt als gut untersucht. Gleiches gilt für die Interaktion der cGKI β mit IRAG. (Ammendola et al., 2001; Antl et al., 2007; Schlossmann et al., 2000)

Die Rolle, die der I β -Isoform im Vergleich zur I α -Isoform bei der Regulierung des Tonus glatter Muskelzellen zufällt, wurde lange Zeit als gering angesehen. Nur die Rekonstitution der cGKI α Expression in kultivierten glatten cGKI-knockout Muskelzellen war in der Lage, die unterdrückende Wirkung von 8-Br-cGMP auf Norepinephrin induzierte intrazelluläre Kalziumtransienten wiederherzustellen. (Feil et al., 2003)

In Ovarialzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen) konnte die Isoform I α effektiver als I β den durch Thrombin ausgelösten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ reduzieren. Analoge Ergebnisse lieferten Experimente mit vaskulären glatten Muskelzellen humaner Herzen. (Co403 Zellen) Die Hemmung der cGKI α Expression mittels RNS Interferenz erhöhte zusätzlich den durch einen Thrombinrezeptoragonisten ausgelösten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Die Anwesenheit von 8-Br-cGMP hatte unter diesen Voraussetzungen keinen Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Die adenovirale Überexpression der I β -Isoform hatte dabei ebenfalls keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ und zwar unabhängig davon, ob die cGKI α Expression zusätzlich unterdrückt wurde oder nicht. (Christensen and Mendelsohn, 2006)

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigen jedoch deutlich, dass die alleinige Expression einer der beiden Isoformen im glatten Muskel unter annähernd physiologischen Kinasekonzentrationen (maximal 2-fache Überexpression, Weber et al., 2007) ausreicht, den myogenen Tonus und somit den MAP bei physiologischen Werten dauerhaft zu erhalten.

Der ausgeprägte gastrointestinale Phänotyp der cGKI $^{-/-}$ Tiere, mit stark eingeschränkter intestinaler Passagezeit, trat in beiden „Rescue“-Linien nicht mehr auf. Isometrische Kraftmessungen mit Aorten der beiden Mausmodelle ergaben für 8-Br-GMP die gleichen EC₅₀-Werte wie die der Wildtyp-Mäuse.

Auch die NO vermittelte Reduktion des Blutdrucks war bei diesen transgenen Linien nicht signifikant verändert im Vergleich zu Kontrollmäusen. Erklären lässt sich die Diskrepanz zwischen den einzelnen Versuchen durch den generellen Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten. Die genannten Arbeitsgruppen verwendeten isolierte, kultivierte Gewebezellen oder heterologe Expressionssysteme. Schon von glattmuskulären Zellen ist bekannt, dass die Expression der cGKI nach mehreren Zell-Passagen stark abnimmt. (Cornwell and Lincoln, 1989)

Kürzlich wurde von einer reduzierten Expression bereits nach der ersten Passage berichtet. (Weinmeister et al. 2007)

Interessanterweise bewirkt der „Rescue“ mit nur jeweils einer Isoform eine deutlich gesteigerte Lebenserwartung mit erheblicher „Verbesserung“ des ausgeprägten Phänotyps, wie er bei cGKI^{-/-} Mäusen zu beobachten ist.

Die Hypertonie der cGKI^{-/-} Mäuse wurde mit juvenilen Tieren (ca. 4 Wochen) gezeigt. Diejenigen, die das Erwachsenenalter erreichen, sind, vermutlich aufgrund des stark eingeschränkten Allgemeinzustandes, normoton.

Analoge Blutdruckmessungen mit juvenilen „Rescue“-Tieren erbrachten keinen Unterschied zu adulten „Rescue“-Mäusen. (Weber et al., 2007)

Die bekannten für die Isoformen spezifischen Signalwege könnten aber auch ausreichend sein, um die Regulation des Tonus vaskulärer glatter Muskelzellen wiederherzustellen. Die cGKI α senkt den vaskulären Tonus durch Aktivitätserhöhung der Myosinphosphatase (Bonnevier et al., 2004; Huang et al., 2004; Wooldridge et al., 2004) und durch Inaktivierung der PLC durch vermehrte Hydrolyse von G α qGTP zu G α qGDP (Obst et al., 2006, Sun et al., 2005; Solvay et al., 1995). Die cGKI β phosphoryliert IRAG und vermindert den Kalziumausstrom durch den IP₃R1, (und somit einen Anstieg der [Ca²⁺]_i) und den Tonus glatter Muskelzellen. (Geiselhöringer et al., 2004) Dagegen sprechen die Ergebnisse der Experimente mit IRAG Δ 12 Tieren. Die Zerstörung der Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃-Rezeptor ist bereits ausreichend, trotz Expression der cGKI α , den in dieser Arbeit gezeigten vaskulären Phänotyp zu verursachen.

Gerade die Tatsache der veränderten Expressionsmuster dieser Kinasen durch die Deletion von Exon 12 weist auf eine Gegenregulation der Zelle hin. Die verringerten Expressionslevel der cGKI β werden durch eine erhöhte cGKI α Expression ausgeglichen. Diese molekulare Gegensteuerung hat aber keinen Einfluss auf die nahezu fehlende Vasorelaxierung durch NO.

Schließlich könnte der Phänotyp der Mäuse durch eine veränderte Substratspezifität der jeweiligen Kinase bei gleichem Expressionsniveau der Zielstrukturen erklärt werden. Die eine Isoform könnte die Zielproteine der anderen Isoform phosphorylieren (und *vice versa*) und über diesen „Rettungsmechanismus“ die Regulation des Blutdrucks wiederherstellen. Dieser postulierte Mechanismus würde erst bei einem „kompletten Ausfall“ einer Isoform greifen, da IRAG Δ 12 Mutanten sowohl cGKI α als auch cGKI β in vaskulären glatten Muskelzellen exprimieren, der vaskuläre Phänotyp dort aber trotzdem auftritt.

Dagegen spricht die Tatsache, dass IRAG eine positiv geladene α -Helix, die nur eine Interaktion mit dem negativ geladenen N-Terminus der cGKI β erlaubt, nicht aber mit dem positiv geladenen N-Terminus der cGKI α . (Casteel et al., 2005)

Die Experimente mit den α und β -„Rescues“ zeigen also, dass die Expression einer Isoform ausreicht, die Stickstoffmonoxid vermittelte Blutdrucksenkung und –regulation wiederherzustellen. Deletiert man die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP $_3$ R1, so ist die NO vermittelte Blutdrucksenkung aufgehoben, obwohl beide Isoformen in vaskulären glatten Muskelzellen von IRAG Δ 12 Mutanten exprimiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, IRAG besitzt, neben der bekannten Signalweiterleitung über cGKI β /IRAG, noch mindestens eine weitere Funktion. Die Deletion von Exon 12 beeinträchtigt diese Funktion dann soweit, dass trotz Expression der α -Isoform in VSMCs die Blutdrucksenkung durch Stickstoffmonoxid nicht wiederhergestellt wird.

Möglich wäre es, dass das mutierte Protein sterisch die Phosphorylierung des IP $_3$ R1 durch die cGKI α behindert. Dass diese Phosphorylierung (deren physiologische Bedeutung noch nicht gezeigt ist) möglich ist, wurde *in vitro* schon gezeigt. (Murthy and Zhou, 2003) In Δ 12 Mäusen wird das mutierte im ER verankerte Protein, wenn auch in geringerem Umfang, exprimiert und könnte die postulierte Hinderung verursachen. In den α -„Rescues“ ist ein funktionsfähiges IRAG Protein vorhanden,

die cGKI α könnte dann den IP₃R1 phosphorylieren und über diesen Mechanismus die Blutdruckregulation und –senkung durch NO wieder herstellen. Dabei könnte die IRAG-IP₃ Interaktionsstelle notwendig für die Unterdrückung des IP₃ induzierten Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER sein. Denkbar wäre eine räumliche Veränderung der Pore des Kanals nach Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI β oder alternativ nach Phosphorylierung des IP₃R1 durch die cGKI α .

Der durch 8-Br-cGMP kaum reduzierbare Kalzium-Ausstrom durch den IP₃R1 der IRAG Δ 12 VSMCs (Geiselhöringer et al. 2004) zeigt, eine „zusätzliche“ Funktion von IRAG müsste über eine direkte oder indirekte Verringerung der [Ca²⁺]_i ablaufen. Eine Veränderung in der Rho-Kinase Signalkaskade ist durch die in dieser Arbeit gezeigten Experimente unwahrscheinlich. Die kürzlich generierte IRAG knockout Mauslinie könnte zur Klärung dieser Frage beitragen. Stickstoffmonoxid generierende Substanzen sollten den Blutdruck dieser Tiere in vollem Umfang senken.

E. Zusammenfassung

Die NO/cGMP/cGKI Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation und Aufrechterhaltung des Blutdrucks. Eine Störung dieser Kaskade wird als ein Faktor bei der Entstehung bzw. Progredienz zahlreicher Erkrankungen diskutiert, wie zum Beispiel Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Arteriosklerose mit nachfolgender peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Myokardinfarkt, und/oder Apoplex.

Ziel dieser Arbeit war es, die genaue Aufgabe der Isoformen der cGKI und einer Zielstruktur der cGKI β , IRAG, im vaskulären System zu untersuchen.

Dazu wurden vor kurzem zwei „Rescue“ Mauslinien generiert. Es handelt sich dabei um cGKI knockout Mäuse, die jeweils eine Isoform der cGKI im glatten Muskelzellen exprimieren.

Die Ergebnisse der Experimente mit den „Rescue-Linien“ ergab:

Der Blutdruck der Tiere war normal, und die NO vermittelte Regulation war ebenfalls normal. Interessanterweise ist somit eine Isoform der cGKI bei annähernd physiologischen Proteinkonzentrationen in der Lage, die andere zu ersetzen und damit den Tonus der vaskulären glatten Muskulatur in vollem Umfang zu regulieren.

Die Ergebnisse der Blutdruckuntersuchungen der „Rescue“-Linien zusammen mit denjenigen der IRAG Δ 12 Tiere zeigten:

In IRAG Δ 12 Deletionsmutanten ist die NO vermittelte Relaxation - genau wie die NO vermittelte Aggregationshemmung in Thrombozyten (Antl et al., 2007) nahezu verschwunden. Die Mäuse sind hypoton. Die Hypotonie ist wahrscheinlich durch eine Beteiligung von IRAG an der Blutdruckregulation über das RAAS-System zu erklären. Der Defekt in der Stickstoffmonoxid induzierten Relaxation lässt sich allein durch die Unterbrechung nur eines Teilweges über den die cGKI β agiert, nicht erklären. IRAG fällt mindestens noch eine weitere, bedeutendere Rolle bei der Modulation und Aufrechterhaltung des Blutdrucks zu, neben der bisher bekannten Signalweiterleitung über cGKI β und Unterdrückung des IP₃-vermittelten

Kalziumausstroms. Diese weitere Rolle muss an die Verringerung der $[Ca^{2+}]_i$ gekoppelt sein. Eine veränderter RhoA/Rho-Kinase Signalweg („Kalzium unabhängiger Signalweg“) als Ursache wird durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse unwahrscheinlich.

Die fehlende Reduktion des MAP durch NO in den Mutanten könnte durch sterische Hinderung der cGKI α (verursacht durch das noch vorhandene IRAG) und der damit verbundenen Störung der Phosphorylierung des IP $_3$ R1 erklärt werden.

Es bleibt abzuwarten, in wie weit sich die Ergebnisse der IRAG Δ 12 Deletionsmutanten mit den Daten der IRAG knockout Mäuse decken. Notwendig ist eine intensivere Analyse der Renin, Aldosteron, Natrium- und Kaliumionen Plasmaspiegel eines größeren Kollektivs beider Mauslinien. Die intensiviertete Aufklärung der IRAG Expression in für die Blutdruckregulation wichtigen Abschnitten der Niere und des Gehirns sollte Ziel weiterer Forschungsarbeiten sein.

Verwendete Antikörper

Antikörper	Referenz	Verdünnung	Herkunft
IRAG, Nr. 90, gereinigt	Prof. J. Schlossmann	1:500	Kaninchen, polyklonal
CGK1c	Prof. F. Hofmann	1:200	Kaninchen, polyklonal
cGKI β	Prof. J. Schlossmann	1:1000	Kaninchen, polyklonal
Rho A	Santa Cruz	1:1000	Maus, polyklonal
GABDH	Biozol	1:1000	Mensch, polyklonal
MYPT1	Upstate	1:500	Schaf, polyklonal
IP ₃ R1	ABR Affinity Bioreagents	1:1000	Kaninchen, polyklonal
Anti-Maus/ Meerrettichperoxidase	Dianova	1:100000	Esel, polyklonal
Anti-Kaninchen/ Meerrettichperoxidase	Dianova	1:100000	Ziege, polyklonal
Anti-Schaf/ Meerrettichperoxidase	Dianova	1:50000	Esel, polyklonal

F. Literaturverzeichnis

F.1. Zitierte Veröffentlichungen

- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. and Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 32950-32956.
- Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F. and Schlossmann, J. (2001) Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*, **276**, 24153-24159.
- Antl, M., von Bruhl, M.L., Eiglsperger, C., Werner, M., Konrad, I., Kocher, T., Wilm, M., Hofmann, F., Massberg, S. and Schlossmann, J. (2007) IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*, **109**, 552-559.
- Barbato, J.E. and Tzeng, E. (2004) Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg*, **40**, 187-193.
- Bender, A.T. and Beavo, J.A. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, **58**, 488-520.
- Benjamin, N. and Vane, J. (1996) Nitric oxide and hypertension. *Circulation*, **94**, 1197-1198.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. and Zong, X. (1998) Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358**, 140-144.
- Brayden, J.E. and Nelson, M.T. (1992) Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, **256**, 532-535.

- Buchwalow, I.B., Schulze, W., Karczewski, P., Kostic, M.M., Wallukat, G., Morwinski, R., Krause, E.G., Muller, J., Paul, M., Slezak, J., Luft, F.C. and Haller, H. (2001) Inducible nitric oxide synthase in the myocard. *Mol Cell Biochem*, **217**, 73-82.
- Casteel, D.E., Boss, G.R. and Pilz, R.B. (2005) Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I β and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif. *J Biol Chem*, **280**, 38211-38218.
- Cawley, S.M., Sawyer, C.L., Brunelle, K.F., van der Vliet, A. and Dostmann, W.R. (2007) Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, **19**, 1023-1033.
- Cerra, M.C. and Pellegrino, D. (2007) Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. *Curr Med Chem*, **14**, 585-599.
- Christensen, E.N. and Mendelsohn, M.E. (2006) Cyclic GMP-dependent protein kinase I α inhibits thrombin receptor-mediated calcium mobilization in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **281**, 8409-8416.
- Cornwell, T.L. and Lincoln, T. M. (1989) Regulation of intracellular Ca²⁺ levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca²⁺ by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1146 - 1155
- Duplain, H., Burcelin, R., Sartori, C., Cook, S., Egli, M., Lepori, M., Vollenweider, P., Pedrazzini, T., Nicod, P., Thorens, B. and Scherrer, U. (2001) Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **104**, 342-345.
- Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Hasko, G., Schmidt, H.H. and Stasch, J.P. (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 755-768.

- Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C. R., Konnerth, A., Brummer, S., Kühbandner, S., Hofmann, F. (2002) Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res.*, **90**, 1080-86
- Feil, R., Hofmann, F. and Kleppisch, T. (2005a) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci*, **16**, 23-41.
- Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U. and Hofmann, F. (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, **93**, 907-916.
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Feil, R. (2005b) Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience*, **135**, 863-868.
- Feron, O., Dessy, C., Opel, D.J., Arstall, M.A., Kelly, R.A. and Michel, T. (1998) Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem*, **273**, 30249-30254.
- Förstermann, U. (2006) Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem*, **387**, 1521-1533.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. and Koesling, D. (2007) Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7699-7704.
- Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. and Schlossmann, J. (2004a) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*, **575**, 19-22.
- Geiselhöringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. and

- Schlossmann, J. (2004b) IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *Embo J*, **23**, 4222-4231.
- Giulivi, C. (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med*, **34**, 397-408.
- Han, X., Kubota, I., Feron, O., Opel, D.J., Arstall, M.A., Zhao, Y.Y., Huang, P., Fishman, M.C., Michel, T. and Kelly, R.A. (1998) Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte I_{Ca}-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6510-6515.
- Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 376-382.
- Heximer, S.P., Srinivasa, S.P., Bernstein, L.S., Bernard, J.L., Linder, M.E., Hepler, J.R. and Blumer, K.J. (1999) G protein selectivity is a determinant of RGS2 function. *J Biol Chem*, **274**, 34253-34259.
- Hofmann, F., Ammendola, A. and Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113 (Pt 10)**, 1671-1676.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. and Schlossmann, J. (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, **86**, 1-23.
- Huang, P.L. and Lo, E.H. (1998) Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. *Prog Brain Res*, **118**, 13-25.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9265-9269.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-473.

- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R. and Hofmann, F. (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci*, **19**, 48-55.
- Koeppen, M., Feil, R., Siegl, D., Feil, S., Hofmann, F., Pohl, U. and de Wit, C. (2004) cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension*, **44**, 952-955.
- Koesling, D., Russwurm, M., Mergia, E., Mullershausen, F. and Friebe, A. (2004) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int*, **45**, 813-819.
- Kojda, G., Laursen, J.B., Ramasamy, S., Kent, J.D., Kurz, S., Burchfield, J., Shesely, E.G. and Harrison, D.G. (1999) Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res*, **42**, 206-213.
- Kuhn, M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*, **93**, 700-709.
- Kurihara, N., Alfie, M.E., Sigmon, D.H., Rhaleb, N.E., Shesely, E.G. and Carretero, O.A. (1998) Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. *Hypertension*, **32**, 856-861.
- Kurtz, A., Gotz, K.H., Hamann, M., Kieninger, M. and Wagner, C. (1998) Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol*, **274**, F709-717.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Li, H. and Förstermann, U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*, **190**, 244-254.
- Malik, V., Holobotovskyy, V.V., Phillips, J.K., McKittrick, D.J. and Arnolda, L.F. (2007) Intrathecal cGMP elicits pressor responses and maintains mean blood pressure during haemorrhage in anaesthetized rats. *J Physiol*, **581**, 543-552.
- Maragos, C.M., Morley, D., Wink, D.A., Dunams, T.M., Saavedra, J.E., Hoffman, A., Bove, A.A., Isaac, L., Hrabie, J.A. and Keefer, L.K. (1991) Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem*, **34**, 3242-3247.
- Maragos, C.M., Wang, J.M., Hrabie, J.A., Oppenheim, J.J. and Keefer, L.K. (1993) Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res*, **53**, 564-568.
- Mooradian, D.L., Hutsell, T.C. and Keefer, L.K. (1995) Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*, **25**, 674-678.
- Murthy, K.S. (2006) Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol*, **68**, 345-374.
- Murthy, K.S. and Zhou, H. (2003) Selective phosphorylation of the IP3R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G221-230.
- Ny, L., Pfeifer, A., Aszodi, A., Ahmad, M., Alm, P., Hedlund, P., Fassler, R. and Andersson, K.E. (2000) Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Br J Pharmacol*, **129**, 395-401.

- Obst, M., Tank, J., Plehm, R., Blumer, K.J., Diedrich, A., Jordan, J., Luft, F.C. and Gross, V. (2006) NO-dependent blood pressure regulation in RGS2-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, R1012-1019.
- Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **87**, 315-424.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. and Fassler, R. (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, **274**, 2082-2086.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. and Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, **17**, 3045-3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 105-149.
- Ren, Y.L., Garvin, J.L. and Carretero, O.A. (2000) Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int*, **58**, 2053-2060.
- Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E. and Beavo, J.A. (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*, **93**, 280-291.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. and Hofmann, F. (2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87**, 825-830.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. and Ruth, P.

- (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, **404**, 197-201.
- Schubert, R., Lehmann, G., Serebryakov, V.N., Mewes, H. and Hopp, H.H. (1999) cAMP-dependent protein kinase is in an active state in rat small arteries possessing a myogenic tone. *Am J Physiol*, **277**, H1145-1155.
- Shesely, E.G., Maeda, N., Kim, H.S., Desai, K.M., Krege, J.H., Laubach, V.E., Sherman, P.A., Sessa, W.C. and Smithies, O. (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13176-13181.
- Solway, J., Seltzer, J., Samaha, F.F., Kim, S., Alger, L.E., Niu, Q., Morrissey, E.E., Ip, H.S., Parmacek, M.S. (1995) Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 α . *J Biol Chem.*; **270**(22):13460-13469.
- Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, **83**, 1325-1358.
- Stasch, J.P., Schmidt, P.M., Nedvetsky, P.I., Nedvetskaya, T.Y., H, S.A., Meurer, S., Deile, M., Taye, A., Knorr, A., Lapp, H., Muller, H., Turgay, Y., Rothkegel, C., Tersteegen, A., Kemp-Harper, B., Muller-Esterl, W. and Schmidt, H.H. (2006) Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*, **116**, 2552-2561.
- Stauss, H.M., Nafz, B., Mrowka, R. and Persson, P.B. (2000) Blood pressure control in eNOS knock-out mice: comparison with other species under NO blockade. *Acta Physiol Scand*, **168**, 155-160.
- Sun, X., Kaltenbronn, K.M., Steinberg, T.H. and Blumer, K.J. (2005) RGS2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling. *Mol Pharmacol*, **67**, 631-639.

- Surks, H.K. and Mendelsohn, M.E. (2003) Dimerization of cGMP-dependent protein kinase 1alpha and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cell Signal*, **15**, 937-944.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. and Mendelsohn, M.E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science*, **286**, 1583-1587.
- Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. and Mendelsohn, M.E. (2003) Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, **9**, 1506-1512.
- Vaandrager, A.B., Tilly, B.C., Smolenski, A., Schneider-Rasp, S., Bot, A.G., Edixhoven, M., Scholte, B.J., Jarchau, T., Walter, U., Lohmann, S.M., Poller, W.C. and de Jonge, H.R. (1997) cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ibeta. *J Biol Chem*, **272**, 4195-4200.
- Van Vliet, B.N., Chafe, L.L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S. and Montani, J.P. (2000) Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **44**, 361-373.
- Vanhoutte, P.M. (2006) [Endothelial dysfunction and vascular pathology]. *Bull Mem Acad R Med Belg*, **161**, 529-536; discussion 536-527.
- Vanhoutte, P.M., Feletou, M. and Taddei, S. (2005) Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*, **144**, 449-458.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. and Kurtz, A. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*, **102**, 1576-1582.

Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Wörner, R., Wegener, J. W., Valtcheva, N., Feil S., Schlossmann J., Hofmann F., Feil, R. (2007). Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ. Res.* 2007, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.154351

Weinmeister P, Lukowski R, Traidl-Hoffmann C, et al. (2007) cGMP/cGKI-signaling promotes the growth of primary VSMCs isolated from mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2007;375(Suppl. 1):40.

Wooldridge, A.A., MacDonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hartshorne, D.J. and Haystead, T.A. (2004) Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, **279**, 34496-34504.

F.2. Eigene Publikationen

Abstracts:

Bernhard D., Moosmang S., Hofmann F. , Schlossmann J. (2006) Relaxation of vascular smooth muscle by the cGMP-kinase substrate IRAG. 47. Frühjahrstagung der DGPT. (Mainz, Germany)

Sigl, K., Bernhard, D., Jochim, A., Wegener, J., Hofmann, F. (2007) Analysis of smooth muscle function in IRAG knockout mice. 48. Frühjahrstagung der DGPT. (Mainz, Germany)

Hofmann, F., Lukowski, R., Bernhard, D., Weinmeister, P., Weber, S., Feil, S., Schlossmann, J., Wegener, J. W., Feil, R. (2007). Phenotypic analysis of the smooth muscle-specific cGKI α or I β isoform reconstituted mice. 48.Frühjahrstagung der DGPT (Mainz, Germany)

Bernhard, D., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2007). Relaxation of the vascular smooth muscle via the cGKI substrate IRAG. 3rd International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. (Dresden, Germany)

Lukowski, R., Bernhard, D., Weinmeister, P., Feil, S., Gotthardt, M., Herz, J., Massberg, S., Hofmann F., Feil R. (2007). Vascular remodelling in the absence and presence of cGKI. 3rd International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. (Dresden, Germany)

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

Originalarbeiten:

Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Wörner, R., Wegener, J. W., Valtcheva, N., Feil S., Schlossmann J., Hofmann F., Feil, R. (2007). Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyeme. *Circ. Res.*:PMID:17901360, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.154351

Lukowski, R., Weinmeister, P., Bernhard, D., Feil, S. Gotthardt, J. H., Massberg, S., Zerneck, A., Weber, C., Hofmann, F., Feil, R. (2007) Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in mouse models in vascular restenosis. Submitted: FASEB

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichst danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die Betreuung dieser Arbeit und für die Berichterstattung vor der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Franz Bernhard Hofmann (dem Chef) für die Anstellung am Institut, und u.a. dafür, dass er trotz vollem Terminkalender bei Problemen stets&immer ohne vorherige Terminvereinbarung Zeit hatte - selbst für „nagelneue“ Doktoranden.

Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Wegener für die zahlreichen wertvollen Hinweise und Diskussionen die für das Gelingen dieser Arbeit sehr hilfreich waren. Genauso will ich mich für die Aufmunterungen und dein offenes Ohr bedanken, was v.a. in „Krisensituationen“ wertvoll war. Danke Jörg!

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die vielen fachlichen Diskussionen, v.a. aber für die Geduld, die selbst in hitzigen Diskussionen, stets beeindruckend war.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kleppisch für die sympathische, kollegiale Art seit der „ersten Minute“, für die wissenschaftlichen und auch den weniger wissenschaftlichen Gespräche und für die vielen Feiern auf welchen er nie fehlen sollte.

Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Welling – humorvoll, hilfsbereit, witzig, sympathisch und....Mutter von 2 Kindern – wichtige Voraussetzungen für ein gesundes Arbeitsklima am Biederstein und überall sonst wo.

Meinen Mädels: Meli und Katja, die den 1. Stock erst zum Ersten Stock machten und den AK zum Arbeitskreis =D. Vielen Dank Meli für die Zeit in „unserem“ Büro und für die 1000 Albernheiten, die die Arbeit nie als solche haben erscheinen lassen.

Meinen Freunden Carl und Peter.

Den Doktoranden (Schtäffi, Toni, Peter, Carl) dem Postdoc (Nicole, die immer die Haida geblieben ist) und Angelika im 2. Stock für die Aufnahme eines Asylanten und für die lustigen Mittagspausen.

Dem Sekretariat am Biederstein: zuverlässig, präzise, hilfsbereit und gut gelaunt.

Vielen Dank auch: Pascal , Stefan, Beate, Veronika L., Veronika A., Meike, Petra und allen, die ich vergessen habe.

Lebenslauf

Dominik Bernhard

Geburtsdatum	14.04.1978
Geburtsort	Oberstdorf
Religion	römisch-katholisch

Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Wohnort	Gudrunstr. 14, 80634 München

Schule

1984 - 1988	Grundschule Altstädten
1988 - 1997	Gymnasium Sonthofen
1997	Abitur

Zivildienst

1997 - 1998	Distriktspitalstiftung, Seniorenheim Sonthofen
-------------	--

Studium

WS 1998 - SS2002	Pharmaziestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
SS 2000	1. Staatsexamen
Oktober 2002	2. Staatsexamen
Dezember 2003	3. Staatsexamen
Januar 2003	Approbation als Apotheker

Praktika

März 1999	Famulatur in der Scharpf-Apotheke Sonthofen
August 1999	Famulatur bei Allga-Pharma Sonthofen
November 2002 - November 2003	PJ in der Karwendel-Apotheke, München

Wissenschaftliche Tätigkeit

März 2001 -

September 2001

Hilfswissenschaftliche Mitarbeit in der Pharmazeutischen Biologie bei Prof. Dr. Martin Müller

Seit 15.10.2004

bei Prof. Dr. Franz Bernhard Hofmann als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des Graduiertenkollegs 438 „Biologie vaskulärer Erkrankungen in der Medizin“ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München