

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

**Mechanismen der cGMP-induzierten Relaxation
der Mauseaorta**

René Wörner

aus

Freising

2006

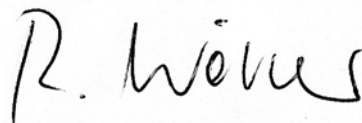
Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 2.1.2006



.....
René Wörner

Dissertation eingereicht am 5.1.2006

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

Mündliche Prüfung am 22.2.2006

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII

A. Einleitung..... 1

A.1. NO/ cGMP/ cGK-Signalkaskade.....	1
A.2. Struktur und Vorkommen der cGK	3
A.3. Regulation der Ca ²⁺ -abhängigen und Ca ²⁺ -unabhängigen Kontraktion des glatten Muskels.....	4
A.4. cGMP/ cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur	6
A.5. Ziele der Arbeit	8

B. Material und Methoden 10

B.1. Bezugsquellennachweis der verwendeten Substanzen	10
B.2. Versuchstiere	10
B.3. Isolierung und Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen	11
B.4. Bestimmung der intrazellulären [Ca ²⁺] _i	13
B.4.1. Indikatorfarbstoff Fura-2.....	13
B.4.2. Versuchsapparatur.....	14
B.4.3. Vorbereitung und Durchführung der Messungen	15
B.4.4. Auswertung	17
B.5. Kraftmessung am glatten Muskel	17
B.5.1. Isolierung von Gefäßsegmenten der Aorta thoracalis der Maus	18
B.5.2. Durchführung der Versuche	20
B.5.3. Auswertung der Versuche.....	25
B.6. Statistische Methoden	25

C. Ergebnisse	26
C.1. Effekte von 8-Br-cGMP auf Hormon-induzierte Kontraktion und Ca ²⁺ -Signale.....	26
C.1.1. Kontraktionsmessungen.....	26
C.1.2. Kalziummessungen.....	30
C.2. Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kalium-vermittelte Kontraktion und Ca ²⁺ -Signale.....	32
C.2.1. Kontraktionsmessungen.....	32
C.2.2. Kalziummessungen.....	33
C.3. Permeabilisierung und Ca ²⁺ -Sensitisierung des glatten Muskels	36
C.3.1. Nachweis der Permeabilisierung von Mauseaorta	36
C.3.2. Effekt von 8-Br-cGMP auf den Ca ²⁺ -induzierten Tonus der permeabilisierten Aorta	38
C.3.3. Abhängigkeit der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation von der Protein Kinase A	40
C.3.4. Ca ²⁺ -Sensitisierung an der permeabilisierten Aorta	43
C.4. Effekt von 8-Br-cGMP auf die Hormon-unabhängige Stimulation glatter Muskelzellen nach Inkubation mit Thapsigargin	49
C.4.1. Effekt von 8-Br-cGMP auf den Thapsigargin-induzierten Tonus	49
C.4.2. Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Kalium-vermittelten Tonus.....	50
C.4.3. Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des Kalium-vermittelten Ca ²⁺ -Signals	52
C.4.4. Untersuchung der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation nach Kalium-Stimulation an PLB ^{-/-} -Mäusen	54
D. Diskussion	55
D.1. cGMP-vermittelte Relaxation nach adrenerger Stimulation glatter Muskelzellen.....	55
D.2. cGMP-vermittelte Relaxation nach Kalium-induzierter Kontraktion glatter Muskelzellen.....	57

E. Zusammenfassung	62
F. Literaturverzeichnis	63
F.1. Zitierte Veröffentlichungen	63
F.2. Eigene Veröffentlichungen	71

Abbildungsverzeichnis

Abb A-1	Die cGMP-Signalkaskade.....	2
Abb A-2	Ca ²⁺ -abhängige und Ca ²⁺ -unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur.....	6
Abb A-3	NO/ cGMP/ cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur.....	8
Abb B-1	Strukturformel und Fluoreszenzintensität von Fura-2.....	14
Abb B-2	Ruhe-Dehnungskurve des glattmuskulären Aortenrings der Maus....	18
Abb B-3	Effekt von Carbachol auf den Phenylephrin-induzierten Gefäßtonus.	19
Abb B-4	Effekt von L-NAME auf den Phenylephrin-induzierten Gefäßtonus....	19
Abb C-1	Effekte von 8-Br-cGMP auf den Phenylephrin-induzierten Tonus der Mausaorta.....	27
Abb C-2	Beispiel für eine reproduzierbare Hormon-induzierte Kontraktionsamplitude am Aortenring der Maus.....	28
Abb C-3	Effekte von 8-Br-cGMP auf die Hormon-induzierte Kontraktionsamplitude des Aortenrings der Maus.....	29
Abb C-4	Beispiel eines reproduzierbar mit Noradrenalin-ausgelösten Ca ²⁺ -Transienten in VSMCs.....	30
Abb C-5	Effekte von 8-Br-cGMP auf Hormon-induzierte Ca ²⁺ -Transienten in VSMCs.....	31
Abb C-6	Effekte von 8-Br-cGMP auf den Kalium-induzierten Tonus der Mausaorta.....	33
Abb C-7	Effekte von 8-Br-cGMP auf das Kalium-induzierte Ca ²⁺ -Signal in VSMCs.....	35
Abb C-8	Ca ²⁺ -induzierte Kontraktion einer intakten und permeabilisierten Mausaorta.....	37
Abb C-9	Konzentrations-Wirkungskurve von α -Toxin.....	37
Abb C-10	Relaxation des Ca ²⁺ -induzierten Tonus durch 8-Br-cGMP.....	38
Abb C-11	Ca ²⁺ -Abhängigkeit des Effekts von 8-Br-cGMP.....	39
Abb C-12	Konzentrations-Wirkungskurve von Ca ²⁺ an der permeabilisierten Aorta.....	40
Abb C-13	Hemmung der 8-Br-cGMP-vermittelten Relaxation des Ca ²⁺ -induzierten Tonus durch das PKA-Inhibitorpeptid.....	41
Abb C-14	Konzentrations-Wirkungskurve von 8-Br-cGMP auf den Ca ²⁺ -induzierten Tonus der permeabilisierten Mausaorta.....	43
Abb C-15	Effekt von GTP γ S auf die Ca ²⁺ -induzierte Kontraktion der permeabilisierten Aorta.....	44

Abb C-16 Ca ²⁺ -Sensitisierung mit Phenylephrin, U46619 und GTP γ S.....	45
Abb C-17 Relaxation des Ca ²⁺ -induzierten Tonus nach Ca ²⁺ -Sensitisierung mit Phenylephrin.....	46
Abb C-18 Relaxation des Ca ²⁺ -induzierten Tonus nach Ca ²⁺ -Sensitisierung mit U46619.....	47
Abb C-19 Relaxation des Ca ²⁺ -induzierten Tonus nach Ca ²⁺ -Sensitisierung mit GTP γ S.....	48
Abb C-20 Histogramm des 8-Br-cGMP-Effekts auf den Ca ²⁺ -induzierten Tonus in Ab- und Anwesenheit von U46619 und GTP γ S.....	49
Abb C-21 Effekte von 8-Br-cGMP und Y-27632 auf den Thapsigargin-induzierten Tonus der Mauseorta.....	50
Abb C-22 Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Kalium-vermittelten Gefäßtonus der Mauseorta.....	51
Abb C-23 Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des Kalium-vermittelten Ca ²⁺ -Signals in VSMCs.....	53
Abb C-24 Effekt von 8-Br-cGMP auf den Kalium-induzierten Gefäßtonus der Aorta von PLB ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.....	54

Tabellenverzeichnis

Tab C-1	EC ₅₀ -Werte für die Ca ²⁺ -induzierte Kontraktion in Ab- und Anwesenheit von Testsubstanzen.....	39
Tab C-2	EC ₅₀ -Werte für die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation von Mauseorta.....	42

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
AM	Azetoxymethylester	CNG	"cyclic nucleotide-gated"
ANP	atriales natriuretisches Peptid	CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	CPI-17	Protein Kinase C-stimuliertes Inhibitorprotein
AUC	Fläche unter der Kurve (area under curve)	CTR	Kontrolle
AS	Aminosäure	DAG	Diazylglyzerol
BK_{Ca}	Ca ²⁺ -abhängige K ⁺ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit	DB-cAMP	zyklisches Dibutyryl-3',5'-Adenosin-Monophosphat
BNP	natriuretisches Peptid im Gehirn (brain natriuretic peptide)	DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
8-Br-	8-Bromo-	DMSO	Dimethylsulfoxid
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serum Albumin)	DTT	Dithioerythritol
°C	Grad Celsius	EC₅₀	Konzentration, bei der 50 % der Wirkung erzielt wird
Ca²⁺	Kalziumionen	EDRF	endothelialer Relaxationsfaktor (endothelium derived relaxing factor)
[Ca²⁺]	Kalziumkonzentration	EGTA	Ethylen Glykol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N',N'-tetraessigsäure
[Ca²⁺]_i	zytosolische Kalziumkonzentration	eNOS	endotheliale NO-Synthase
Ca_v1.2	porenbildende Untereinheit des L-Typ-Kalziumkanals	EtOH	Ethanol
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase	F	Fluoreszenzintensität
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat	FCS	Fötale Kälberserum
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase	g	Gravitationskonstante oder Gramm

GAP	GTPase-aktivierende Proteine	MLCK	Myosin leichte Ketten Kinase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	MLCP	Myosin leichte Ketten Phosphatase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	min	Minute
GTPγS	Guanosin-5'-O-(3-thio-triphosphat)	μ	Mikro (10^{-6})
h	Stunde	MYPT1	regulatorische Untereinheit der MLCP
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin	n	Nano (10^{-9}) oder Anzahl
IC₅₀	Konzentration, bei der 50 % der Hemmung erzielt wird	N	Newton oder Amino
Inh.	Inhibitor	nNOS	neuronale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase	NO	Stickstoffmonoxid
IP₃	Inositol-1,4,5,-triphosphat	NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
IP₃R1	Inositol-1,4,5,-triphosphat-Rezeptor Typ 1	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein	PDE	Phosphodiesterase
K_a	Affinitätskonstante	pGC	partikuläre Guanylatzyklase
kDa	Kilodalton	PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
l	Liter	PKA	siehe cAK
L-NAME	N _ω -Nitro-L-Arginin-methylester	PKC	Protein Kinase C
m	Milli (10^{-3}) oder Meter	PKG	siehe cGK
M	Mol	PLB	Phospholamban
MG/ MW	Molekulargewicht	PLCβ	Phospholipase C β

PP1c	katalytische Untereinheit der MLCP	VSMC	vaskuläre glatte Muskelzelle
%	Prozent		
‰	Promille		
R	Rezeptor		
RLC	regulatorische leichte Myosinkette		
RP-8-Br-cAMPS	8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches monophosphorothioat, Rp-Isomer		
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)		
RT	Raumtemperatur		
RGS	“regulator of G-protein-signaling”		
sec	Sekunde		
SEM	Standardfehler		
Ser	Serin		
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase am Sarko-/ Endoplasmatischen Retikulum		
sGC	lösliche Guanylatzyklase		
SNP	Nitroprussid-Natrium (sodium nitroprusside)		
SOC	Speicher-gesteuerter Kanal (store operated channel)		
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum		
Thr	Threonin		
TRP	“transient receptor potential”		

A. Einleitung

A.1. NO/ cGMP/ cGK-Signalkaskade

Stickstoffmonoxid (NO) steuert eine Vielzahl physiologischer Funktionen, wie die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, die Regulation der Darmperistaltik, die Aktivierung von Thrombozyten und besitzt Eigenschaften als Neurotransmitter. Die Bedeutung von NO als physiologisches Signalmolekül ist im Jahr 1987 entdeckt worden (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass biologisch freigesetztes NO mit den gefäßerweiternden Eigenschaften eines Stoffs aus der Endothelschicht von Blutgefäßen, dem „endothelium-derived relaxing factor“, kurz EDRF (Furchgott and Zawadzki, 1980), identisch ist. Die Pionierarbeiten von Ferid Murad, Louis J. Ignarro und Robert F. Furchgott zur Bedeutung des Stickstoffmonoxids als Signalmolekül im kardiovaskulären System wurden 1998 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Das gasförmige NO wird von NO-Synthasen (NOS) gebildet, welche aus der Aminosäure L-Arginin in einer Oxidation des terminalen Stickstoffs der Guanidinogruppe die Bildung von L-Citrullin und NO katalysieren (Dejam et al., 2004; Lloyd-Jones and Bloch, 1996). Die Enzymfamilie der NO-Synthasen umfasst die neuronale NOS (nNOS, NOS-1), die induzierbare NOS (iNOS, NOS-2) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS-3). Alle drei Enzyme bilden Homodimere und katalysieren die Bildung von NO. Die endotheliale NOS und die neuronale NOS sind konstitutiv exprimierte Enzyme und werden Kalzium (Ca^{2+})-abhängig reguliert (Hanafy et al., 2001). Die eNOS wird sowohl in endothelialen Zellen als auch in Thrombozyten exprimiert. Obwohl die nNOS neben neuronalen Zellen auch in der Media und Adventitia von Blutgefäßen nachgewiesen wurde, werden eNOS und iNOS als die Enzyme mit der größeren Bedeutung für die vaskuläre Biologie betrachtet (Walford and Loscalzo, 2003).

Im Gegensatz zur eNOS und nNOS wird die iNOS Ca^{2+} -unabhängig aktiviert. Die Expression der iNOS ist induzierbar und wird über ihren Transkriptionsgrad reguliert. Die iNOS bildet über einen längeren Zeitraum höhere Mengen an Stickstoffmonoxid als die „konstitutiven“ NOS (Klein, 2002). Zytokine und Endotoxine gelten als mögliche Stimulatoren zur iNOS-Induktion. Die iNOS kommt in mehreren Geweben vor, unter anderem in Makrophagen und in glatten Gefäßmuskelzellen (Dedkova and Blatter, 2002; Walford and Loscalzo, 2003).

Die Wirkung von NO wird hauptsächlich über intrazelluläre Botenstoffe vermittelt. NO steuert die Synthese von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) über Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) (Krumenacker et al., 2004). Das zyklische Nukleotid cGMP ist nur zeitlich begrenzt

aktiv, da der Botenstoff insbesondere von der Phosphodiesterase V (PDE V) hydrolysiert wird (Rybalkin et al., 2003).

Das Signalmolekül cGMP aktiviert mehrere Signalkaskaden. Bereits bekannte Rezeptorproteine für cGMP sind durch zyklische Nukleotide aktivierbare Kationenkanäle („cyclic nucleotide-gated cation channels“, CNG Kanäle) (Biel et al., 1999), cGMP- bzw. cAMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) (Sonnenburg and Beavo, 1994) und die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) (Hofmann, 2005; Schlossmann et al., 2003), die im glatten Muskel einer der Hauptrezeptoren für cGMP ist (**Abbildung A-1**). cGMP wird auch NO-unabhängig von der membrangebundenen, partikulären Guanylatzyklase (pGC), die durch natriuretische Peptide (ANP „atrial natriuretic peptide“, BNP „brain natriuretic peptide“ and CNP „C-type natriuretic peptide) und Guanylin aktiviert wird, gebildet (**Abbildung A-1**).

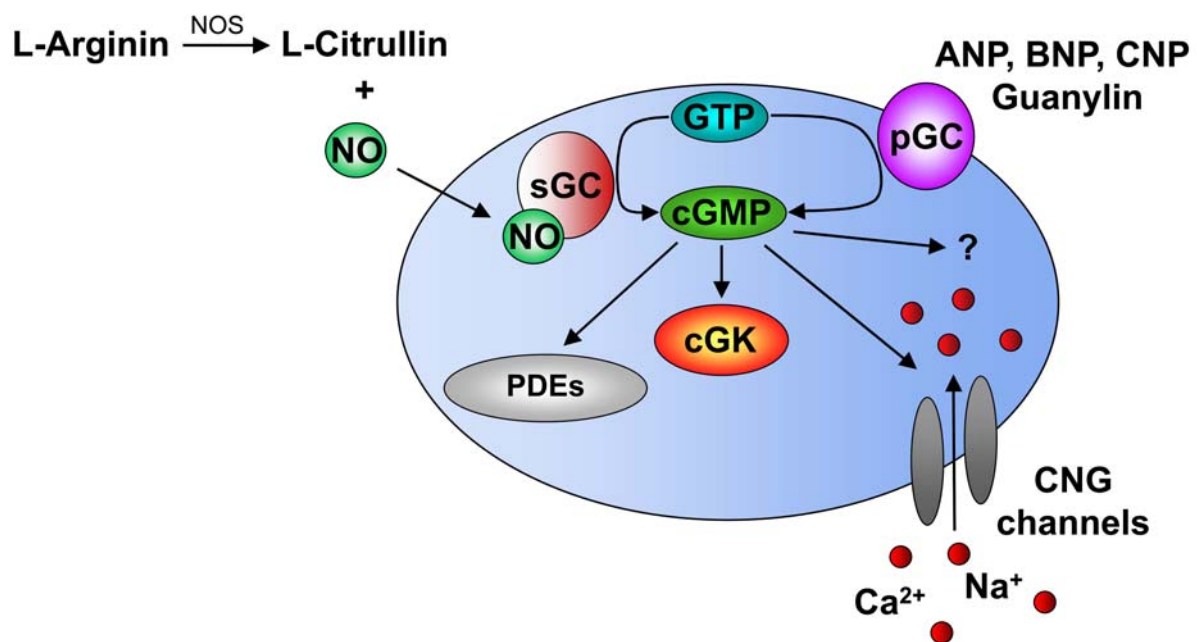


Abbildung A-1: Die cGMP-Signalkaskade in der glatten Muskulatur. Der Botenstoff cGMP wird aus GTP nach Aktivierung der löslichen oder membrangebundenen Guanylylzyklase gebildet. Das zyklische Nukleotid cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Kinase (cGK), Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) und reguliert cGMP- und cAMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDEs).

ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; CNP, C-type natriuretic peptide; cGK, cGMP-abhängige Proteinkinase; cGMP, Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat; GTP, Guanosin-5'-triphosphat; CNG channels, cyclic nucleotide gated cation channels; PDE, Phosphodiesterase; NO, Stickstoffmonoxid; NOS: NO-Synthase; sGC, lösliche Guanylatzyklase; pGC, partikuläre Guanylatzyklase

A.2. Struktur und Vorkommen der cGK

Die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) gehört zur Familie der Serin/ Threonin-Kinasen, welche die Aminosäuren Serin und Threonin eines Substrats spezifisch phosphorylieren. Die cGK ist in verschiedensten Eukaryonten - vom einzelligen Organismus Paramecium bis zum Menschen - exprimiert. Säugetiere besitzen zwei cGK-Gene, die für die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) und Typ II (cGKII) codieren. Von der cGKI sind zwei Isoformen bekannt, die cGKI α und die cGKI β . Sowohl die cGKI als auch die cGKII sind aus drei verschiedenen funktionellen Domänen zusammengesetzt: der Amino (N)-terminalen, der regulatorischen und der katalytischen Domäne (Hofmann, 2005; Lincoln et al., 2001). Die regulatorische Domäne besitzt zwei aufeinanderfolgende cGMP-Bindungsstellen, die cGMP sowohl mit hoher als auch mit geringer Affinität binden (Hofmann et al., 1985). Nach Bindung von cGMP an die regulatorische Domäne steigt der α -helikale Gehalt des Enzyms (Landgraf et al., 1990), wobei das Molekül gestreckt wird (Zhao et al., 1997).

Binden 2 Mol cGMP/ Mol Enzym an die dafür vorgesehenen Stellen der regulatorischen Domäne, kommt es zur Autophosphorylierung des Amino-Terminus an Thr 59 der cGKI α bzw. an Ser 64 und Ser 80 der cGKI β unter Ausbildung einer Konformationsänderung des Enzyms. Somit wird die Hemmung der katalytischen Domäne durch die N-terminale Pseudo-Substratbindungsstelle aufgehoben. Die katalytische Domäne enthält eine kleine MgATP-Bindungstasche und eine große Bindungstasche für das Peptidsubstrat. Interagiert das Substrat mit der Bindungsstelle in der katalytischen Domäne, wird das γ -Phosphat des ATP auf den Serin/ Threoninrest des Zielproteins katalysiert (Pfeifer et al., 1999).

Der Amino-Terminus steuert die 1) Dimerisierung der homologen Untereinheiten über den N-terminalen „Leucin/ Isoleucin-Reißverschluss“; 2) Hemmung und Aktivierung des katalytischen Zentrums; 3) Autophosphorylierungs-abhängige Aktivierung des Enzyms bei niedrigen cGMP-Konzentrationen und 4) subzelluläre Lokalisation des Enzyms (Feil et al., 2003; Hofmann, 2005; Schlossmann et al., 2005).

Die cGKI (\approx 75 kDa/ Monomer) ist ein Homodimer und liegt gelöst im Zytosol vor. Durch alternatives Spleißen zweier für den Amino-Terminus kodierender Exons entstehen die beiden Isoformen cGKI α und cGKI β . Die beiden Isoformen der cGKI unterscheiden sich hinsichtlich der Enzymaktivierung, der Verteilung im Gewebe und der Substratspezifität (Feil et al., 2003; Hofmann et al., 2000). Die cGKI α -Isoform wird bei etwa 10-fach geringerer Konzentration an cGMP aktiviert als die cGKI β (Ruth et al., 1991).

Hohe Mengen an cGKI wurden in Purkinje Zellen des Kleinhirns (Lohmann et al., 1981), in viszeralen und vaskulären glatten Muskelzellen (Keilbach et al., 1992) und in Thrombozyten (Waldmann et al., 1986) gefunden. Die cGKI wird auch im Hippocampus (Kleppisch et al., 1999), in Endothelzellen von Blutgefäßen (Draijer et al., 1995), im Herz (Kumar et al., 1999), in Zellen der Nierengefäße (Joyce et al., 1986), in Spinalganglien (Qian et al., 1996), in neuromuskulären Endplatten (Chao et al., 1997) und in neutrophilen Granulozyten (Pryzwansky et al., 1995) exprimiert.

Die cGKII (≈ 85 kDa/ Monomer) ist ebenfalls ein Homodimer und durch Myristoylierung in der Plasmamembran der Zelle verankert. Die cGKII wird in der Darmmucosa, in der Niere sowohl in Renin-sezernierenden juxtaglomerulären Zellen, im aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife als auch im Bürstensaum des proximalen Tubulus (Gambaryan et al., 1996), in Chondrozyten (Pfeifer et al., 1996) und weitverstreut im Gehirn nachgewiesen (de Vente et al., 2001; Werner et al., 2004). Im Darm ist die cGKII als Schlüsselprotein für die cGMP-regulierte intestinale Chlorid-Sekretion verantwortlich (Pfeifer et al., 1996; Vaandrager et al., 1997). In der Niere vermittelt die cGKII vermutlich die hemmenden Effekte von 8-Br-cGMP auf die Renin-Freisetzung (Wagner et al., 1998).

A.3. Regulation der Ca^{2+} -abhängigen und Ca^{2+} -unabhängigen Kontraktion des glatten Muskels

Die Kontraktion des glatten Muskels wird hauptsächlich durch Rezeptor- bzw. mechanisch-vermittelte Aktivierung der kontraktile Proteine Myosin und Aktin gesteuert. Der Schlüsselmechanismus zur Kontraktion der glatten Muskulatur ist die Phosphorylierung des Ser-19 der regulatorischen leichten Myosin-Kette (RLC); dies ermöglicht die Interaktion von Aktin und Myosin. Der ATP-abhängige Bindungszyklus von Aktin und Myosin führt zur Verkürzung des Sarkomers und somit zur Kontraktion der glatten Muskulatur (Webb, 2003). Die Eigenart des Myosinmoleküls, unter ATP-Verbrauch zwischen zwei Konformationszuständen zu wechseln, ist die Grundlage fast aller Bewegungsvorgänge im Tierreich.

Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Kontraktion der glatten Muskulatur. Ca^{2+} kann zum einen vom Extrazellulärraum, zum anderen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol der glatten Muskelzelle gelangen (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2003; McDaniel et al., 2001). Agonisten, wie beispielsweise Noradrenalin oder Angiotensin II, die an heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, lösen eine Ca^{2+} -abhängige Kontraktion am glatten Muskel aus. Die Ligandenbindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor

hat eine Aktivierung der heterotrimerischen G-Proteine zur Folge, welche wiederum die Phospholipase C β (PLC β) aktivieren (Ushio-Fukai et al., 1998; Wang et al., 2004; Xia et al., 2001). Die PLC β katalysiert die Bildung der Botenstoffe Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) (Filtz and Niibori, 2004). IP $_3$ vermittelt über Aktivierung des IP $_3$ -Rezeptors, einem Kanal des Sarkoplasmatischen Retikulums, den Ausstrom von Ca $^{2+}$ aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol (Bootman et al., 2002; Hisatsune et al., 2005). Die Agonisten-induzierte Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum löst einen kapazitativen Ca $^{2+}$ -Einstrom aus. Dieser Ca $^{2+}$ -Einstrom dient zur Wiederbeladung des leeren Sarkoplasmatischen Retikulums mit Ca $^{2+}$ und zur Aufrechterhaltung einer erhöhten zytosolischen Ca $^{2+}$ -Konzentration (McDaniel et al., 2001). Letztlich führt der Anstieg der zytosolischen Ca $^{2+}$ -Konzentration zur Aktivierung der Ca $^{2+}$ / Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosin-Kette (Schlossmann et al., 2003) (**Abbildung A-2**).

Der Phosphorylierungsgrad der RLC wird zudem von der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) reguliert. Die MLCP steuert die Relaxation der glatten Muskulatur durch Abspaltung der Phosphatgruppe von der RLC (Lee et al., 1997). Die MLCP ist ein Holoenzym und aus drei Untereinheiten zusammengesetzt: einer 37 bis 38 kDa schweren katalytischen Untereinheit (PP1c), einer 110-130 kDa schweren regulatorischen Untereinheit (MYPT1) und einer 20 kDa schweren Untereinheit unbekannter Funktion (Hartshorne, 1998; Kitazawa et al., 2003).

Die duale Regulation der RLC-Phosphorylierung durch Agonisten wird vermutlich über duales Koppeln von aktivierten Rezeptoren an G $_{q/11}$ - und G $_{12/13}$ -Proteinen vermittelt. Rezeptoragonisten können die glatte Muskulatur sowohl über den G $_{q/11}$ -vermittelten, als auch über den G $_{12/13}$ -vermittelten Signalweg kontrahieren, welcher den RhoA/ Rho-Kinase-Signalweg aktiviert (Gohla et al., 2000). Die Rho-Kinase phosphoryliert die MLCP und reduziert dadurch deren Enzymaktivität. Durch die Hemmung der MLCP wird der Phosphorylierungsgrad der RLC erhöht und führt zur Verstärkung der Kontraktion der glatten Muskulatur bei konstantem Ca $^{2+}$ -Spiegel (Bonnevier and Arner, 2004; Somlyo and Somlyo, 1998). Dieser Prozess wird auch Ca $^{2+}$ -Sensitisierung genannt. Darüberhinaus stellen die Phosphorylierung des Protein Kinase C-stimulierten Inhibitorproteins (CPI-17) (Eto et al., 1995; Kitazawa et al., 2000; Kitazawa et al., 2004) und die Arachidonsäure-induzierte Dissoziation der MLCP (Xiao et al., 2005) weitere Möglichkeiten zur Hemmung der Aktivität der MLCP dar. Die Phosphorylierung des CPI-17 wird neben der Protein Kinase C (Stevenson et al., 2004) auch von anderen Kinasen durchgeführt, unter anderem von der Rho-Kinase (Koyama et al., 2000) und der Protein Kinase N (Hamaguchi et al., 2000).

Desweiteren phosphorylieren vermutlich auch die „MYPT1-assoziierten“-Kinase (MacDonald et al., 2001) und die „integrin-linked“-Kinase (Deng et al., 2001) CPI-17. Das Gleichgewicht des Phosphorylierungsgrads der RLC wird sowohl durch den RhoA/ Rho-Kinase-Signalweg als auch durch das phosphorylierte CPI-17 in Richtung phosphorylierter RLC verschoben und so eine Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion am glatten Muskel induziert (Hofmann, 2005; Somlyo and Somlyo, 2000) (**Abbildung A-2**).

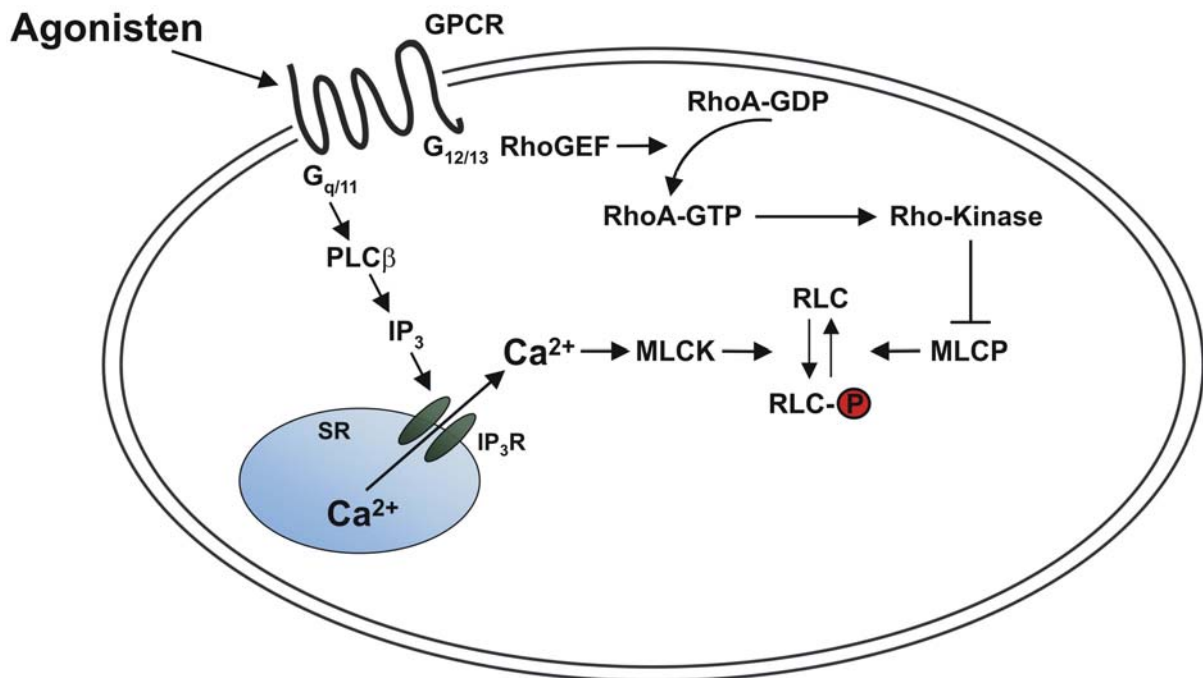


Abbildung A-2: Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion der glatten Muskulatur. Die Stimulation der $G_{q/11}$ -Proteine führt zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und Aktivierung der Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen MLCK. $G_{12/13}$ -Proteine aktivieren den RhoA/ Rho-Kinase-Signalweg und hemmen die Aktivität der MLCP. Beide Mechanismen bewirken die Erhöhung des phosphorylierten Zustands der RLC und führen zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Weitere Erklärungen im Text.

A.4. cGMP/ cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur

Die Relaxation der glatten Muskulatur durch den NO/ cGMP/ cGKI-Signalweg wird sowohl über Ca^{2+} -abhängige als auch Ca^{2+} -unabhängige Mechanismen vermittelt (Schlossmann et al., 2005). In **Abbildung A-3** sind die wichtigsten Angriffsziele der cGKI im glatten Muskel dargestellt.

Das überwiegend exprimierte Isoenzym der cGKI in der glatten Muskulatur ist die cGKIβ (Keilbach et al., 1992). Ein Angriffsziel der cGKIβ ist das kürzlich

entdeckte Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-assoziierte cGKI Substrat IRAG (Schlossmann et al., 2000). IRAG ist mit dem IP₃-Rezeptor und der cGKI β assoziiert. Die cGKI-abhängige Relaxation wird möglicherweise durch Phosphorylierung des Proteins IRAG vermittelt, das die Hormon-induzierte Ca²⁺-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum hemmt (Geiselhoring et al., 2004).

Ein weiterer Mechanismus, um die zytosolische Ca²⁺-Konzentration zu senken, ist die cGKI-vermittelte Phosphorylierung des Ca²⁺-abhängigen BK_{Ca}-Kanals (Alioua et al., 1998). Nach Phosphorylierung durch die cGKI wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca}-Kanals bei konstantem Ca²⁺ erhöht. Bei geöffnetem BK_{Ca}-Kanal kommt es durch den Kaliumausstrom zur Hyperpolarisation der Zelle. Nach Hyperpolarisation der Zelle werden spannungsaktivierte Ionenkanäle geschlossen, darunter auch der L-Typ-Ca²⁺-Kanal, wodurch der Ca²⁺-Einstrom in die Zelle verringert und die zytosolische Ca²⁺-Konzentration abgesenkt wird (Fukao et al., 1999; Taniguchi et al., 1993).

Die Phosphorylierung der PLC β 3 durch die cGKI führt vielleicht direkt zur Hemmung der IP₃-Synthese (Ruth et al., 1993; Xia et al., 2001). Ob diese Phosphorylierung eine Bedeutung für die Relaxation der glatten Muskulatur hat, ist bisher nicht bekannt.

Die Phosphorylierung von RGS-2-Proteinen („regulator of G-Protein-signaling (RGS) proteins“) durch die cGKI soll zur Relaxation der glatten Muskulatur führen (Tang et al., 2003). RGS-Domänen binden direkt an aktivierte G α -Untereinheiten und dienen als GTPase-aktivierende (GAPs) Proteine, die die Dauer des an die G α -Untereinheit gebundene GTP begrenzen (Hepler, 1999). Dies korreliert mit der gesteigerten Agonisten-induzierten IP₃-Bildung, die in RGS-2-deletierten Zellen gezeigt werden konnte (Wang et al., 2004).

Die Dephosphorylierung der RLC wird durch die MLCP gesteuert. Die Aktivierung der MLCP führt zur Desensibilisierung gegenüber Kalzium („Ca²⁺-Desensibilisierung“) und somit zur Relaxation des glatten Muskels (Bonnievier and Arner, 2004; Lee et al., 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass die cGKI α über den „Leucin-Reißverschluss“ mit der MYPT1-Untereinheit der MLCP interagiert und diese Interaktion zur Regulation des Tonus essentiell ist (Surks and Mendelsohn, 2003; Surks et al., 1999). Eine weitere Arbeit zeigt, dass die cGK die beiden regulatorischen Untereinheiten der MLCP phosphoryliert, jedoch ohne die Phosphataseaktivität gegenüber der RLC zu ändern (Nakamura et al., 1999). Die Hemmung der RhoA-induzierten Ca²⁺-Sensibilisierung durch die cGMP/ cGK-vermittelte Phosphorylierung von RhoA stellt einen weiteren Mechanismus zur Ca²⁺-Desensibilisierung dar (Sauzeau et al., 2000; Sawada et al., 2001). Dadurch wird vermutlich die MLCP nicht aktiviert, sondern vielmehr die Hemmung der MLCP reduziert (Ito et al., 2004). Telokin ist ein 17 kDa schweres, glattemuskelspezifisches Protein, welches mit

der C-terminalen Domäne der glattmuskulären MLCK identisch ist (Ito et al., 1989; Wu et al., 1998). Dieses Protein wird von der cAMP-abhängigen Protein Kinase und der cGK phosphoryliert und soll Ca^{2+} -Desensibilisierung durch die Aktivierung der MLCP induzieren (Choudhury et al., 2004; Wu et al., 1998). In einer weiteren Arbeit ist gezeigt, dass die cGMP/ cGK-Signalkaskade der Protein Kinase C (PKC)-vermittelten Phosphorylierung von CPI-17 und Ca^{2+} -Sensibilisierung entgegenwirken kann. Somit aktiviert die cGK vermutlich die MLCP und vermittelt die Ca^{2+} -Desensibilisierung über einen RhoA/ Rho-Kinase-unabhängigen Mechanismus (Bonnevier and Arner, 2004).

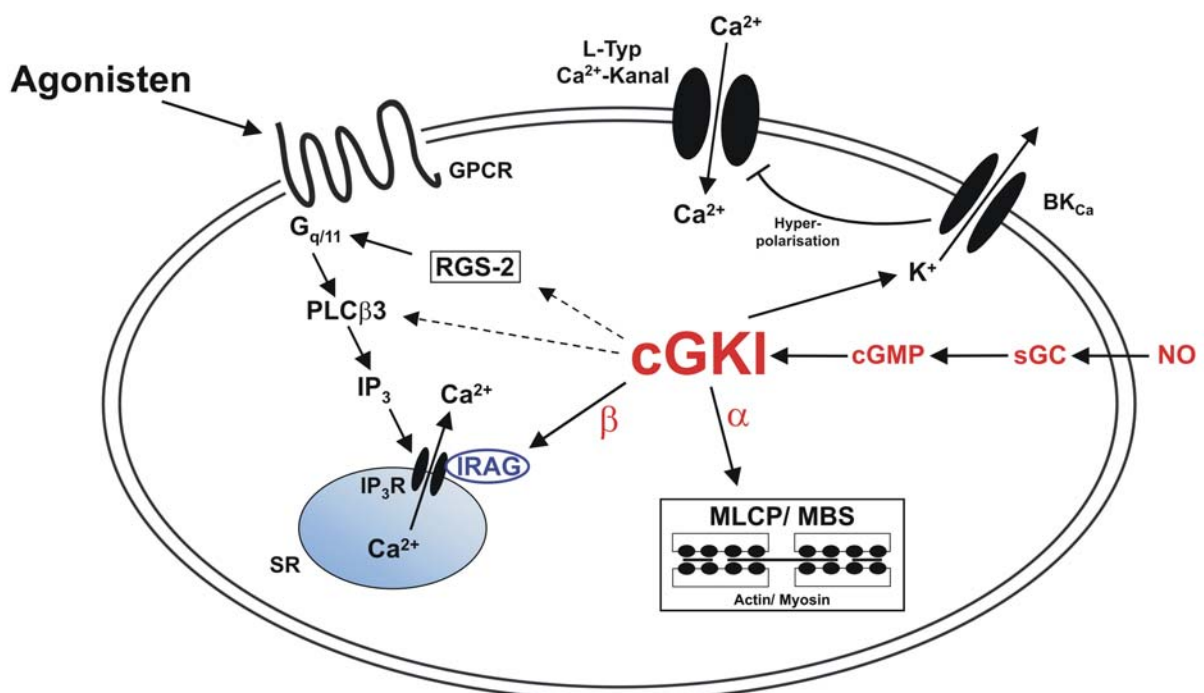


Abbildung A-3: Schematische Darstellung der NO/ cGMP/ cGKI-vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur. Mögliche Angriffsziele der cGKI sind der BK_{Ca} -Kanal, RGS-2, $\text{PLC}\beta_3$, IRAG und die MBS-Untereinheit der MLCP. Weitere Erklärungen im Text.

A.5. Ziele der Arbeit

Stickstoffmonoxid und die natriuretischen Peptide stimulieren über Aktivierung der löslichen und membrangebundenen Guanylatzyklase die Bildung von cGMP, welches Blutgefäße relaxiert und damit für die Senkung des Blutdrucks verantwortlich ist (Schlossmann et al., 2005). Die NO-induzierte Relaxation wird durch cGMP und Aktivierung der cGKI vermittelt, da dieser Effekt an $\text{cGKI}^{-/-}$ -Mäusen aufgehoben ist (Koeppen et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit untersucht funktionelle Mechanismen der cGMP-vermittelten Relaxation nach Hormon- und Kalium-abhängiger Stimulation mit Hilfe von genetisch modifizierten Mäusen. Dazu werden Tiere verwendet, bei denen die cGKI deletiert oder beide IRAG-Allele mutiert sind. Im Einzelnen soll die Beteiligung des cGMP/ cGKI-Signalwegs an der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts und des kontraktile Status der glatten Muskulatur untersucht werden. Um die physiologische Bedeutung der cGKI und des cGKI-Substratproteins IRAG für die Relaxation der glatten Muskulatur zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit isometrische Kraftmessungen durchgeführt und intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gemessen. Daneben wurde an der permeabilisierten Aorta der Ca^{2+} -unabhängige Mechanismus der Ca^{2+} -Desensibilisierung untersucht.

B. Material und Methoden

B.1. Bezugsquellennachweis der verwendeten Substanzen

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme aufgelistet:

α -Toxin (aus <i>Staphylococcus aureus</i>)	Sigma, www.sigma-aldrich.com
β -Escin	Sigma, www.sigma-aldrich.com
8-Bromoguanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat	Biolog, www.biolog.de
Bovines Serum Albumin Fraktion V	Roth, www.carl-roth.de
Dibutyryladenosen-3',5'-zyklisches Monophosphat	Biolog, www.biolog.de
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, www.invitrogen.com
Dithioerythritol	Roth, www.carl-roth.de
Ethylen Glykol-bis(2-aminoethylether)	
-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Fura-2/AM in Lösung	Calbiochem, www.merckbiosciences.de
Gadolinium(III)chlorid Hexahydrat	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Guanosin-5'-triphosphat	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)	Biolog, www.biolog.de
Hyaluronidase	Sigma, www.sigma-aldrich.com
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Karbachol	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Kollagenase F	Sigma, www.sigma-aldrich.com
N _ω -Nitro-L-Arginin-methylester Hydrochlorid	Sigma, www.sigma-aldrich.com
[-]-Noradrenalin	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Papain	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Papaverin Hydrochlorid	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, www.invitrogen.com
L-Phenylephrin Hydrochlorid	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat-abhängiger	
Protein Kinase Inhibitor, Fragment 5-24, Amide	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Thapsigargin	Alexis, www.alexis-e.biz
Trypanblau	Sigma, www.sigma-aldrich.com
U46619	Sigma, www.sigma-aldrich.com
Y-27632 Dihydrochlorid	Alexis, www.alexis-e.biz

B.2. Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammen aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Die Experimente werden mit genetisch veränderten Mauslinien und den dazugehörigen Kontrolltieren (Geschwister) jeweils beiderlei Geschlechts durchgeführt. Als genetisch veränderte Mauslinien werden zum einen die cGKI^{-/-}-Tiere (Pfeifer et al., 1998) und zum anderen die IRAG ^{Δ 12/ Δ 12}-Mausmutante (Geiselhöringer et al., 2004) verwendet. Den

cGKI^{-/-}-Mäusen wurde das Gen, das für das Protein cGKI codiert, inaktiviert. Beide Isoformen der cGKI (cGKI α und I β) werden in diesen Tieren nicht mehr exprimiert (Pfeifer et al., 1998). Die 3 bis 5 Wochen alten Wildtyp- und cGKI^{-/-}-Geschwisterpaare sind auf dem genetischen Hintergrund C57Bl/6 gezüchtet. Bei der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12}-Maus handelt es sich um eine Deletionsmutante, bei der das Exon 12 des *IRAG* Gens entfernt ist. Dieses Exon codiert für 47 Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Coiled-coil Domäne. Dadurch wird die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃ Rezeptor Typ 1 zerstört. Demzufolge ist das gebildete Protein um etwa 5 kDa kleiner als bei Wildtyp-Mäusen (Geiselhoringer et al., 2004). Die IRAG ^{Δ 12/ Δ 12}- und die dazugehörigen Kontrollmäuse sind auf dem genetischen Hintergrund 129/Sv gezüchtet. Die für die Messungen verwendeten Tiere sind im Alter zwischen 15 und 25 Wochen. Alle Versuche werden entsprechend den Deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

B.3. Isolierung und Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC für „Vascular Smooth Muscle Cells“) werden durch enzymatische Behandlung aus Aorten von adulten Mäusen gewonnen. Isolierte Einzelzellen werden in 12-Loch Platten mit Deckgläschen (20 mm Durchmesser) ausgesät. Die Kultivierung erfolgt in unterschiedlichen Zelldichten (10.000 bis 80.000 Zellen/ Deckgläschen) in Serum-haltigem DME-Medium bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid.

Lösungen zur Isolation:

PBS; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/ 500 ml
NaCl	135	4
KCl	3	0,1
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	8	0,72
KH ₂ PO ₄	2	0,12

Ca²⁺-freies Medium; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/l
Na-Glutamat	85	14,37
NaCl	60	3,5
HEPES	10	2,38
KCl	5,6	0,4
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1	0,2

Enzymlösung A; (frisch)

	mg/ ml	µl
Papain	7	100
BSA Fraktion V	100	10
DTT	100	10

ad 1 ml Ca²⁺-freies Medium und Sterilfiltration

Enzymlösung B; (frisch)

	mg/ ml	µl
Hyaluronidase	10	100
Kollagenase F	10	100
BSA Fraktion V	100	10

ad 1 ml Ca²⁺-freies Medium und Sterilfiltration

1 ml der Enzymlösungen A und B sind für etwa 10 Aorten ausreichend.

Serum-haltiges DME-Medium; (4 °C)

FCS	10 %
Penizillin	100 U/ ml
Streptomycin	100 µg/ ml

ad 500 ml DMEM

Durchführung der Isolation:

Die Aorten werden aus der Maus präpariert und in PBS unter dem Binokular von dem umgebenden Fettgewebe befreit. Die gesäuberten Aorten werden mit einer Schere zerkleinert und 40 min im Wasserbad bei 37 °C in Enzymlösung A inkubiert. Anschließend wird bei 300 x g für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Enzymlösung B aufgenommen. Es folgt eine etwa 20 minütige, zweite Inkubation bei 37 °C im Wasserbad, wobei die Zellen etwa alle 10 min durch mechanische Zerkleinerung zusätzlich vereinzelt werden. Die Inkubation wird durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium beendet, die Zellen mit 300 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in einer entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und die Vitalität mittels einer Trypanblaufärbung bestimmt. 45 µl Zellsuspension werden mit 5 µl einer 0,4 %igen Trypanblaulösung versetzt. Lebende Zellen bleiben ungefärbt

und lassen sich von den blau gefärbten, toten Zellen unterscheiden. Im Allgemeinen liegt die Ausbeute bei etwa 250.000 Zellen pro Aorta mit einer Vitalität von > 95 %. Nach Aussaat der Zellen auf den Deckgläschen wird das Medium alle zwei Tage gewechselt. Am Tag 5 bis 6 nach der Zellkultivierung beträgt die Konfluenz der glatten Gefäßmuskelzellen auf den Deckgläschen zwischen 70 und 80 %. Ab diesem Zeitpunkt wird das Kulturmedium der Zellen von Serum-haltigen zu Serum-freien DME-Medium gewechselt. Nach etwa 48-stündiger Kultivierung der VSMC in Serum-freiem DME-Medium werden die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Fura-2 (B.4.) durchgeführt.

B.4. Bestimmung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$

Die vorliegende Arbeit untersucht Änderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe des Indikatorfarbstoffs Fura-2.

B.4.1. Indikatorfarbstoff Fura-2

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 {1-[2-(5-Karboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure} (**Abbildung B-1A**) bindet Ca^{2+} in einem Verhältnis von 1:1 und verschiebt das Maximum der Fluoreszenzintensität zu einer anderen Anregungswellenlänge. Aus diesem Grund können die Messungen der Fluoreszenzintensität bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen durchgeführt werden (Moore et al., 1990).

Wird ein Ca^{2+} -Ion gebunden, so lagert es sich in einen Hohlraum aus vier Karboxylgruppen ein. Dadurch kommt es zu einer Veränderung in der Struktur der elektronischen Energieniveaus und somit zu einem veränderten Absorptionsverhalten von Fura-2. Der isosbestische Punkt liegt bei $357 \pm 0,5$ nm. Wird der Farbstoff bei dieser Wellenlänge angeregt, hat eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ keine Schwankung der Fluoreszenzintensität zur Folge. Wird mit einer kürzeren Wellenlänge angeregt, verstärkt sich mit zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ die Fluoreszenzintensität bei 510 nm, während sie für längere Anregungswellenlängen bei zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ abnimmt.

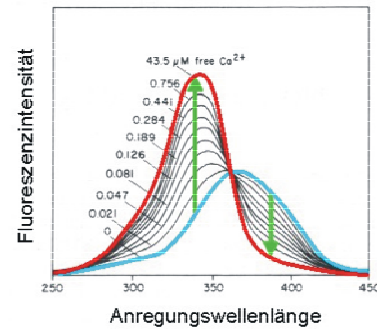
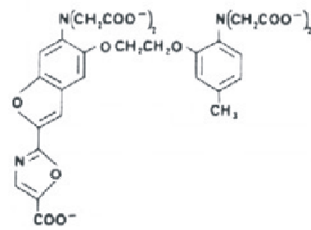


Abbildung B-1: (A) Strukturformel von Fura-2. (B) Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_E = 510$ nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und verschiedenen Kalziumkonzentrationen. Modifiziert nach Grynkiewicz et al., 1985.

Als Messgröße dient das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F_{350} und F_{380} , welche durch Anregung mit den Wellenlängen λ_{350} und λ_{380} bei 510 nm emittiert werden (**Abbildung B-1B**). Der Quotient $R = F_{350}/F_{380}$ ist somit proportional zur absoluten $[Ca^{2+}]$, und weitgehend unabhängig von Farbstoffkonzentration, Zeldicke und anderen variierenden Komponenten (Grynkiewicz et al., 1985).

Die Zellen werden mit Fura-2 als lipophiler, nicht fluoreszierender, membranpermeabler Azetoxymethylester (Fura-2-AM) inkubiert. Der Farbstoff kann in veresterter Form durch die Zellmembran in das Zytosol diffundieren. Intrazelluläre Esterasen spalten hydrolytisch die Azetoxymethylestergruppen, zurück bleibt eine Ca^{2+} -sensitive, freie Säure, die als membranimpermeables Produkt nicht mehr aus der Zelle entweichen kann (Moore et al., 1990).

B.4.2. Versuchsausrüstung

Die verwendete Versuchsausrüstung basiert auf einem Monochromator mit integrierter Lichtquelle (Polychrom IV, TILL Photonics). Das monochromatische Licht wird über einen Epifluoreszenzkondensator zu einem inversen Mikroskop (Axiovert 35M, Zeiss) geleitet und die Fluoreszenzsignale über eine Peltierelement-gekühlte CCD-Kamera (IMAGO CCD, TILL Photonics) detektiert. Die Steuerung des gesamten Systems, sowie die Messungen, erfolgen mit dem Programm Vision 4.0 (TILL Photonics).

Bei den Messungen werden die Zellen mit den Exzitationswellenlängen λ_{350} und λ_{380} 1 x pro Sekunde für 20 msec belichtet. Dabei kann, durch die bei jeder Messung individuell bestimmten „Regions of Interest“ (ROI), die mittlere Fluoreszenzintensität von mehreren Zellen ermittelt werden.

Für die Messungen der mit den glatten Muskelzellen bewachsenen Deckgläschen werden spezielle Messkammern verwendet. Diese können einerseits das Plättchen aufnehmen, andererseits in das Mikroskop eingesetzt werden. Es wird mit vier Messkammern gearbeitet. Zwei Deckgläschen mit jeweils einem Genotyp von Zellen

werden parallel mit Fura-2-AM beladen und anschließend für die Messung verwendet. Durch den Einsatz von vier Messkammern ist ein kontinuierlicher Messablauf gewährleistet.

Die Applikation der Testsubstanzen während einer Messung erfolgt entweder über eine Glaskapillare oder über das Einwaschen direkt in die Zellbadlösung mittels einer Pumpe (Ismatec Vario Pumpsystem). Das Hormon Noradrenalin ($0,5 \mu\text{M}$) wird über eine Glaspipette, die über einen Kunststoffschlauch mit einer Spritze als Hormonreservoir verbunden ist, appliziert. Die Zellen werden nur für etwa 1 bis 2 sec mit dem Hormon stimuliert. Als optimales Hormonreservoir wird in den durchgeführten Experimenten eine 5 ml Spritze ohne Stempel verwendet.

Die Dosierung des Hormons erfolgt mittels eines Dreiwegehahns, wobei nach Öffnen etwa $50 \mu\text{l}$ der Hormonlösung lokal auf die Zelle appliziert werden. Die 85 mM haltige Kalium-Tyrode, 8-Br-cGMP (1 mM) und Thapsigargin (5 nM) werden dagegen über eine Pumpe, die mittels einem Kunststoffschlauch mit einem Vorratsbehälter verbunden ist, auf die Zellen eingewaschen.

Die Messdaten werden auf der Festplatte des Computers (DELL Optiplex GX110) abgespeichert und anschließend mit dem Programm Origin 6.1 (OriginLab Corporation) weiterverarbeitet.

B.4.3. Vorbereitung und Durchführung der Messungen

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Zellen werden in Blindversuchen gemessen und ausgewertet, um eine möglichst hohe Objektivität in den Experimenten zu gewährleisten. Um den Effekt einer Testsubstanz auf den Hormon-induzierten Ca^{2+} -Transienten zu untersuchen, wird jede Zelle zweifach stimuliert. Die Testsubstanz wird kurz vor der zweiten Stimulation ins Zellbad eingewaschen. Das Verhältnis aus der Fläche des zweiten zum ersten Ca^{2+} -Transienten (100%) dient als Maß für die relative Wirksamkeit einer Testsubstanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch diese „interne“ Standardisierung werden die Messungen von Schwankungen in der Ca^{2+} -Freisetzung von Zelle zu Zelle unabhängig.

Bei den Kalium-induzierten Ca^{2+} -Signalen handelt es sich um kein transientes, sondern um ein stabiles Ca^{2+} -Signal. Aus diesem Grund kann die Wirkung einer Testsubstanz direkt auf das stabile Ca^{2+} -Signal untersucht werden. Dabei stellt das basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der VSMC den unteren Bezugspunkt (0%) und das stabile Kalium-induzierte Ca^{2+} -Signal den oberen Bezugspunkt (100%) der Messung dar. Der Effekt der Testsubstanz errechnet sich aus dem Verhältnis des Kalium-induzierten Ca^{2+} -Signals nach Applikation der Testsubstanz zum stabilen Ca^{2+} -Signal. In dieser Arbeit werden für die Kalium-induzierten Kalziummessungen unterschiedliche DME-Medien verwendet. Zur Kultivierung der glatten Muskelzellen wurde einerseits das Kulturmedium der Firma Gibco, zum anderen das der

Firma PAA eingesetzt. Der 8-Br-cGMP-Effekt auf das Kalium-vermittelte Ca^{2+} -Signal ist abhängig von dem zur VSMC-Kultivierung verwendeten DME-Medium.

Vor Beginn der Messungen werden die auf Deckgläschen angewachsenen Zellen zunächst mit Fura-2-AM (2,5 μM) beladen. Dazu werden die Deckgläschen in die dafür vorgesehenen Messkammern gespannt und mit je 500 μl der Fura-2-AM-Beladungslösung überschichtet. Es erfolgt eine einstündige Inkubation bei RT im Dunkeln mit anschließendem Auswaschen durch Tyrodelösung. Während eine Messkammer zur Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in die vorgesehene Aussparung des Mikroskops eingespannt wird, erfolgt die Aufbewahrung der übrigen Messkammer im Dunkeln bei RT für maximal 1 h.

Lösungen für Kalziummessungen:

Tyrode; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/l
NaCl	140	8,18
KCl	5	0,37
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2	0,294
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2	0,296
HEPES	5	1,19
D-(+)-Glukose	10	1,8

Kalium-Tyrode; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/l
NaCl	57	3,33
KCl	85	6,33
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2	0,294
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2	0,296
HEPES	5	1,19
D-(+)-Glukose	10	1,8

Stammlösungen:

Fura-2-AM-Beladungslösung; (frisch)

Fura-2-AM (1 mM)	2,5 μl
BSA Fraktion V	1 %

ad 1 ml Tyrodelösung

Noradrenalin-Stammlösung; (- 20 °C)

<u>[-]-Noradrenalin</u>	<u>1 mM</u>
-------------------------	-------------

in H₂O gelöst**8-Br-cGMP-Stammlösung; (- 20 °C)**

<u>8-Br-cGMP</u>	<u>100 mM</u>
------------------	---------------

in H₂O gelöst**Thapsigargin-Stammlösung; (- 20 °C)**

<u>Thapsigargin</u>	<u>1 mM</u>
---------------------	-------------

in DMSO gelöst

BSA (20 %)-Stammlösung; (- 20 °C)

<u>BSA Fraktion V</u>	<u>2 g</u>
-----------------------	------------

ad 10 g H₂O

B.4.4. Auswertung

Die Messdaten werden auf der Festplatte des zur Versuchsanordnung angeschlossenen Computers abgespeichert und in das Excel-Format konvertiert. In dieser Form können die Dateien mit dem Programm Origin 6.1 weiterverarbeitet werden. Mittels Integration wird die Fläche unter jedem Ca²⁺-Transienten („area under curve“/ AUC) bestimmt und das Verhältnis wie folgt berechnet:

$$\text{AUC des 2. Transienten} / \text{AUC des 1. Transienten} * 100 \%$$

B.5. Kraftmessung am glatten Muskel

Die isometrische Kraftentwicklung von Muskelpräparaten wird mit einem induktiven Kraftmesser (Myograph601, Danish Myo Technology www.dmt.dk) und einem Datenerfassungssystem durchgeführt. Unter isometrischen Bedingungen kann das Verengen des Gefäßlumens der Ringmuskelpräparate verhindert werden. Zur Bestimmung der optimalen Vordehnung wurde eine Ruhe-Dehnungs-Kurve erstellt (**Abbildung B-2**). Aus **Abbildung B-2** ergibt sich ein optimaler Bereich zur Vordehnung der Präparate von 0,04-0,09 g (\equiv 4-9 mN).

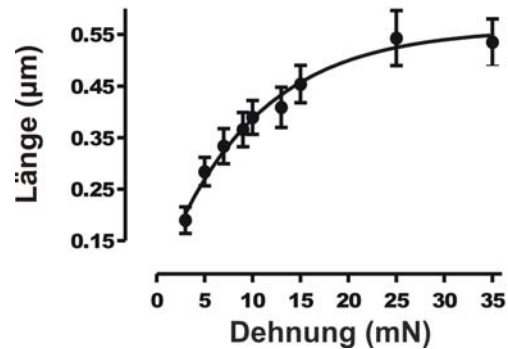


Abbildung B-2: Ruhe-Dehnungskurve des glattmuskulären Aortenrings der Maus. Die Kraft, die vom Gewebe entwickelt wird, ist gegen die durchschnittliche, passive Längendehnung aufgetragen. Jeder Punkt des Graphen kennzeichnet den Mittelwert mit Standardabweichung (\pm SEM). Die Zahl der durchgeführten Experimente beträgt 10-21.

B.5.1. Isolierung von Gefäßsegmenten der Aorta thoracalis der Maus

Die Mäuse werden durch transzervikale Dislokation euthanasiert und auf dem Rücken fixiert. Die Aorta thoracalis wird unter Vermeidung von Zug und Druck entnommen und in einer mit Tyrode-Pufferlösung gefüllten Petrischale von umgebenden Fett- und Bindegewebe gelöst. Die Tyrode-Pufferlösung wurde zuvor in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Über eine Kanüle wird die freipräparierte Aorta mit der Pufferlösung durchgespült und das Gefäß in etwa 5 mm lange Ringsegmente geschnitten. Das Endothel wird durch mechanische Einwirkung zerstört, indem eine gebogene Kanülenspitze vorsichtig entlang der inneren Gefäßwand gezogen wird. Der Erfolg der Endothelzerstörung ist mittels Applikation von 10 μ M Karbachol, ein gegen Cholinesterasen resistenter Muscarinrezeptor-Agonist, untersucht worden. Bei intaktem Endothel bewirken cholinerge Substanzen, die am Muscarinrezeptor angreifen, eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Furchgott and Zawadzki, 1980). Die Karbachol-induzierte Relaxation ist Endothel-abhängig, da nach mechanischer Zerstörung des Endothels diese Relaxation aufgehoben ist und selektiv die Erfassung der NO-medierten Vasorelaxation gewährleistet werden kann, unabhängig von der Relaxation durch den endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (**Abbildung B-3**).

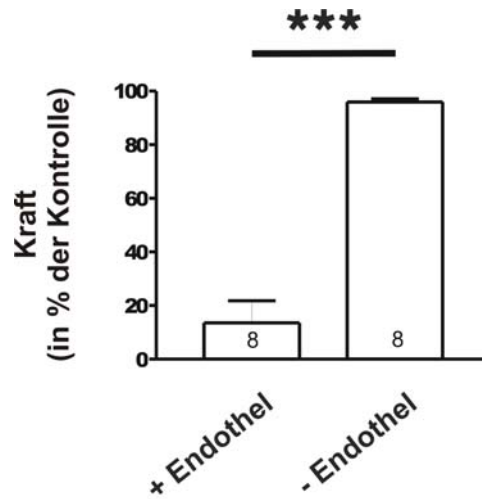


Abbildung B-3: Effekte von Karbachol (10 μ M) auf den Phenylephrin-induzierten Gefäßtonus in Abhängigkeit des Gefäßendothels. Die Säulen kennzeichnen den Mittelwert mit Standardabweichung (\pm SEM). Die Zahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben.

Eine andere Möglichkeit, die Zerstörung des Endothels zu überprüfen, ist die Verwendung des eNOS-Inhibitors N_ω-Nitro-L-Arginin-methylester (L-NAME, 100 μ M). Es zeigt sich, dass bei intaktem Endothel eine L-NAME-induzierte Kontraktion festzustellen ist (**Abbildung B-4**).

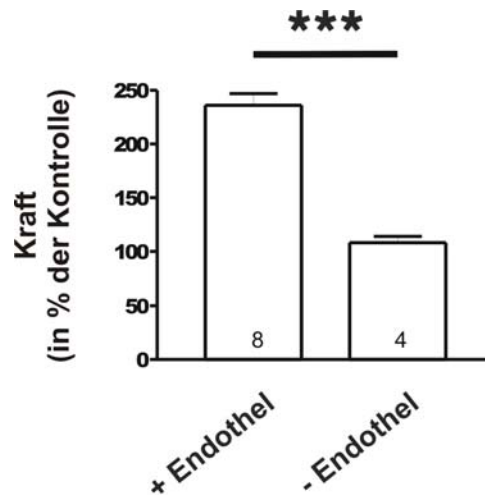


Abbildung B-4: Effekte von L-NAME (100 μ M) auf den Phenylephrin-induzierten Gefäßtonus in Abhängigkeit des Gefäßendothels. Die Säulen kennzeichnen den Mittelwert mit Standardabweichung (\pm SEM). Die Zahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben.

Stammlösungen:**Carbachol-Stammlösung; (4 °C)**

Karbachol	1 mM
-----------	------

in H₂O gelöst**L-NAME-Stammlösung; (- 20 °C)**

L-NAME	10 mM
--------	-------

in H₂O gelöst

Die isolierten Muskelpräparate werden zur isometrischen Kraftmessung zwischen einem fixierten Metallhaken und einem Kraftaufnehmer eingespannt. Das mit der Tyrodelösung befüllte Organbad wird mit einer Heizung konstant auf 37 °C gehalten und mit Karbogen, einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid, begast. Somit kann ein stabiler pH-Wert von 7,0 gewährleistet werden. Für die Untersuchungen an permeabilisiertem Gewebe wird eine auf pH 7,4 eingestellte Relaxationslösung mit HEPES-Puffer verwendet. Die Relaxationslösung (siehe B.5.2.2.) wird bei konstant eingestellter Raumtemperatur von 20 °C mit 100 % medizinischem Sauerstoff begast.

B.5.2. Durchführung der Versuche**B.5.2.1. Isometrische Kraftmessungen an intaktem Gewebe**

Die durch α -Agonisten-induzierte Kontraktionskraft ist von der angelegten Vordehnung des Muskels abhängig (Mulvany, 1988). Nach Einbringen der Aortenringe in das mit 5 ml Tyrode gefüllte Organbad werden die Muskelpräparate schrittweise auf 0,05 g vorgedehnt, um eine für die maximale Kontraktion optimale Vorspannung zu erhalten. Anschließend werden die Aortenringe für etwa 45 min im Organbad äquilibriert und gegebenenfalls die Organlast nachreguliert. Nach Erreichen des stabilen Ausgangsniveaus wird mit den Kontraktionsversuchen begonnen. Es wird entweder durch Applikation des α -Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin (3 μ M), durch Wechsel des Organbadpuffers mit 85 mM haltiger Kalium-Tyrode oder durch Zugabe des Inhibitors der sarko-endoplasmatischen Ca²⁺-ATPase Thapsigargin (2 μ M) ein stabiler Gefäßtonus des Muskelpräparats erzeugt. Das Maximum der erzeugten Kontraktion wird als Bezugspunkt auf 100 % gesetzt.

Lösungen für Kontraktionsmessungen:**Tyrode; pH 7,4; (4 °C)**

	mM	g/l
NaCl	137	8
KCl	5,4	0,4
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,8	0,265
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1	0,2
NaHCO ₃	12	1
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,42	0,058
D-(+)-Glukose	5,6	1

Kalium-Tyrode; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/l
NaCl	57	3,33
KCl	85	6,33
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,8	0,265
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1	0,2
NaHCO ₃	12	1
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,42	0,058
D-(+)-Glukose	5,6	1

Auf den stabilen Gefäßtonus wird das membrangängige cGMP-Analogon 8-Br-cGMP (300 µM) oder Y-27632 (10 µM) gegeben. Zur Definition des Nullbezugpunkts werden die Aortenringe mit IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, 100 µM) oder Gadolinium (100 µM) maximal relaxiert. Das Ausmaß des Effekts einer Testsubstanz wird aus dem Verhältnis der Kontraktion in Gegenwart der Testsubstanz zur stabilen Tonusphase bestimmt. Bei den Untersuchungen des 8-Br-cGMP-Effekts auf die Hormon-induzierte Kontraktionsamplitude wird nach beginnender Vordehnung und Äquilibrierung mit Phenylephrin eine stabile Kontraktion erreicht, deren Amplitude als Bezugspunkt auf 100 % gesetzt wird. Das Hormon wird 6 x mit je 5 ml Pufferlösung ausgewaschen. Nach Abfall des Tonus auf die anfängliche Plateauphase wird 8-Br-cGMP für 10 min vorinkubiert und eine zweite Hormon-induzierte Stimulation durchgeführt. Die Amplitude der zweiten Hormon-induzierten Stimulation in Bezug auf die der ersten Stimulation ergibt den Effekt von 8-Br-cGMP auf die Kontraktionsamplitude.

Stammlösungen:**Phenylephrin-Stammlösung; (4 °C)**

L-Phenylephrin *	1 mM
HCl	

gelöst in H₂O**IBMX-Stammlösung; (- 20 °C)**

IBMX	100 mM
------	--------

gelöst in DMSO

Gadolinium-Stammlösung; (RT)

GdCl ₃ * 6H ₂ O	100 mM
---------------------------------------	--------

gelöst in H₂O**B.5.2.2. Isometrische Kraftmessungen an permeabilisiertem Gewebe**

Die Ringmuskelsegmente werden in die mit 4 ml Relaxationslösung gefüllten Organbäder gegeben. Nach schrittweiser Vordehnung der Gefäßringe auf 0,04 g werden diese etwa 45 min äquilibriert. Anschließend wird die Permeabilisierung der Aorta mit 60-minütiger α -Toxin- (530 units/ ml) oder mit 30-minütiger β -Escin- (60 μ M) Inkubation erreicht. Im Anschluß an die Permeabilisierung wird das Organbad mit einer auf eine bestimmte freie Ca²⁺-Konzentration eingestellte Relaxationslösung versetzt, um einen Ca²⁺-induzierten Tonus auszulösen. Die freien Ca²⁺-Konzentrationen werden mit dem speziell entwickelten Programm Bound And Determined 4.35 errechnet (Brooks and Storey, 1992). Der Tonus, der sich nach Einwaschen einer definierten Ca²⁺-Konzentration ausbildet, dient zudem als Positivkontrolle der Permeabilisierung. Die Ca²⁺-Sensitisierungen werden mit GTP γ S (50 μ M) und den Agonisten Phenylephrin (10 μ M) bzw. dem Thromboxan-Analogon U46619 (30 μ M) durchgeführt. GTP (100 μ M) wird unmittelbar vor Phenylephrin- bzw. U46619-induzierter Ca²⁺-Sensitierung appliziert. Bei Experimenten mit dem Protein Kinase A-Inhibitorpeptid werden die Aorten mit β -Escin permeabilisiert, welches für die intrazelluläre Diffusion des Inhibitorproteins ausreichend große Poren in der Membran bildet (Kobayashi et al., 1989). Vor Ca²⁺-Sensitierung mit U46619 wird zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsseiten 0,04 ‰ bovines Serumalbumin in das Organbad appliziert. Die Permeabilisierung des Muskelsegments mit β -Escin und die Zugabe von BSA in das Organbad führen zu einem verstärkten Signalrauschen bei der Ca²⁺-Sensitierung mit dem Thromboxan-Analogon. Auf den Gefäßtonus werden bei konstant eingestellter Ca²⁺-Konzentration verschiedene gefäßdilatierend wirkende Substanzen appliziert. Jede Substanz wird bis zur Ausbildung eines

stabilen Tonus inkubiert. Das in den permeabilisierten, glatten Muskelzellen verbleibende, freie Ca^{2+} wird durch 6 x Auswaschen einer 1 mM EGTA-haltigen Ca^{2+} -freien-Tyrodelösung, gefolgt von einer 25 mM EGTA-haltigen Ca^{2+} -freien-Tyrodelösung, gebunden, um wieder das Basalplateau zu erreichen.

Lösungen für Kontraktionsmessungen:

Relaxationslösung; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/ l
NaCl	97	5,68
KCl	5,4	0,4
MgCl ₂ * 6H ₂ O	6,47	1,28
HEPES	10	2,38
D-(+)-Glukose	5,6	1
EGTA	5	1,9
DTT	0,1	15,4 mg/ l
Na ₂ ATP	5,5	100 ml/ l
Na ₂ CP * 4H ₂ O	9,5	3,11
Reduziertes L-Glutathion	5	1,54

Na₂ATP (55 mM)-Stammlösung: siehe unten

Ca²⁺-freie-EGTA-Tyrode; pH 7,4; (4 °C)

	mM	g/ l
NaCl	137	8
KCl	5,4	0,4
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1	0,2
HEPES	10	2,38
D-(+)-Glukose	11,2	2
EGTA	1	0,38

Stammlösungen:

α-Toxin-Stammlösung; (- 20 °C)

α-Toxin	70 units/ µl Stammlösung
BSA Fraktion V	0,04 ‰
gelöst in H ₂ O	

β-Escin-Stammlösung; (- 20 °C)

β-Escin	50 mM
BSA Fraktion V	0,04 ‰

gelöst in H₂O**U46619-Stammlösung; (- 20 °C)**

U46619	30 mM
BSA Fraktion V	0,04 ‰

gelöst in Methylazetat

GTP_γS-Stammlösung; (- 20 °C)

GTP _γ S	10 mM
--------------------	-------

gelöst in H₂O**PKA-Inhibitor-Stammlösung; (- 20 °C)**

Protein Kinase- Inhibitor, Fragment 5-24	1 mM
--	------

gelöst in H₂O**GTP-Stammlösung; (- 20 °C)**

GTP	10 mM
-----	-------

gelöst in H₂O**Y-27632-Stammlösung; (- 20 °C)**

Y-27632 * 2HCl	10 mM
----------------	-------

gelöst in H₂O**Papaverin-Stammlösung; (- 20 °C)**

Papaverin * HCl	50 mM
-----------------	-------

gelöst in H₂O**Na₂ATP-Stammlösung; (- 20 °C)**

Na ₂ ATP	55 mM
---------------------	-------

gelöst in H₂O**BSA (2 %)-Stammlösung; (- 20 °C)**

BSA Fraktion V (20 %)	20 µl
--------------------------	-------

ad 200 µl H₂O

B.5.3. Auswertung der Versuche

Die Experimente werden mit Hilfe von Origin 6.1 ausgewertet. Zur Erstellung der Balkendiagramme und Graphiken wird das Programm GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software) verwendet. Die Werte aus den Kraftmessungen werden auf die Länge der Präparate bezogen in [N/ m].

B.6. Statistische Methoden

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Original-Registrierung oder Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Signifikanz der Daten wird mit dem Student's t-Test für ungepaarte Daten berechnet, wobei n die Anzahl der Messwerte angibt. Der Student's t-Test dient zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten. Ein Sternchen (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten an. Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in p angegeben, wobei $p < 0,05$ signifikant (*), $p < 0,01$ sehr signifikant (**) und $p < 0,001$ (***) extrem signifikant bedeutet. Die Berechnungen der Signifikanz, des Mittelwerts und der Standardabweichung werden mit Hilfe von GraphPad Prism 3.0 erstellt.

C. Ergebnisse

Zur Untersuchung der Mechanismen der cGMP/ cGKI-vermittelten Vasorelaxation werden in dieser Arbeit sowohl Kontraktionsmessungen an intakten und permeabilisierten Aortenringen als auch Kalziummessungen an kultivierten, glatten Muskelzellen der Aorta, sogenannte VSMCs, mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

C.1. Effekte von 8-Br-cGMP auf Hormon-induzierte Kontraktion und Ca^{2+} -Signale

C.1.1. Kontraktionsmessungen

C.1.1.1. 8-Br-cGMP-Effekt auf den Phenylephrin-induzierten Tonus

Die Wirkung des membrangängigen, zyklischen Nukleotids 8-Br-cGMP wird nach Phenylephrin-induzierter Kontraktion an der Aorta von mehreren Mauslinien (Wildtyp-, cGKI^{-/-}-Tiere und die IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausmutante) untersucht. Auf die stabile Plateauphase des Agonisten-vermittelten Tonus (3 μM) wird 8-Br-cGMP (300 μM), das nur langsam von Phosphodiesterasen abgebaut wird (Zimmerman et al., 1985), appliziert. 8-Br-cGMP vermittelt an der Aorta von Wildtyp-Mäusen einen stark relaxierenden Effekt auf den Hormon-induzierten Tonus (**Abbildung C-1**). Dagegen ist der Effekt von 8-Br-cGMP am Gefäß der cGKI^{-/-}-Maus vollständig aufgehoben (**Abbildung C-1**). Im Vergleich zum 8-Br-cGMP-Effekt an der Wildtyp-Aorta ist die Relaxation des zyklischen Nukleotids am IRAG^{Δ12/Δ12}-Aortenring gestört. Das cGMP-Analogon relaxiert den Gefäßtonus der IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausmutante im Vergleich zum Tonus der cGKI^{-/-}-Maus noch geringfügig, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (**Abbildung C-1**).

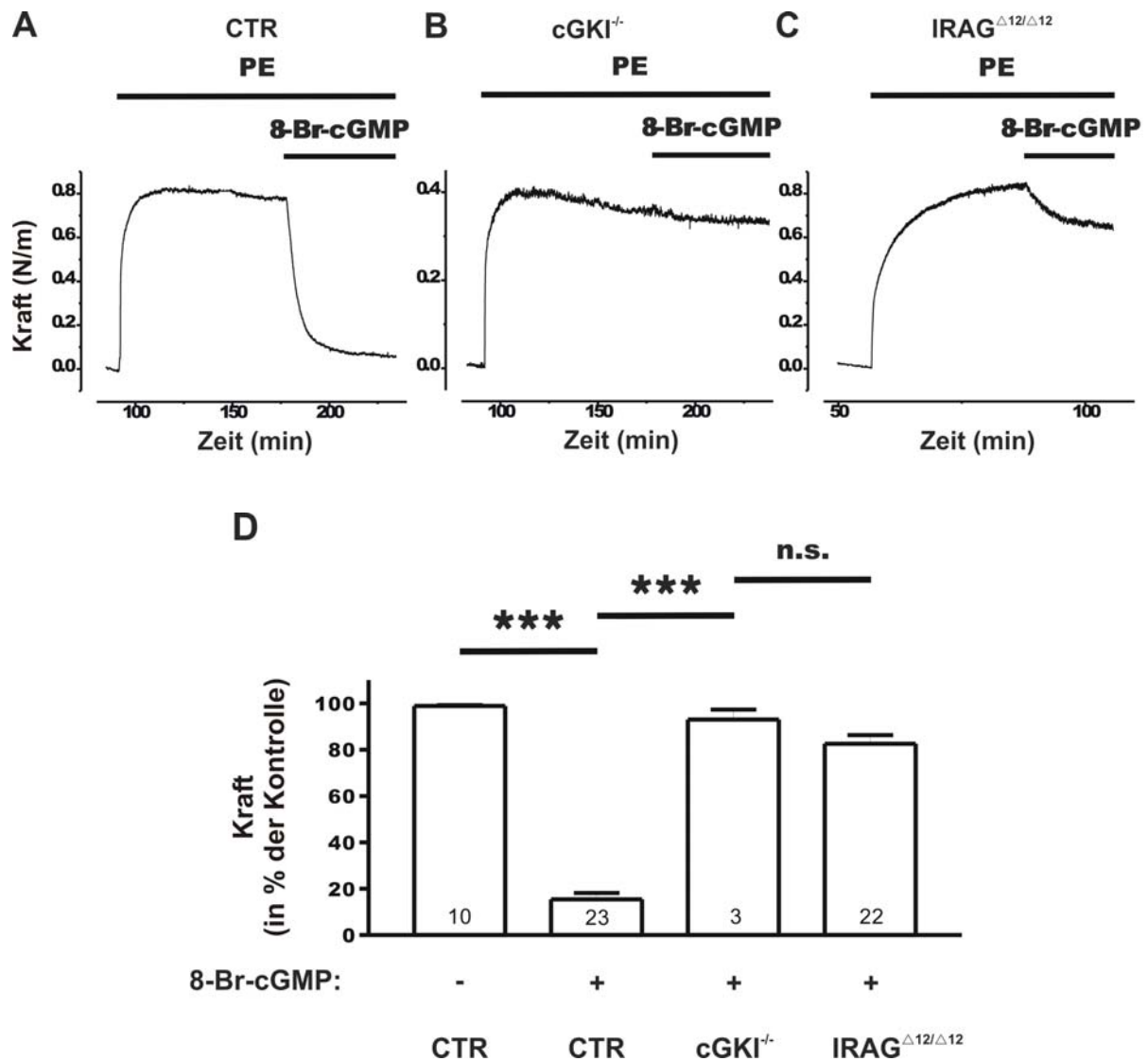


Abbildung C-1: Effekt von 8-Br-cGMP auf den Phenylephrin-induzierten Tonus. Originalregistrierungen von (A) Wildtyp-, (B) cGKI^{-/-}- und (C) IRAG^{Δ12/Δ12}-Aortenringen. Die Balken deuten die Anwesenheit von Phenylephrin (3 μM) und 8-Br-cGMP (300 μM) an. (D) Histogramm aller Effekte auf den Phenylephrin-induzierten Gefäßtonus in Ab- und Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Die Werte in Abwesenheit des cGMP-Analogons wurden 30 Minuten nach Erreichen der Plateauphase des Hormon-induzierten Tonus bestimmt. Die Säulen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (± SEM) dar. Die Anzahl der untersuchten Aortenringe ist in den Säulen angegeben. PE: Phenylephrin; *** $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant

C.1.1.2. 8-Br-cGMP-Effekt auf die repetitive Hormon-vermittelte Muskelkontraktion

Die Aorta der Maus lässt sich mehrfach mit Phenylephrin kontrahieren; die Amplitude der Kontraktion kann reproduzierbar ausgelöst werden, wenn der Agonist nach jeder Hormon-induzierten Stimulation wieder ausgewaschen wird. Das Beispiel eines zweifach mit Phenylephrin stimulierten Aortenrings ist in **Abbildung C-2** gezeigt.

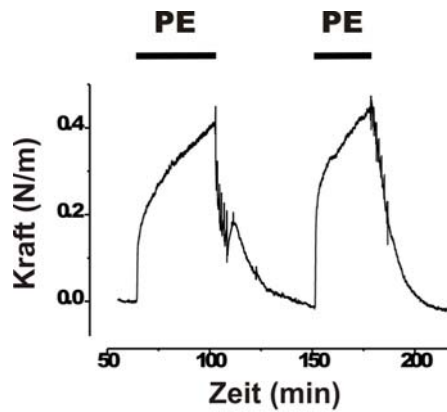


Abbildung C-2: Reproduzierbares Auslösen der Hormon-induzierten Kontraktionsamplitude am Aortenring der Maus. Das Originalbeispiel zeigt zweimal eine Phenylephrin-induzierte Kontraktionsamplitude. Zwischen den beiden Phenylephrin-vermittelten Kontraktionen erfolgt die Hormonauswaschphase. Die Balken deuten die Anwesenheit von Phenylephrin (3 μ M) an. PE: Phenylephrin

Die „interne Standardisierung“ dient zum Ausgleich der variierenden kontraktilen Antwort der Muskelpräparate. Um die Effekte von Testsubstanzen zwischen den Muskelpräparaten zu vergleichen, wird zur „internen Standardisierung“ zweimal ein Phenylephrin-induzierter Tonus ausgelöst. Die erste Phenylephrin-vermittelte Kontraktionsamplitude dient als Referenz. Ohne Zugabe einer Testsubstanz beträgt die zweite Hormon-induzierte Kontraktionsamplitude etwa 102 % der ersten Amplitude (**Abbildung C-2** und **Abbildung C-3D**). Die Kontraktionsamplitude der Wildtyp-Gefäße wird nach der zweiten Stimulation in Gegenwart von 300 μ M 8-Br-cGMP signifikant unterdrückt (**Abbildung C-3A**). Dagegen ist die Amplitude der Hormon-induzierten Kraftausbildung nach Inkubation von 8-Br-cGMP im cGKI^{-/-}-Tier und der IRAG ^{Δ 12/ Δ 12}-Mausmutante nicht unterdrückt (**Abbildung C-3B,C**).

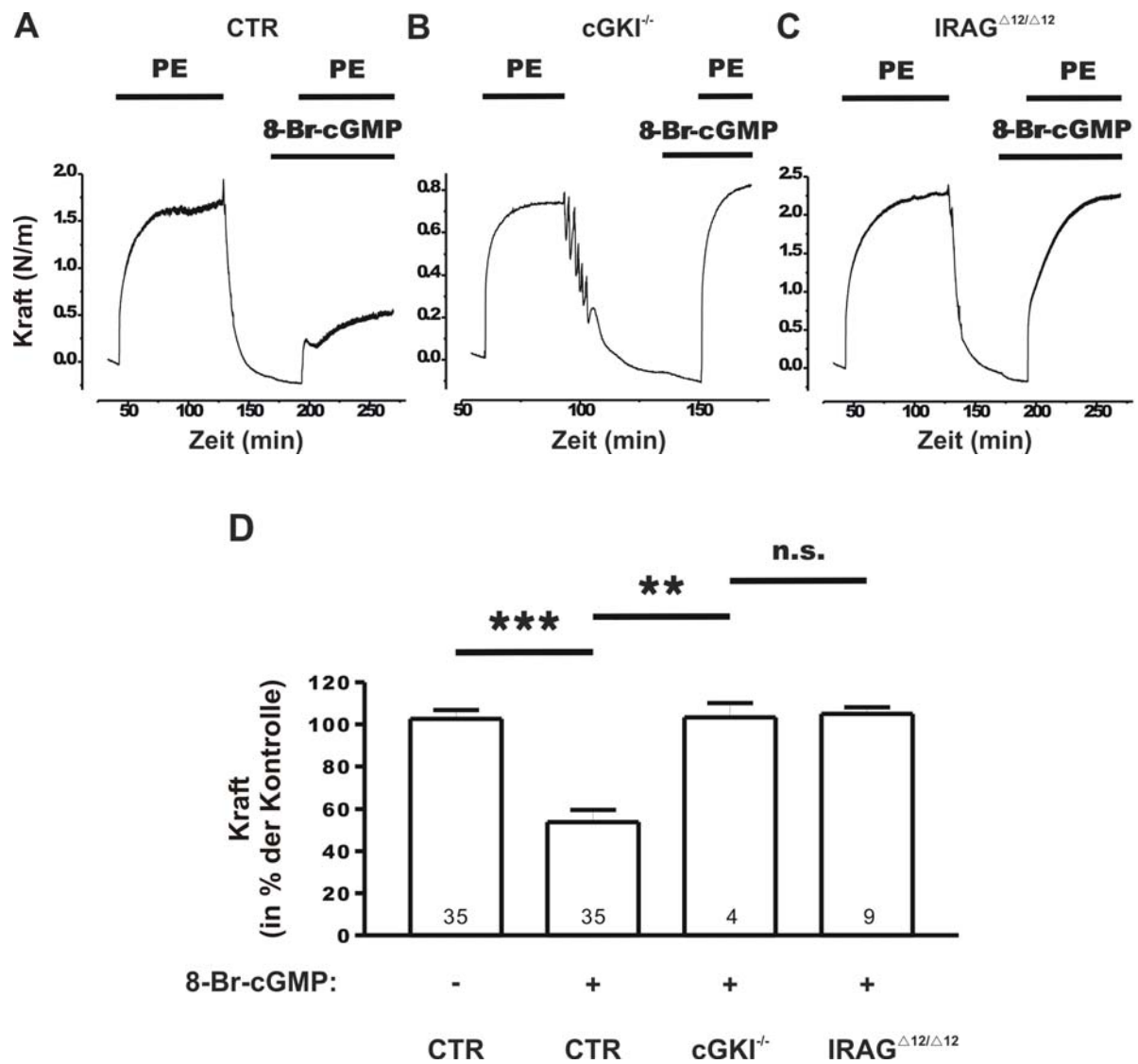


Abbildung C-3: Effekt von 8-Br-cGMP auf die Hormon-induzierte Kontraktionsamplitude. Originalaufzeichnungen von (A) Wildtyp-, (B) cGKI^{-/-}- und (C) IRAG^{Δ12/Δ12}-Aortenringen. 8-Br-cGMP (300 μM) wird vor der zweiten Hormon-vermittelten Stimulation inkubiert und bewirkt eine leichte Relaxation des Basaltonus. Die Balken deuten die Anwesenheit von Phenylephrin (3 μM) und 8-Br-cGMP an. (D) Histogramm aller untersuchten Effekte auf die Hormon-induzierte Kontraktionsamplitude in Ab- und Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Die Säulen stellen den Durchschnittswert mit Standardfehler (± SEM) dar. Die Anzahl der untersuchten Aortenringe ist in den Säulen angegeben. PE: Phenylephrin; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant

Die Ergebnisse aus den Kontraktionsmessungen, bei denen das cGMP-Analogon direkt auf den Tonus (**Abbildung C-1**) appliziert wird, korrelieren mit den Experimenten zur Untersuchung des 8-Br-cGMP-Effekts auf die Phenylephrin-induzierte Kraftamplitude (**Abbildung C-3**).

C.1.2. Kalziummessungen

C.1.2.1. 8-Br-cGMP-Effekt auf den Hormon-induzierten Ca^{2+} -Transienten

An VSMCs werden Kalziummessungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durchgeführt. Zur Stimulation der glatten Muskelzellen wird eine maximal wirksame Noradrenalin-Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ eingesetzt. Das Hormon-vermittelte Ca^{2+} -Signal variiert von Zelle zu Zelle bei VSMCs von Wildtyp- oder $\text{cGKI}^{-/-}$ -Mäusen und der $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante. Die kultivierten VSMCs werden aufgrund des variierenden Ca^{2+} -Signals zweifach mit Noradrenalin stimuliert (**Abbildung C-4**), wobei das Hormon nach der ersten Stimulation ausgewaschen wird. Durch diese „interne“ Standardisierung werden die Zellen, die sich in der Hormon-Antwort unterscheiden, miteinander vergleichbar.

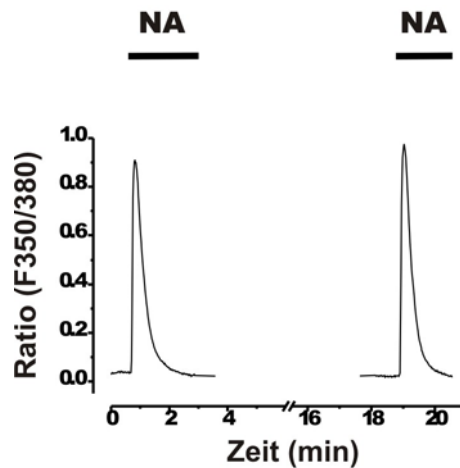


Abbildung C-4: Gezeigt ist hier eine Messung der hormoninduzierten Änderung in der zytosolischen Kalziumkonzentration einer Gefäßmuskelzelle von Mauseorta. Die Balken markieren die Anwesenheit einer $0,5 \mu\text{M}$ Noradrenalinlösung. F: Fluoreszenzintensität; NA: Noradrenalin

Um die Rolle des endogenen NO/ cGMP/ cGKI-Signalwegs in Bezug auf die Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu untersuchen, werden Hormon-vermittelte Ca^{2+} -Transienten an VSMCs von Wildtyp- und $\text{cGKI}^{-/-}$ -Tieren sowie der $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante ausgelöst. In den Wildtyp-VSMCs ist der zweite Ca^{2+} -Transient nach 8-Br-cGMP-Inkubation im Vergleich zur ersten Stimulation signifikant unterdrückt (**Abbildung C-5**). Dagegen ist der 8-Br-cGMP-Effekt auf den zweiten Noradrenalin-induzierten Ca^{2+} -Transienten in Zellen der $\text{cGKI}^{-/-}$ -Maus (**Abbildung C-5**) und der $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante (Daten aus (Sigl, 2004); **Abbildung C-5**) vollständig aufgehoben.

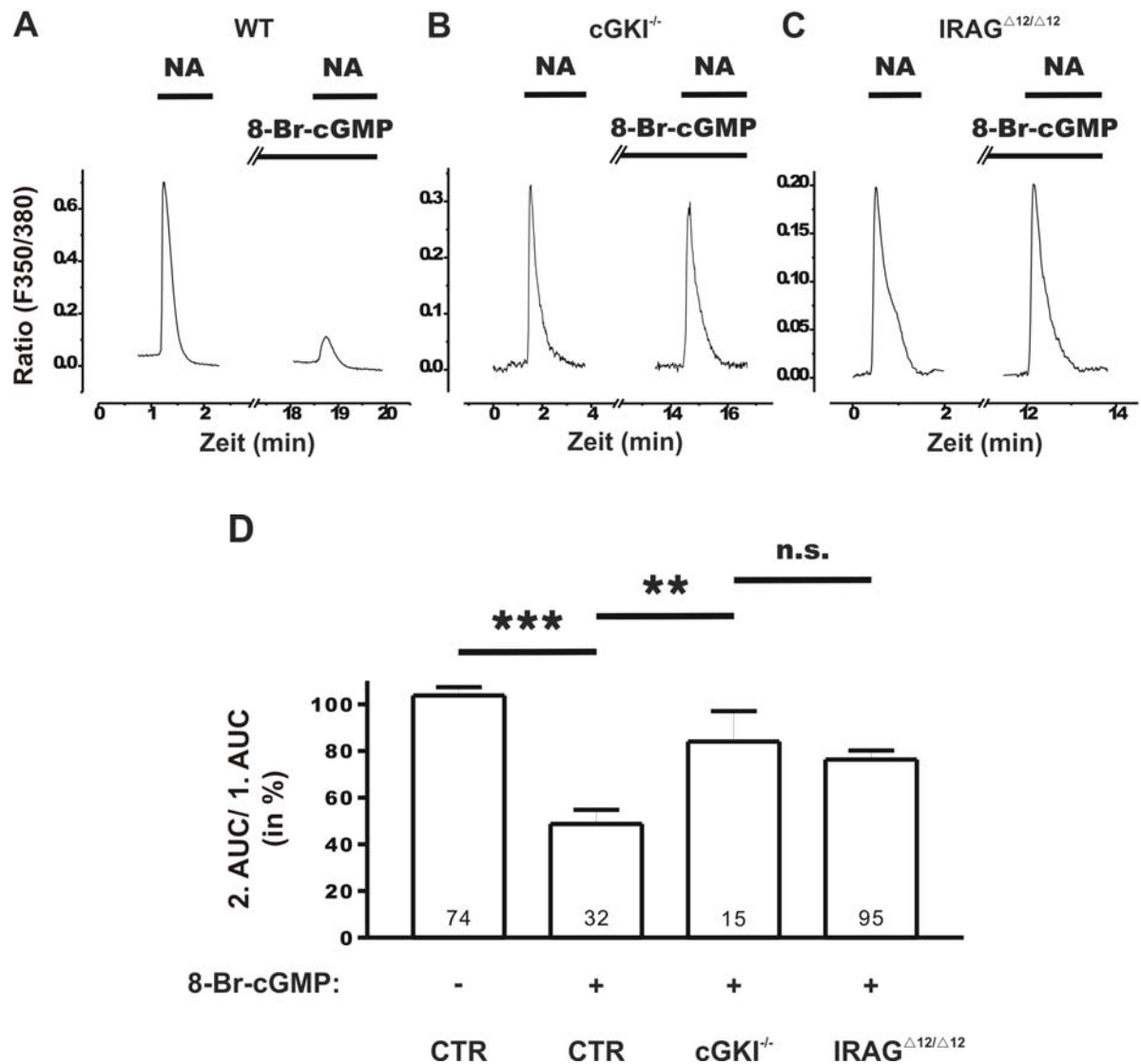


Abbildung C-5: 8-Br-cGMP-Effekt auf Noradrenalin-induzierte Ca²⁺-Transienten in VSMCs. Gezeigt sind Originalregistrierungen von (A) Wildtyp-, (B) cGKI^{-/-}- und (C) IRAG^{Δ12/Δ12}-VSMCs (Beispiel freundlicherweise von Dr. Katja Sigl überlassen). Die Balken deuten die Anwesenheit von Noradrenalin (0,5 μM) und 8-Br-cGMP (1 mM) an. (D) Histogramm aller untersuchten Effekte auf Noradrenalin-induzierte Ca²⁺-Transienten von Wildtyp-, cGKI^{-/-}- und IRAG^{Δ12/Δ12}-VSMCs in Ab- oder Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Die Säulen stellen den Mittelwert mit Standardfehler (± SEM) dar. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben. F: Fluoreszenzintensität; NA: Noradrenalin; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant; AUC: area under curve

Die Experimente zeigen, dass das cGKI-Substrat IRAG sowohl bei der Regulation des Hormon-induzierten Gefäßtonus als auch der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in VSMCs eine wichtige Rolle einnimmt. Dabei korrelieren die Ergebnisse der Kontraktionsmessungen (**Abbildung C-1** und **Abbildung C-3**) mit dem Effekt des cGMP-Analogons auf den Hormon-vermittelten Ca²⁺-Transienten (**Abbildung C-5**).

C.2. Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kalium-vermittelte Kontraktion und Ca^{2+} -Signale

Die glatte Muskulatur kann sowohl Hormon-vermittelt und als auch nach Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration kontrahieren. Die Kalium-vermittelte Kontraktion des glatten Muskels wird durch einen Ca^{2+} -Einstrom über spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle vermittelt (Ratz et al., 2005; Shmygol and Wray, 2004). Nachfolgend soll die Frage untersucht werden, ob IRAG ein Angriffspunkt der cGKI nach Kalium-induzierter Stimulation sein kann.

C.2.1. Kontraktionsmessungen

C.2.1.1. 8-Br-cGMP-Effekt auf den Kalium-induzierten Tonus

An der Aorta von Wildtyp- und cGKI^{-/-}-Mäusen sowie IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausmutanten wird eine Kalium-induzierte Kontraktion ausgelöst. In der Wildtyp-Aorta bewirkt die Applikation von 8-Br-cGMP auf den Kalium-vermittelten Tonus eine ausgeprägte Relaxation (**Abbildung C-6**). Dagegen ist die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation im cGKI^{-/-}-Gefäß aufgehoben. Der relaxierende Effekt von 8-Br-cGMP wird also über die cGKI vermittelt (**Abbildung C-6**). Das cGMP-Analogon relaxiert die Aortenringe der IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausmutante nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (**Abbildung C-6**).

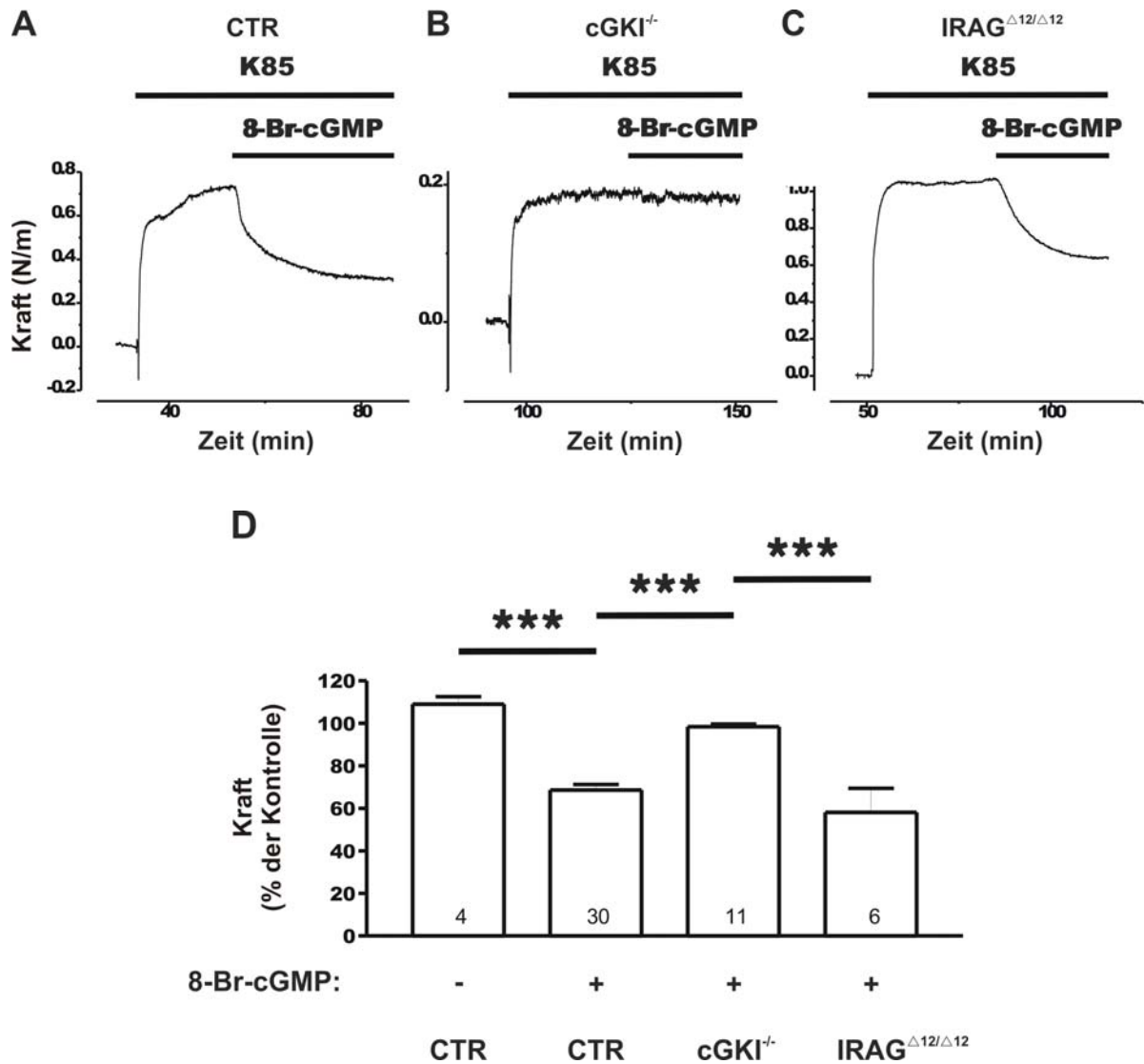


Abbildung C-6: Effekt von 8-Br-cGMP auf den Kalium-induzierten Tonus der Mausaorta. Gezeigt werden Originalregistrierungen von (A) Wildtyp-, (B) cGKI^{-/-}- und (C) IRAG^{Δ12/Δ12}-Aortenringen. Die Balken deuten die Anwesenheit eines 85 mM KCl-haltigen Tyrodepuffers und 8-Br-cGMP (300 μM) an. (D) Statistik aller untersuchten Effekte auf den Kalium-induzierten Tonus von Wildtyp-, cGKI^{-/-}- und IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausaorten in Ab- und Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Die Werte in Abwesenheit des cGMP-Analogons wurden 30 Minuten nach Erreichen der Plateauphase des Kalium-induzierten Tonus bestimmt. Die Säulen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (± SEM) dar. Die Anzahl der verwendeten Aortenringe ist in den Säulen angegeben. K85: 85 mM Kalium-Tyrode; *** $P < 0,001$

C.2.2. Kalziummessungen

C.2.2.1. 8-Br-cGMP-Effekt auf das Kalium-induzierte Ca²⁺-Signal

Der Beitrag des NO/ cGMP/ cGKI-Signalwegs zur Regulation der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Kalium-Stimulation soll mit Wildtyp-, cGKI^{-/-}- und IRAG^{Δ12/Δ12}-VSMCs untersucht werden. Zur Kultivierung wird das Zellmedium der Firma PAA verwendet. Nach dem Einwaschen von Kalium-Tyrode in

das Zellbad kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. In Wildtyp-VSMCs wird dieses Ca^{2+} -Signal durch 8-Br-cGMP reduziert, im Gegensatz zum Ca^{2+} -Signal in den $\text{cGKI}^{-/-}$ -Zellen (**Abbildung C-7**). Auch in VSMCs der $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante wird das Kalium-vermittelte Ca^{2+} -Signal von 8-Br-cGMP reduziert (Daten aus (Sigl, 2004); **Abbildung C-7**). Der 8-Br-cGMP-Effekt ist in Wildtyp- und $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ -VSMCs nicht signifikant unterschiedlich.

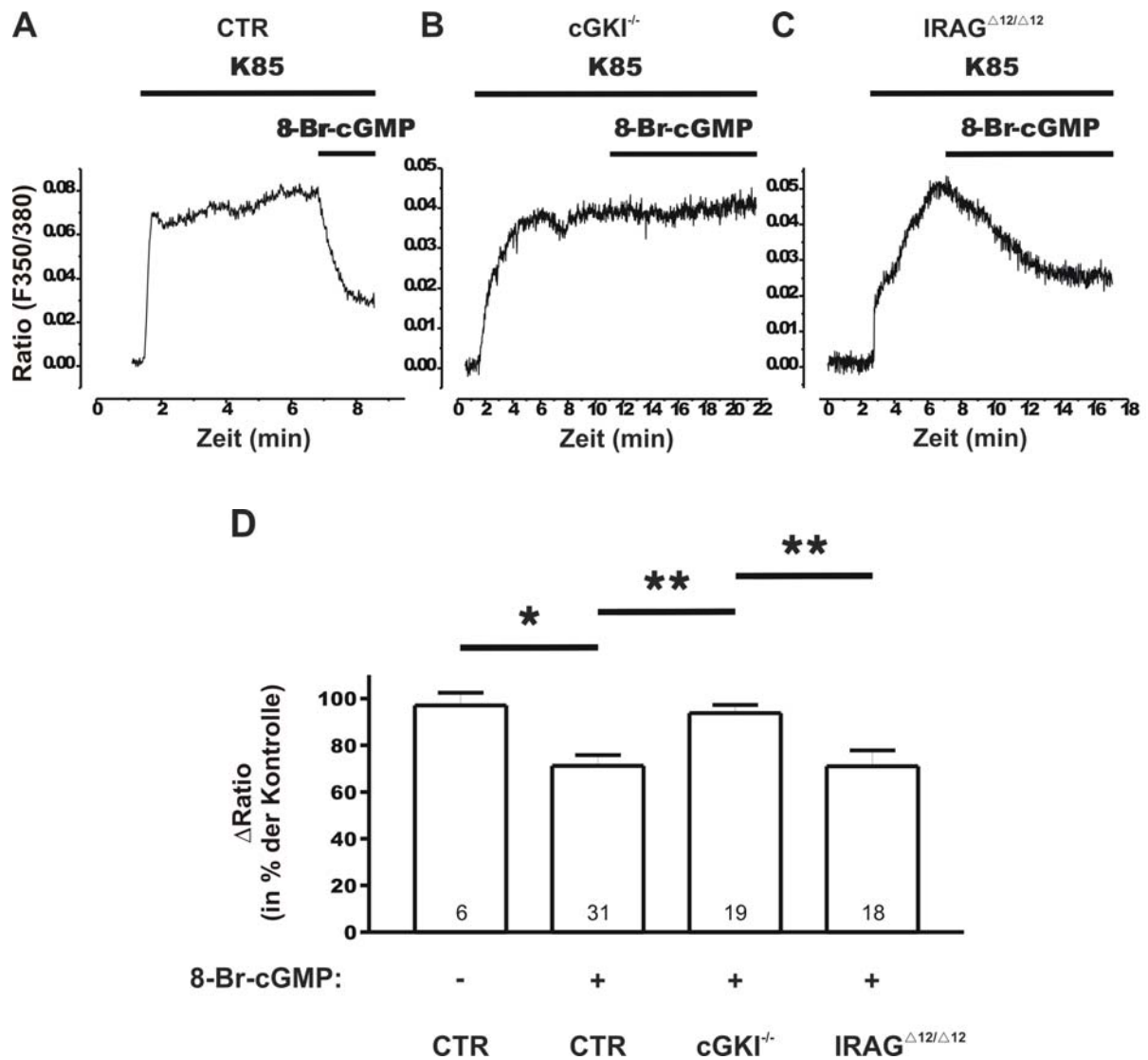


Abbildung C-7: 8-Br-cGMP-Effekt auf das Kalium-induzierte Ca^{2+} -Signal von VSMCs. Die dargestellten Kalziummessungen von (A) Wildtyp-, (B) cGKI^{-/-} und (C) IRAG^{Δ12/Δ12}-VSMCs (Beispiel freundlicherweise von Dr. Katja Sigl überlassen) sind repräsentative Registrierungen der durchgeführten Experimente. Die Anwesenheit von 85 mM KCl-haltigem Tyrodepuffer und 8-Br-cGMP (1 mM) werden durch die Balken dargestellt. (D) Statistische Auswertung aller Effekte auf das Kalium-induzierte Ca^{2+} -Signal von Wildtyp-, cGKI^{-/-} und IRAG^{Δ12/Δ12}-VSMCs in Ab- und Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Die Werte in Abwesenheit des cGMP-Analogons wurden 5 Minuten nach Erreichen der Plateauphase des Kalium-induzierten Ca^{2+} -Signals bestimmt. Die Säulen geben den Mittelwert mit Standardfehler (\pm SEM) an. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben. F: Fluoreszenzintensität; K85: 85 mM Kalium-Tyrode; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; AUC: area under curve

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die cGMP-induzierte Relaxation nach Hormon-abhängiger Stimulation glatter Muskelzellen über die cGKI und IRAG vermittelt wird. Der relaxierende cGMP-Effekt auf die Kalium-induzierte Kontraktion wird ebenso über die cGKI vermittelt, jedoch ohne Beteiligung von IRAG.

Ein möglicher Mechanismus der cGMP/ cGK-abhängigen Relaxation nach Kalium-induzierter Kontraktion ist die Ca^{2+} -Desensibilisierung der glatten Muskulatur. Die Ca^{2+} -Desensibilisierung wurde am Modell der permeabilisierten Aorta näher untersucht.

C.3. Permeabilisierung und Ca^{2+} -Sensibilisierung des glatten Muskels

Um den Mechanismus der cGMP/ cGKI-induzierten Relaxation auf die Kalium-induzierte Kontraktion zu klären, werden im Rahmen dieser Arbeit weitere mögliche Angriffspunkte der cGKI nach Kalium-Stimulation untersucht. Ein Ziel der cGKI könnte die Aktivierung der MLCP (Lee et al., 1997) sein. Die Aktivierung der MLCP führt zur Desensibilisierung gegenüber Kalzium („ Ca^{2+} -Desensibilisierung“) (Somlyo and Somlyo, 2003). An der permeabilisierten Aorta wird die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration der glatten Muskelzelle „geklemmt“, um die Effekte von 8-Br-cGMP nach Ca^{2+} -Sensibilisierung zu untersuchen (Bonnevier et al., 2004).

C.3.1. Nachweis der Permeabilisierung von Mauseorta

Die folgenden Befunde können als Nachweise einer erfolgreich durchgeführten Permeabilisierung herangezogen werden.

1) Die Sensitivität gegenüber außen zugesetztem Ca^{2+} ist in permeabilisiertem Gewebe höher als in intakter Aorta. Eine intakte Aorta kontrahiert nicht in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ [Ca^{2+}] (freie Ca^{2+} -Konzentration) (**Abbildung C-8A**). Dagegen entwickelt die mit α -Toxin permeabilisierte Aorta bei Zugabe von $1 \mu\text{M}$ [Ca^{2+}] (freie Konzentration) einen Tonus von etwa $0,4 \text{ N/ m}$. Die Ca^{2+} -induzierte Kontraktion am permeabilisierten Gefäß ist dosisabhängig und reversibel auswaschbar (**Abbildung C-8B**).

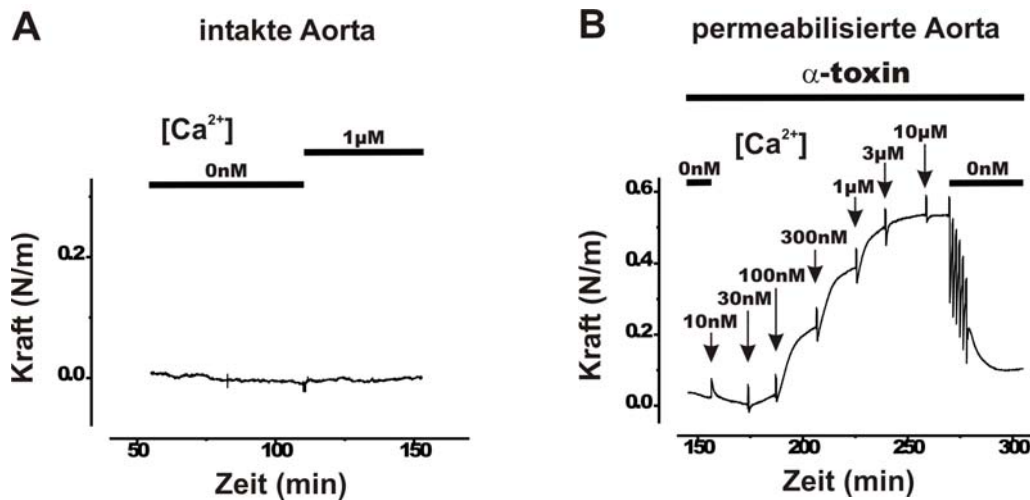


Abbildung C-8: Ca^{2+} -induzierte Kontraktion. (A) Originalaufzeichnung einer Kontraktionsmessung einer intakten Aorta nach Zugabe von $1\ \mu M$ extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. (B) Originalbeispiel eines permeabilisierten Aortenrings bei steigender extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Die Balken deuten die Anwesenheit von α -Toxin (520 units/ml) oder der angegebenen, extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an. Die Pfeile kennzeichnen die Applikation der angegebenen, extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf den stabilen Tonus.

2) Als weiterer Nachweis der Permeabilisierungsmethode wird eine Aktivitäts-Wirkungsbeziehung von α -Toxin erstellt. Im Organbad wird eine Relaxationslösung mit einer eingestellten, freien Ca^{2+} -Konzentration von $1\ \mu M$ vorgelegt und die Aorta mit steigenden Aktivitäten an α -Toxin permeabilisiert. Die Ca^{2+} -induzierte Kontraktion eines permeabilisierten Muskelsegments steigt mit zunehmender Aktivität von α -Toxin an. Dabei wird ein Maximum der Kraftentwicklung bei der α -Toxin-Aktivität von 520 units/ml festgestellt (**Abbildung C-9**).

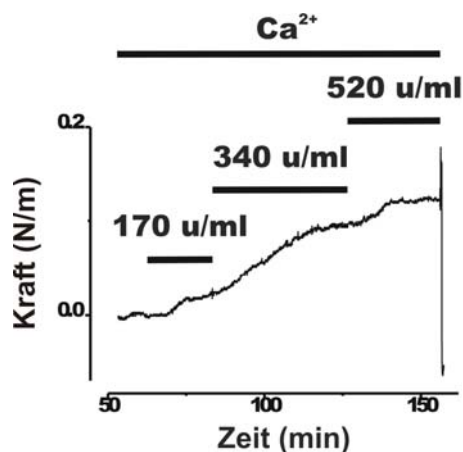


Abbildung C-9: α -Toxin-Konzentrations-Wirkungskurve. Die steigende Konzentration an α -Toxin führt zu einer Ca^{2+} -induzierten Kontraktion ($1\ \mu M$). (A) Auf den stabilen Ruhe-Tonus wird die jeweilige Konzentration von α -Toxin zugegeben. Die Balken kennzeichnen die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die angegebenen α -Toxin-Konzentrationen.

C.3.2. Effekt von 8-Br-cGMP auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus der permeabilisierten Aorta

Nach Permeabilisierung der Mauseorta wird ein Ca^{2+} -induzierter Tonus (300 nM) in submaximaler Konzentration ausgelöst. Auf diesen stabilen Gefäßtonus wird die Wirkung von 8-Br-cGMP (300 μM) untersucht (**Abbildung C-10A**). 8-Br-cGMP relaxiert den Tonus der Wildtyp-Aorta auf eine Restkraft von durchschnittlich 34 %. Die konzentrationsabhängige Wirkung des cGMP-Analogons auf die Ca^{2+} -induzierte Kontraktion wurde unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von 8-Br-cGMP untersucht. Bei steigenden 8-Br-cGMP-Konzentrationen erhält man eine zunehmende Relaxation des cGMP-Analogons mit einem EC_{50} von 2,6 μM auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus (**Abbildung C-10B**).

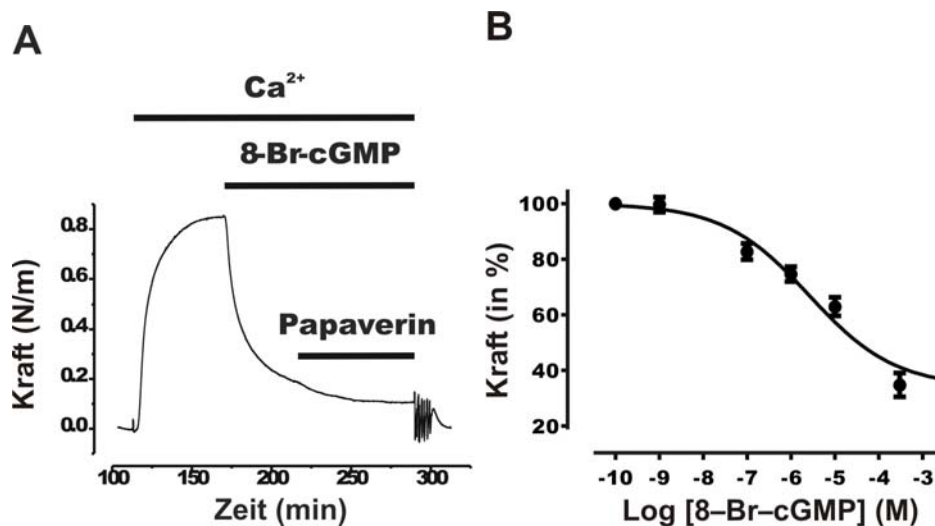


Abbildung C-10: Relaxation des Ca^{2+} -induzierten Tonus durch 8-Br-cGMP. (A) Originalregistrierung der Kontraktionsmessung eines permeabilisierten Aortenrings. Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (300 nM), 8-Br-cGMP (300 μM) und Papaverin (50 μM). (B) 8-Br-cGMP-Konzentrations-Wirkungskurve an vorkontrahierten, permeabilisierten Aortenringen (300 nM extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration). Die Punkte der Konzentrations-Wirkungskurve stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Anzahl der durchgeführten Experimente beträgt 4-6.

Als Nächstes wurde analysiert, ob der relaxierende Effekt von 8-Br-cGMP abhängig von der vorgelegten Ca^{2+} -Konzentration ist. Dazu wird die permeabilisierte Aorta mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen kontrahiert und anschließend mit einer etwa halbmaximal wirksamen Konzentration von 1 μM 8-Br-cGMP relaxiert. Je höher die vorgelegte Ca^{2+} -Konzentration, desto geringer ist der relaxierende Effekt des cGMP-Analogons auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus (**Abbildung C-11**). Auch bei dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 verkleinert sich der relaxierende Effekt bei steigender Ca^{2+} -Konzentration. Die normalisierte Ca^{2+} -Konzentrations-Wirkungskurve (**Abbildung C-12**) verdeutlicht die Zunahme der

Ca^{2+} -Desensibilisierung bei Verwendung steigender 8-Br-cGMP-Konzentrationen bzw. Y-27632. In **Tabelle C-1** ist die Rechtsverschiebung der EC_{50} -Werte der Ca^{2+} -induzierten Kontraktion in Anwesenheit von steigenden 8-Br-cGMP-Konzentrationen und Y-27632 dargestellt.

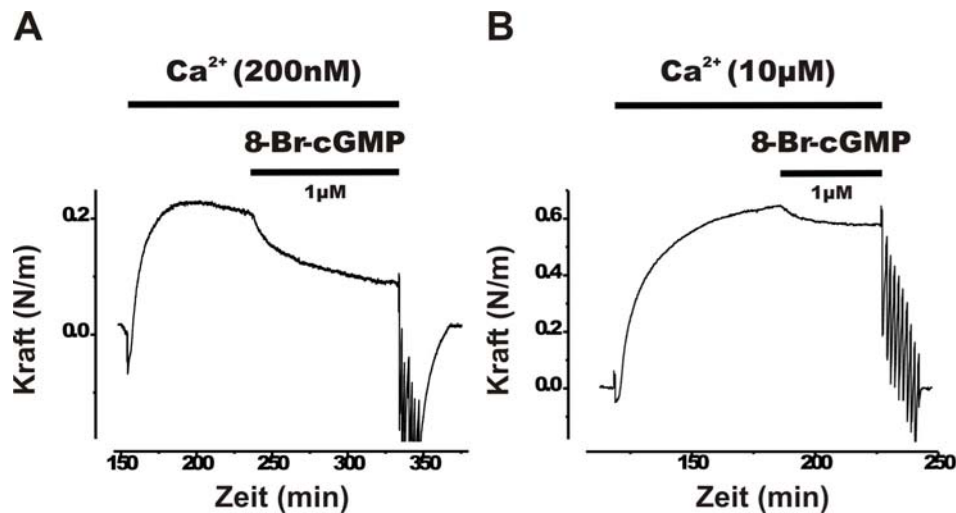


Abbildung C-11: Ca^{2+} -Abhängigkeit des 8-Br-cGMP-Effekts. Dargestellt sind Originalmessungen von permeabilisierten Gefäßen. Mit den angegebenen Ca^{2+} -Konzentrationen wird ein Tonus induziert. Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1 μM) und von (A) 200 nM [Ca^{2+}] oder (B) 10 μM [Ca^{2+}].

	EC_{50} -Wert [μM]
Kontrolle (- 8-Br-cGMP)	0,16
8-Br-cGMP (1 μM)	0,43
8-Br-cGMP (300 μM)	0,82
Y-27632 (10 μM)	8,30

Tabelle C-1: EC_{50} -Werte für die Ca^{2+} -induzierte Kontraktion der permeabilisierten Mousaorta in Ab- und Anwesenheit von Testsubstanzen.

In Anwesenheit von 8-Br-cGMP und Y-27632 sind also größere Ca^{2+} -Konzentrationen nötig, um die halbmaximale Kontraktion der Aortenringe zu erreichen. Der Ca^{2+} -desensibilisierende Effekt des cGMP-Analogons ist deutlich schwächer ausgeprägt als der des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 (**Abbildung C-12**).

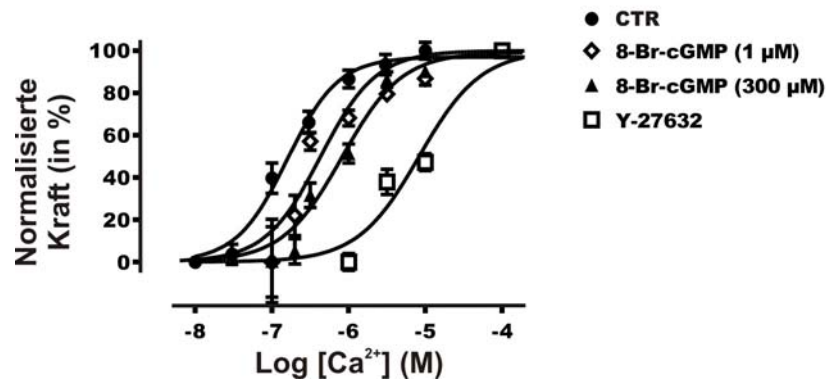


Abbildung C-12: Ca^{2+} -Konzentrations-Wirkungskurve in Ab- oder Anwesenheit von 8-Br-cGMP (1 μ M oder 300 μ M) und Y-27632 (10 μ M) an der permeabilisierten Aorta. Die Punkte der Graphen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Der Graph in Abwesenheit von 8-Br-cGMP stammt aus **Abbildung C-15C**. Die Anzahl der durchgeführten Experimente beträgt 4-14.

C.3.3. Abhängigkeit der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation von der Protein Kinase A

8-Br-cGMP (300 μ M) relaxiert den Ca^{2+} -induzierten Tonus sowohl von permeabilisierten Wildtyp- als auch von $cGKI^{-/-}$ -Aorten (**Abbildung C-13A,B**). Als Mechanismus für die NO-induzierte Relaxation an der intakten $cGKI^{-/-}$ -Aorta wird die cGMP-abhängige Kreuzaktivierung mit der cAMP-abhängigen Protein Kinase (cAK) vorgeschlagen (Sausbier et al., 2000). Ob die cAK an der cGMP-abhängigen Relaxation beteiligt ist, kann anhand eines Protein Kinase A-Inhibitorpeptids, Fragment 5-24 analysiert werden (Cheng et al., 1986). Dabei erfolgt die 10-minütige Inkubation des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids (200 nM) vor der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation des Ca^{2+} -induzierten Tonus. Nach Inkubation von 200 nM Protein Kinase A-Inhibitorpeptid kann in der permeabilisierten $cGKI^{-/-}$ -Aorta der relaxierende Effekt des cGMP-Analogons nicht vollständig aufgehoben werden. Aus diesem Grund werden höhere Konzentrationen des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids (1 μ M und 3 μ M) verwendet. Die Inkubation von 3 μ M Protein Kinase A-Inhibitorpeptid hebt den relaxierenden Effekt des cGMP-Analogons im permeabilisierten $cGKI^{-/-}$ -Aortenring vollständig auf (**Abbildung C-13D**). Dagegen ist die Relaxation von 8-Br-cGMP im permeabilisierten Wildtyp-Gewebe in Anwesenheit von 3 μ M Protein Kinase A-Inhibitor möglich, jedoch auf 70 % Restkraft verringert (**Abbildung C-13C**). Die Konzentrations-Wirkungskurven des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids sind an permeabilisierter Wildtyp- und $cGKI^{-/-}$ -Aorta in **Abbildung C-13E** dargestellt.

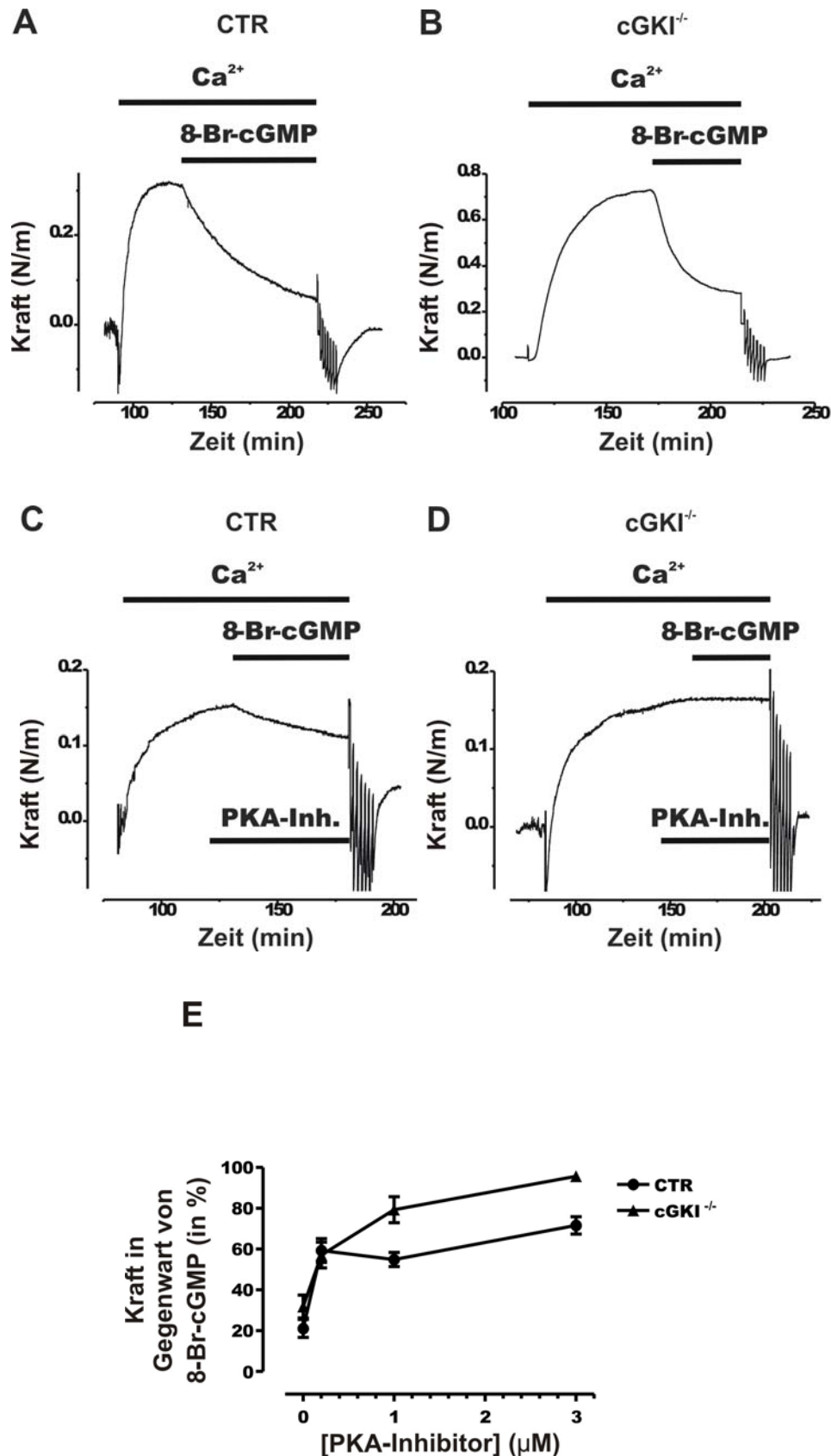


Abbildung C-13: Hemmung der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation des Ca^{2+} -induzierten Tonus durch das Protein Kinase A-Inhibitorpeptid 5-24 in Aortenringen von Wildtyp- und cGKI^{-/-}-Mäusen. Gezeigt sind Originalregistrierungen von permeabilisierten Wildtyp- (A, C) und cGKI^{-/-}-Aortenringen (B, D). Die Balken stellen die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (300 nM) (A-D), 8-Br-cGMP (300 μM)

(A-D) und dem Protein Kinase A-Inhibitorpeptid 5-24 (3 μM) (C, D) dar. (E) Konzentrations-Wirkungskurve des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids 5-24 auf die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Ca^{2+} -induzierten Tonus in permeabilisierten Gefäßsegmenten von Wildtyp- und cGKI^{-/-}-Mäusen. Die Punkte der Graphen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Anzahl der Experimente beträgt 4-6. PKA-Inh.: Protein Kinase A Inhibitorpeptid 5-24

Um die cGMP-abhängige Kreuzaktivierung mit der Protein Kinase A näher zu charakterisieren, werden steigende 8-Br-cGMP-Konzentrationen auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus verschiedener Mausgenotypen getestet. Die Konzentrationswirkungskurven des cGMP-Analogons werden von Wildtyp-Mäusen in Ab- und Anwesenheit des Protein Kinase A-Inhibitors mit denen der cGKI^{-/-}-Geschwister verglichen. 8-Br-cGMP relaxiert die permeabilisierte Wildtyp-Aorta mit einem EC_{50} von 2,6 μM , die Gefäße der permeabilisierten cGKI^{-/-}-Mäuse dagegen mit einem EC_{50} von 19 μM . In Anwesenheit des Protein Kinase A-Inhibitors liegt die EC_{50} der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation der permeabilisierten Wildtyp-Aorta bei 0,7 μM (**Tabelle C-2**).

	EC₅₀-Wert [μM]
Wildtyp	2,6
cGKI^{-/-}	19,0
Wildtyp (+ PKA-Inhibitor)	0,7

Tabelle C-2: EC_{50} -Werte für die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation der permeabilisierten Mauseorta.

Geringe 8-Br-cGMP-Konzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) bewirken eine schwache Ca^{2+} -Desensibilisierung auf den Gefäßtonus des permeabilisierten Wildtyp-Aortenrings, jedoch nicht auf den Tonus der permeabilisierten cGKI^{-/-}-Maus. Im permeabilisierten Wildtyp-Aortenring werden die Effekte von 8-Br-cGMP bei Konzentrationen kleiner 1 μM ausschließlich über die cGKI vermittelt. In der cGKI^{-/-}-Maus wurde der Ca^{2+} -induzierte Tonus erst bei 8-Br-cGMP-Konzentrationen größer 1 μM relaxiert. Bei hohen 8-Br-cGMP-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) findet sowohl in der permeabilisierten Wildtyp- als auch in der cGKI^{-/-}-Aorta eine starke Ca^{2+} -Desensibilisierung statt (**Abbildung C-14**). Die Relaxation verläuft vermutlich hauptsächlich über die Protein Kinase A ab, da der 8-Br-cGMP-Effekt im permeabilisierten cGKI^{-/-}-Aortenring nach Inkubation des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids (3 μM) aufgehoben werden kann (**Abbildung C-13E**).

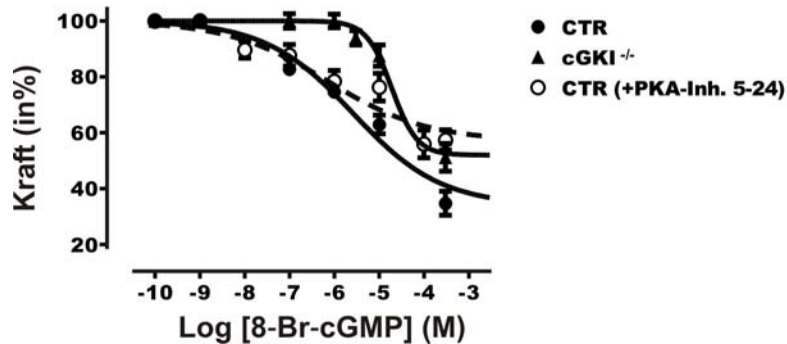


Abbildung C-14: Konzentrations-Wirkungskurve von 8-Br-cGMP auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus (300 nM) von permeabilisierten Wildtyp- und $\text{cGKI}^{-/-}$ -Gefäßen. Die Experimente der Wildtyp-Aorten werden in Ab- und Anwesenheit des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids 5-24 durchgeführt. Die Punkte der Graphen stellen die Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SEM) dar. Die Anzahl der Versuche beträgt 4-11. PKA-Inh. 5-24: Protein Kinase A-Inhibitorpeptid 5-24

C.3.4. Ca^{2+} -Sensibilisierung an der permeabilisierten Aorta

G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Agonisten (Phenylephrin, Thromboxan, Endothelin, etc.) bewirken eine Ca^{2+} -Sensibilisierung (Somlyo and Somlyo, 2003) durch RhoA/ Rho-Kinase-vermittelte Hemmung der MLCP (Sauzeau et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 1998; Surks et al., 2003). Agonisten und $\text{GTP}\gamma\text{S}$ führen somit zum Anstieg des Phosphorylierungsgrads der 20 kDa schweren RLC, indem deren Dephosphorylierung gesenkt wird (Kitazawa et al., 1989).

C.3.4.1. Nachweis der Ca^{2+} -Sensibilisierung in der Aorta mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$

Das nicht hydrolysierbare GTP-Derivat $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aktiviert direkt G-Proteine und kann so eine Ca^{2+} -Sensibilisierung in der permeabilisierten Aorta bewirken (Trinkle-Mulcahy et al., 1995). Hier kommt es zu einer Ca^{2+} -Sensibilisierung des glatten Muskels mit Linksverschiebung der EC_{50} der Ca^{2+} -induzierten Kontraktion von etwa 160 nM auf etwa 30 nM [Ca^{2+}] (**Abbildung C-15C**). Nach Ca^{2+} -Sensibilisierung mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ kontrahiert die Aorta bereits bei geringerer Ca^{2+} -Konzentration und entwickelt eine vergrößerte maximale Kraftentwicklung des glatten Muskels (**Abbildung C-15B**) im Vergleich zu Kontrollbedingungen ohne $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (**Abbildung C-15A**).

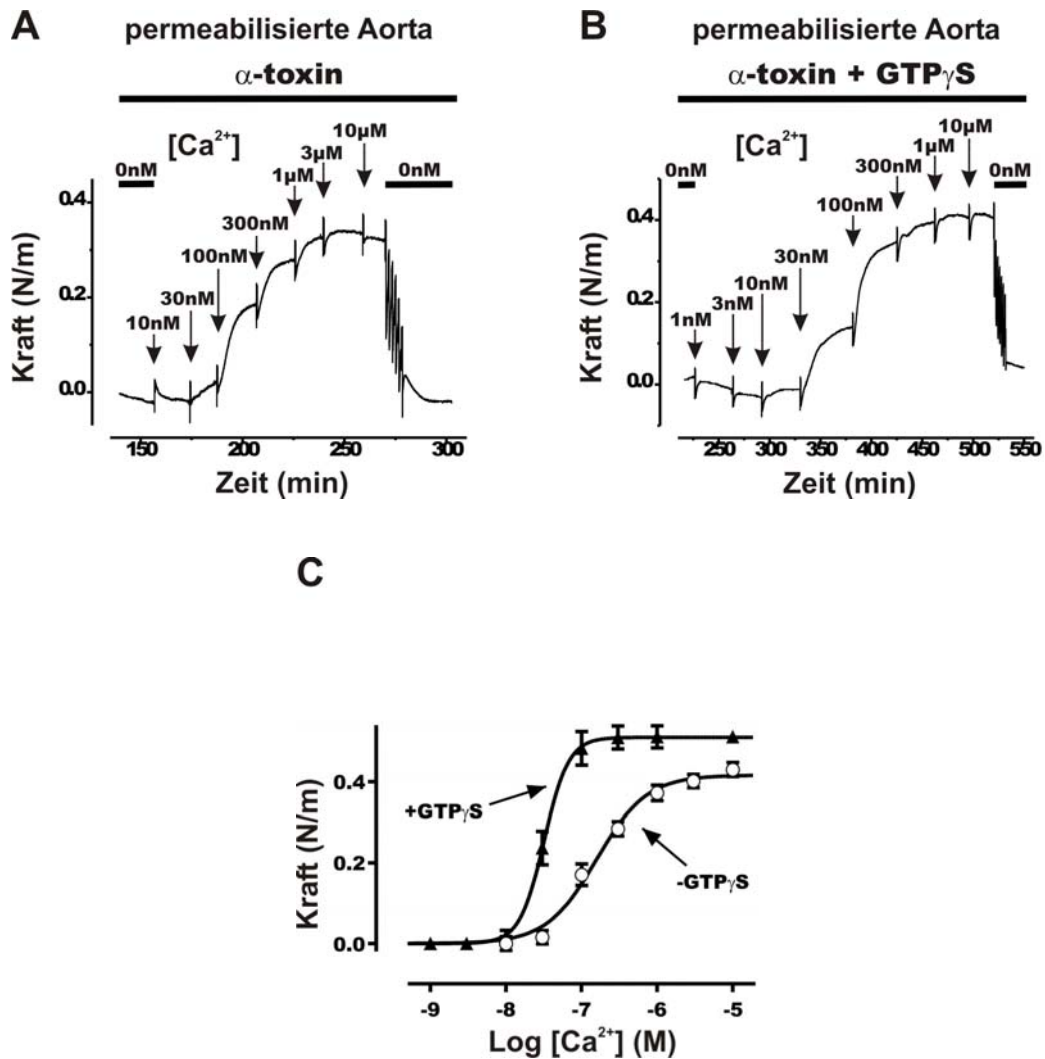


Abbildung C-15: Effekt von GTP γ S auf den Ca $^{2+}$ -abhängigen Tonus in der α -Toxin permeabilisierten Aorta. (A, B) Repräsentative Beispiele von Kontraktionsmessungen nach Zugabe steigender extrazellulärer Ca $^{2+}$ -Konzentrationen. Dargestellt sind Originalbeispiele eines dosisabhängigen Ca $^{2+}$ -induzierten Tonus in Abwesenheit von GTP γ S (A) und eines dosisabhängigen Ca $^{2+}$ -induzierten Tonus nach GTP γ S-Inkubation (B). Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von α -Toxin (520 units/ml), GTP γ S (50 μ M) oder die angegebene, extrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration. Die Pfeile stellen die Applikation der angegebenen, extrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration jeweils auf den stabilen, Ca $^{2+}$ -induzierten Tonus dar. In (C) ist eine Ca $^{2+}$ -Konzentrations-Wirkungskurve der permeabilisierten Aorta in Ab- und Anwesenheit von GTP γ S dargestellt. Die Punkte der Graphen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Zahl der durchgeführten Experimente beträgt 8-12.

C.3.4.2. Vergleich der Ca $^{2+}$ -Sensibilisierung durch Rezeptor-Stimulation und GTP γ S

In weiteren Versuchen wurde die Ca $^{2+}$ -Sensibilisierung an der Mauseorta durch Aktivierung von G-Proteinen untersucht. Die Ca $^{2+}$ -Sensibilisierung wurde nach Stimulation von α_1 -adrenergen Rezeptoren (G $_q$ -Protein), Thromboxan-Rezeptoren (G $_{12/13}$ -Proteine) und allen G-Proteinen mit GTP γ S ausgelöst.

Auf die Plateauphase der Ca^{2+} -induzierten Kontraktion (300 nM) kann durch Zugabe von Phenylephrin (10 μM) keine oder nur eine geringe Kontraktionszunahme festgestellt werden. In Anwesenheit von 300 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ besitzen der Thromboxan-Agonist U46619 und $\text{GTP}\gamma\text{S}$ stärkere Ca^{2+} -sensitisierende Eigenschaften. In der Aorta bewirkt $\text{GTP}\gamma\text{S}$, bezogen auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus, eine Kontraktionszunahme von etwa 100 %. **Abbildung C-16** vergleicht die Kontraktionszunahme des Gefäßtonus nach Ca^{2+} -Sensitisierung bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration.

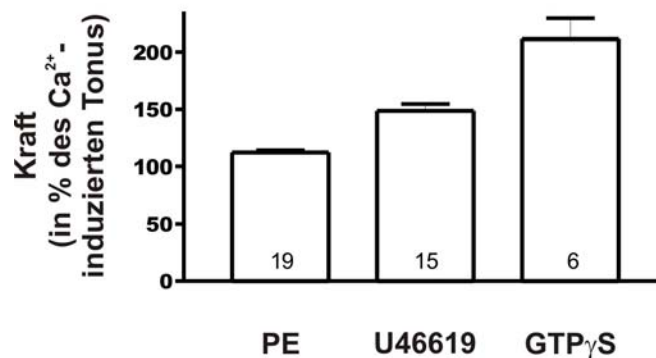


Abbildung C-16: Ca^{2+} -Sensitisierung mit Phenylephrin (3 μM), U46619 (30 μM) und $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (50 μM) auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus (300 nM). Phenylephrin und U46619 werden zusammen mit GTP (100 μM) appliziert. Die Säulen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Zahl der verwendeten Muskelsegmente ist in den Balken angegeben. PE: Phenylephrin

C.3.4.3. 8-Br-cGMP-Effekt auf die Phenylephrin-induzierte Ca^{2+} -Sensitisierung

Phenylephrin besitzt in Gegenwart von 300 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ geringe Ca^{2+} -sensitisierende Eigenschaften. 8-Br-cGMP (300 μM) relaxiert den Gefäßtonus von Wildtyp-Aorta nach erfolgter Ca^{2+} -Sensitisierung mit Phenylephrin in vergleichbarem Ausmaß zu nicht-sensitizierter Aorta (**Abbildung C-17**).

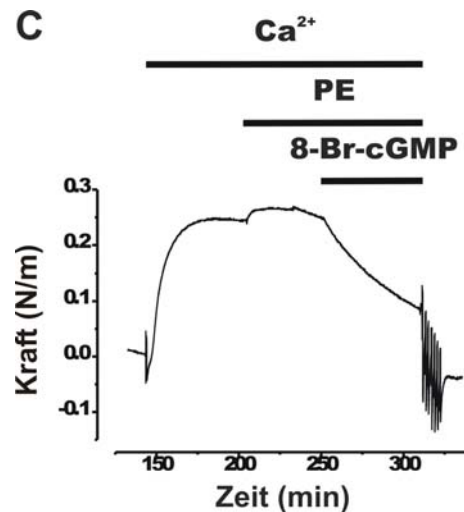


Abbildung C-17: 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Ca^{2+} -induzierten Tonus nach Ca^{2+} -Sensibilisierung mit Phenylephrin. Originalregistrierung eines Ca^{2+} -induzierten Tonus nach Stimulation mit Phenylephrin und Applikation von 8-Br-cGMP. Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (300 nM), Phenylephrin (3 μM) und 8-Br-cGMP (300 μM). PE: Phenylephrin

C.3.4.4. 8-Br-cGMP-Effekt auf die U46619-induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung

Die Ca^{2+} -Sensibilisierung mit 30 μM U46619, einem Thromboxan-Analogon, wird ebenfalls bei 300 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ durchgeführt. Nach Ca^{2+} -Sensibilisierung mit U46619 ist der relaxierende Effekt von 8-Br-cGMP deutlich abgeschwächt im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne G-Protein-Aktivierung. In Anwesenheit von 8-Br-cGMP bewirkt Y-27632 eine noch stärkere Relaxation des Gefäßes. Der starke Effekt von Y-27632 stellt einen Hinweis auf einen intakten Ca^{2+} -desensibilisierenden Apparat im präparierten Muskel dar (**Abbildung C-18**). Der Effekt von 8-Br-cGMP ist nach Inkubation des Protein Kinase A-Inhibitors signifikant verringert, jedoch nicht der des Rho-Kinase-Inhibitors (**Abbildung C-20**). Dies deutet auf eine Beteiligung der Protein Kinase A bei der 8-Br-cGMP-vermittelten Ca^{2+} -Desensibilisierung nach G-Protein-Aktivierung mit dem Thromboxan-Analogon hin.

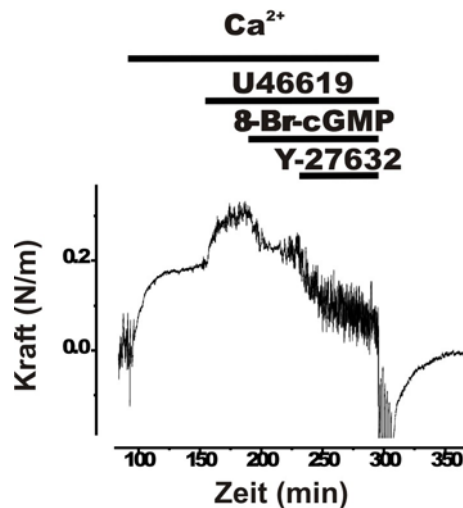


Abbildung C-18: 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Ca²⁺-induzierten Tonus nach Stimulation von G-Proteinen mit U46619. Originalregistrierung eines Ca²⁺-induzierten Tonus nach Ca²⁺-Sensitisierung mit U46619 und Applikation von 8-Br-cGMP und Y-27632. Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ (300 nM), U46619 (30 µM), 8-Br-cGMP (300 µM) und Y-27632 (10 µM).

C.3.4.5. 8-Br-cGMP-Effekt auf die GTP_γS-induzierte Ca²⁺-Sensitisierung

GTP_γS (50 µM) löst bei konstanter Ca²⁺-Konzentration die stärkste Kontraktionszunahme aus. Im Wildtyp-Muskelpräparat relaxiert 8-Br-cGMP (300 µM) den Ca²⁺-sensitisierten Tonus auf etwa 95 % Restkraft. Selbst bei 30 nM [Ca²⁺] ist der Ca²⁺-sensitisierte Tonus nach Zugabe von 8-Br-cGMP nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt). Der Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 relaxiert den maximalen Gefäßtonus jedoch auf etwa 38 % Restkraft (**Abbildung C-19A**). Dies zeigt, dass der Ca²⁺-desensitisierende Signalweg unter diesen Bedingungen intakt ist. Das membrangängige cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP relaxiert dagegen nicht die GTP_γS-induzierte Kontraktion (Daten nicht gezeigt). Die Effekte von 8-Br-cGMP und Y-27632 auf die maximale Kontraktion nach Ca²⁺-Sensitisierung mit GTP_γS werden in **Abbildung C-19B** gegenübergestellt.

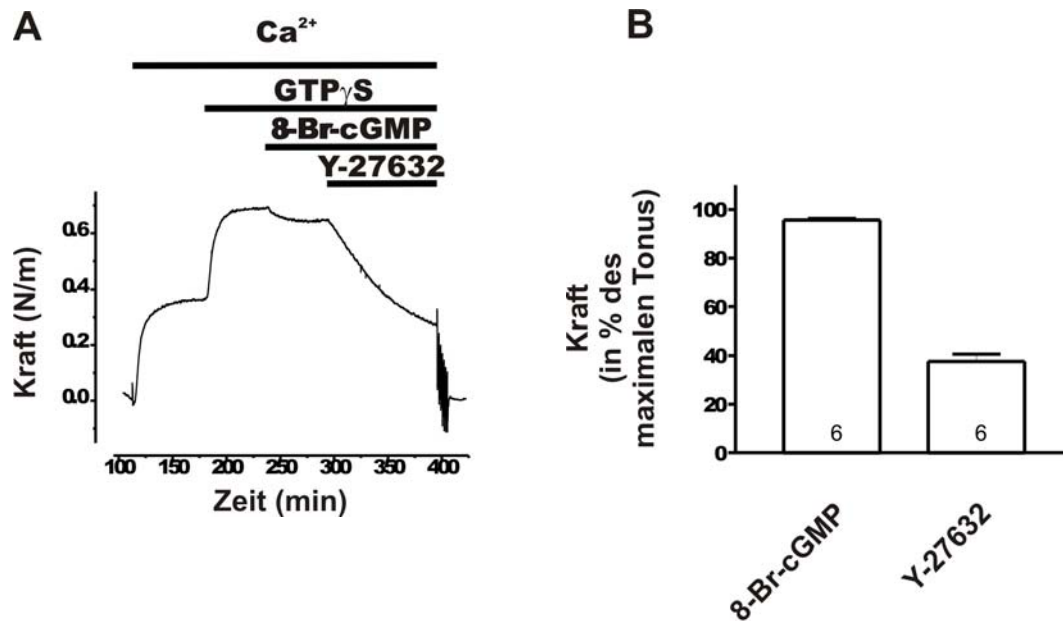


Abbildung C-19: 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Ca^{2+} -induzierten Tonus nach Stimulation von G-Proteinen mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$. (A) Originalregistrierung eines Ca^{2+} -induzierten Tonus nach Ca^{2+} -Sensibilisierung mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und Applikation von 8-Br-cGMP und Y-27632. Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (300 nM), $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (50 μM), 8-Br-cGMP (300 μM) und Y-27632 (10 μM). (B) Histogramm der Effekte von 8-Br-cGMP und Y-27632 auf den Tonus nach Ca^{2+} -Sensibilisierung mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ von permeabilisierten Wildtyp-Aortenringen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM). Die Zahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben.

Zusammenfassend ist in **Abbildung C-20** ein Überblick über die 8-Br-cGMP-Effekte auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus ohne und nach G-Protein Aktivierung dargestellt.

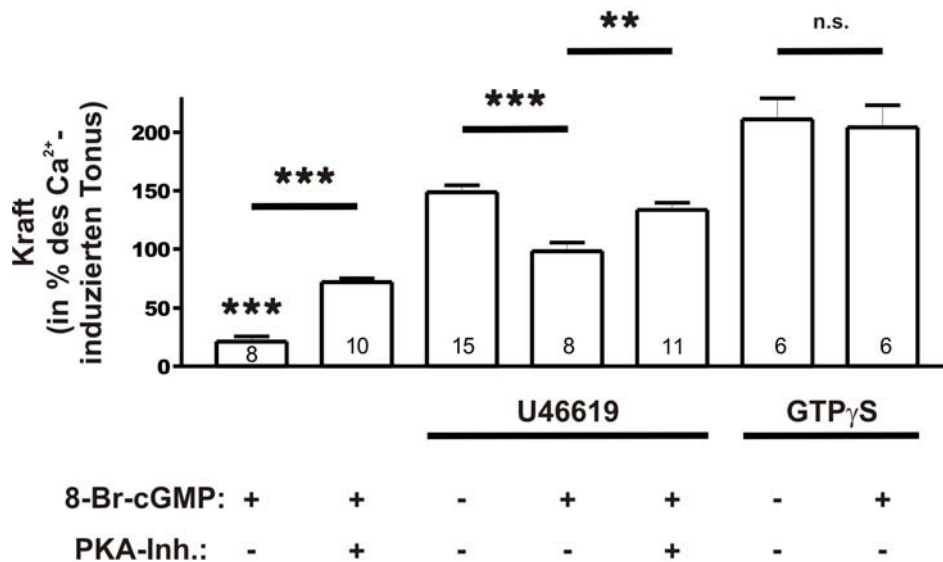


Abbildung C-20: Effekt von 8-Br-cGMP auf den Ca^{2+} -induzierten Tonus (300 nM) in Ab- oder Anwesenheit von U46619 (30 μM) oder $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (50 μM). Die 8-Br-cGMP-Effekte auf die Ca^{2+} -induzierte Kontraktion ohne oder nach U46619-vermittelter Ca^{2+} -Sensibilisierung sind auch in Ab- oder Anwesenheit des Protein Kinase A-Inhibitorpeptids 5-24 (3 μM) dargestellt. Die Säulen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben. PKA-Inh.: Protein Kinase A-Inhibitorpeptid 5-24; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant

C.4. Effekt von 8-Br-cGMP auf die Hormon-unabhängige Stimulation glatter Muskelzellen nach Inkubation mit Thapsigargin

Die Ergebnisse an der permeabilisierten Mauseorta zeigen, dass die cGMP/ cGKI-vermittelte Relaxation nur zu einem geringen Teil über den Mechanismus der Ca^{2+} -Desensibilisierung abläuft. Daher ist es unklar, ob dieser Mechanismus den Effekt von cGMP auf die Kalium-induzierte Kontraktion vermittelt. Ein anderer Mechanismus könnte die Regulation der Ca^{2+} -ATPase am Sarkoplasmatischen Retikulum sein. Der Beitrag der SERCA an der cGMP/ cGKI-vermittelten Relaxation wird mittels SERCA-Hemmstoffs Thapsigargin (Thastrup et al., 1990) untersucht.

C.4.1. Effekt von 8-Br-cGMP auf den Thapsigargin-induzierten Tonus

Neben der Hormon- und Kalium-vermittelten Kontraktion kann auch Thapsigargin eine Muskelkontraktion an den Aortenringen auslösen. Die durch Thapsigargin ausgelöste Muskelkontraktion verläuft über einen anderen Mechanismus als die Hormon- und Kalium-induzierte Kontraktion. Thapsigargin blockiert die SERCA und führt zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Entleerung des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers

(Thastrup et al., 1990). Daneben bewirkt die Ca^{2+} -Speicher-Entleerung die Aktivierung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms (Trepakova et al., 2001). Der exakte molekulare Mechanismus zur Signalkopplung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher-Entleerung bis zur Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms ist noch nicht vollständig geklärt (Marchant, 2005). Im Gegensatz zu dem Hormon- und Kalium-induzierten Gefäßtonus wird die Thapsigargin-induzierte Kontraktion nicht durch 8-Br-cGMP relaxiert, sondern eine leichte Zunahme des Tonus in Anwesenheit des zyklischen Nukleotids festgestellt. Dagegen wird der Gefäßtonus von dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 relaxiert. Dies deutet daraufhin, dass Y-27632, aber nicht 8-Br-cGMP, unter diesen Bedingungen eine Ca^{2+} -desensibilisierende Wirkung besitzt (**Abbildung C-21**).

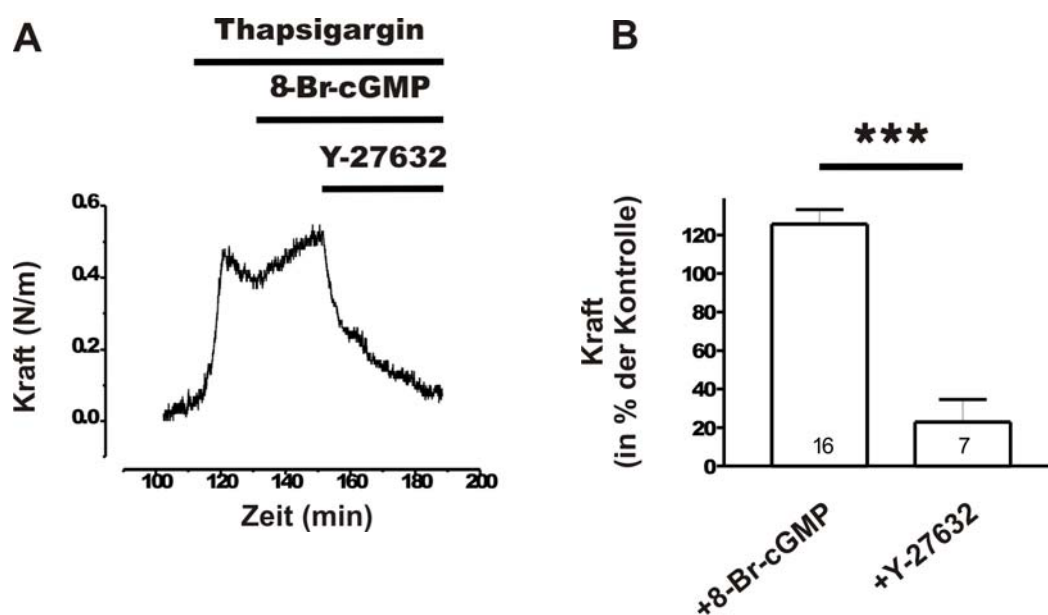


Abbildung C-21: Effekte von 8-Br-cGMP und Y-27632 auf den Thapsigargin-induzierten Tonus am Aortenring der Maus. (A) Dargestellt ist eine Originalregistrierung einer Thapsigargin-vermittelten Kontraktion. Die Balken deuten die Anwesenheit von Thapsigargin (2 μM), 8-Br-cGMP (300 μM) und Y-27632 (10 μM) an. (B) Statistik aller untersuchten Effekte von 8-Br-cGMP und Y-27632 auf den Thapsigargin-induzierten Tonus von Mousaorta. Die Säulen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) dar. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben. *** $P < 0,001$

C.4.2. Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Kalium-vermittelten Tonus

An intakten Aortenringen wird nach Inkubation von Thapsigargin ein Kalium-induzierter Tonus ausgelöst. In Anwesenheit von Thapsigargin ist die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Kalium-vermittelten Tonus signifikant schlechter (83 % Restkraft; **Abbildung C-22**) im Vergleich zu Kontrollbedingungen ohne Inkubation von Thapsigargin (68 % Restkraft; **Abbildung C-22**).

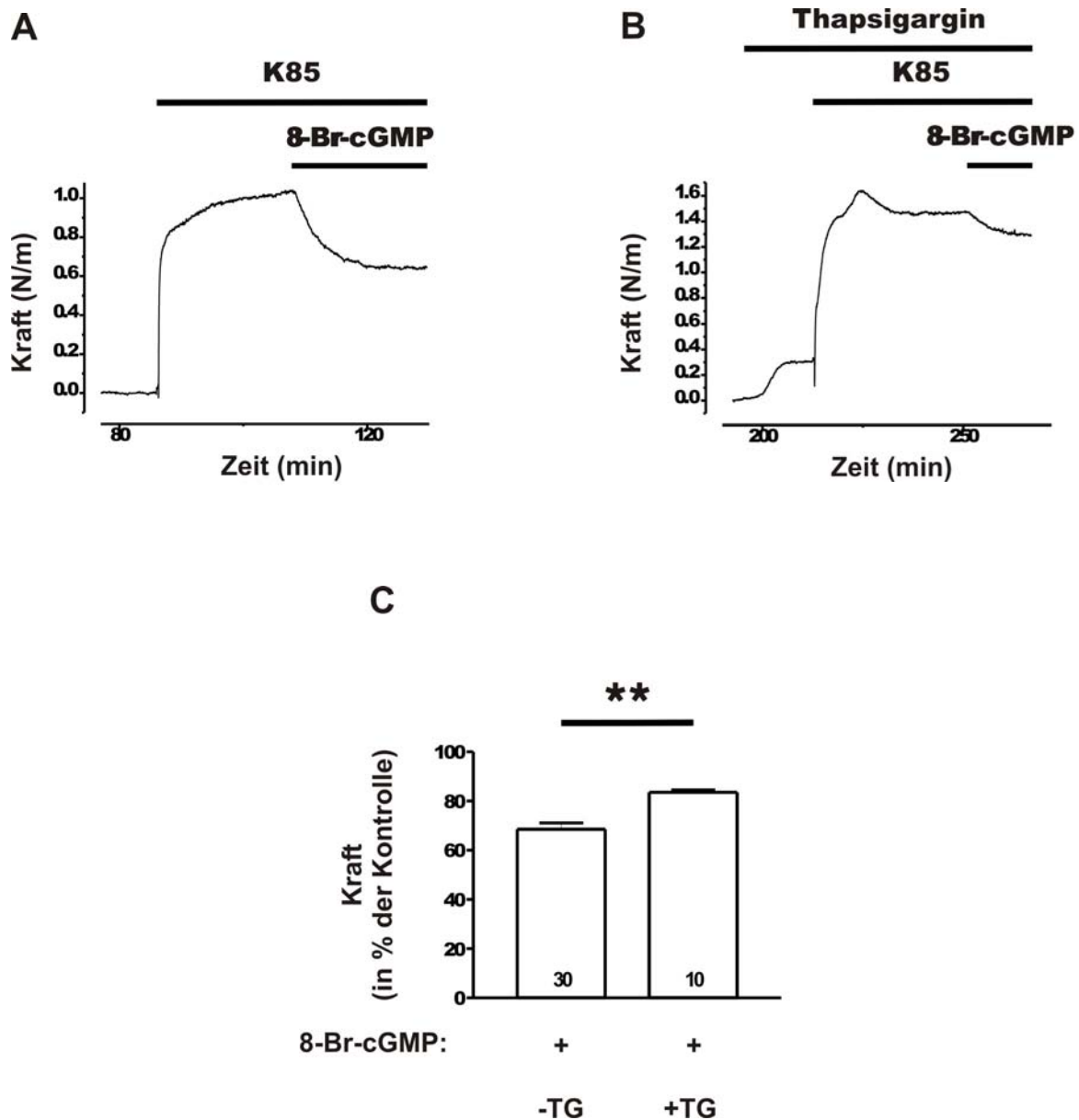


Abbildung C-22: Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Kalium-vermittelten Gefäßtonus. Gezeigt sind Originalregistrierungen von Kontraktionsmessungen. (A) Unter Kontrollbedingungen relaxiert 8-Br-cGMP (300 μ M) den Kalium-induzierten Tonus. (B) Nach Inkubation von Thapsigargin (2 μ M) ist die 8-Br-cGMP-vermittelte Relaxation vermindert. Die Balken deuten die Anwesenheit von 85 mM KCl-haltigem Tyrodepuffer, 8-Br-cGMP und Thapsigargin an. (C) Statistische Auswertung des Effekts von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation nach Kalium-Stimulation. Die Säulen stellen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM) der Kontraktion nach 8-Br-cGMP-Applikation im Verhältnis zum stabilen Kalium-induzierten Tonus dar. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben. K85: 85 mM Kalium-Tyrode; TG: Thapsigargin; ** $P < 0,01$

C.4.3. Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des Kalium-vermittelten Ca^{2+} -Signals

An kultivierten VSMCs soll der Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des Kalium-induzierten Ca^{2+} -Signals untersucht werden. Im Gegensatz zu den Experimenten aus C.2.2.1 werden die VSMCs hier für die folgenden Ca^{2+} -Messungen in einem Zellmedium der Firma Gibco kultiviert. Bei VSMCs, die in dem Zellmedium der Firma Gibco kultiviert wurden, ist die 8-Br-cGMP-vermittelte Reduktion des Kalium-induzierten Ca^{2+} -Signals im Vergleich zu den Experimenten nach Verwendung des Mediums der Firma PAA erhöht. Nach Inkubation von Thapsigargin kommt es zu einem transienten Anstieg an zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration. Dieser Anstieg kann mit der Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher in Verbindung gebracht werden. In Anwesenheit von Thapsigargin wird das Kalium-induzierte Ca^{2+} -Signal von 8-Br-cGMP nicht oder schlecht verringert (**Abbildung C-23**), während es ohne Thapsigargin-Inkubation unter Kontrollbedingungen um etwa 65 % reduziert wird (**Abbildung C-23**). Die Kalziummessungen an glatten Muskelzellen (**Abbildung C-23**) bestätigen die Ergebnisse der Kontraktionsversuche an den Aortenringen (**Abbildung C-22**).

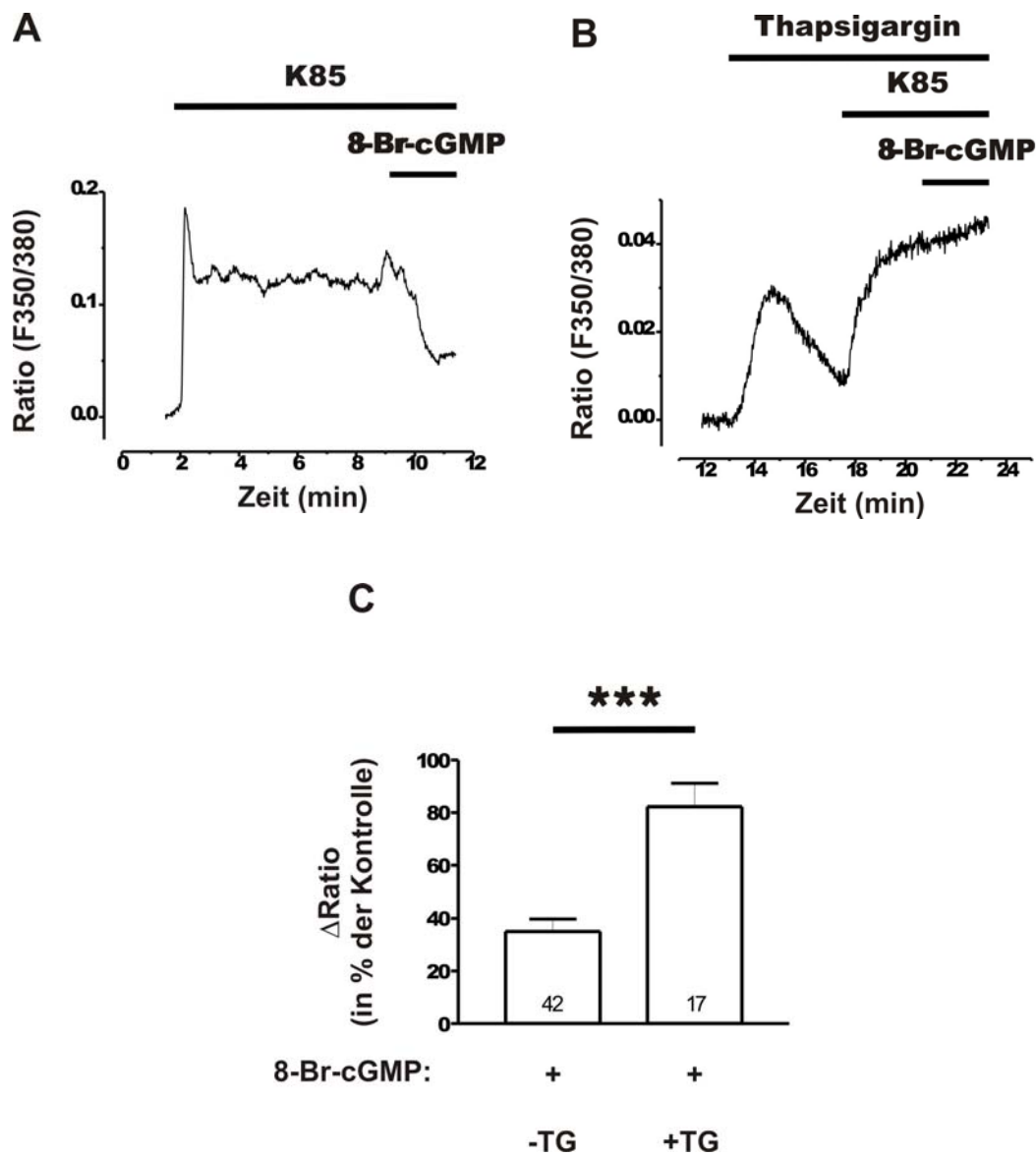


Abbildung C-23: Effekt von Thapsigargin auf die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des Kalium-induzierten Ca^{2+} -Signals in VSMCs. (A) Unter Kontrollbedingungen reduziert 8-Br-cGMP (1 mM) das Kalium-induzierte Ca^{2+} -Signal. (B) Nach Thapsigargin-Inkubation (5 nM) wird der Effekt von 8-Br-cGMP auf das Kalium-vermittelte Ca^{2+} -Signal aufgehoben. Die Balken deuten die Anwesenheit von 85 mM KCl-haltigem Tyrodepuffer, 8-Br-cGMP und Thapsigargin an. (C) Statistische Auswertung des Thapsigargin-Effekts auf die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des Kalium-vermittelten Ca^{2+} -Signals. Die Säulen geben den Mittelwert mit Standardfehler (\pm SEM) an. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben. F: Fluoreszenzintensität; K85: 85 mM Kalium-Tyrode; TG: Thapsigargin; *** $P < 0,001$

C.4.4. Untersuchung der 8-Br-cGMP-induzierten Relaxation nach Kalium-Stimulation an PLB^{-/-}-Mäusen

Die Aktivität der SERCA wird vermutlich durch Regulatorproteine wie Phospholamban gesteuert. Phospholamban kann cGMP- und cAMP-abhängig phosphoryliert werden (Lalli et al., 1999).

In dieser Arbeit soll mittels Wildtyp- und PLB^{-/-}-Mäusen (freundlicherweise von Dr. Evangelia Kranias, Cincinnati, und Dr. Stefan Engelhardt, Würzburg, zur Verfügung gestellt) am glatten Muskel analysiert werden, ob Phospholamban an der cGMP-vermittelten Relaxation nach Kalium-Stimulation beteiligt ist. 8-Br-cGMP relaxiert die Kalium-induzierte Kontraktion sowohl von Wildtyp- als auch von PLB^{-/-}-Mäusen. Der Effekt von 8-Br-cGMP ist jedoch an PLB^{-/-}-Mäusen abgeschwächt ($p < 0,05$) (**Abbildung C-24A,B**). Dieser Befund legt nahe, dass Phospholamban an der cGMP/ cGKI-vermittelten Relaxation der Aorta beteiligt ist.

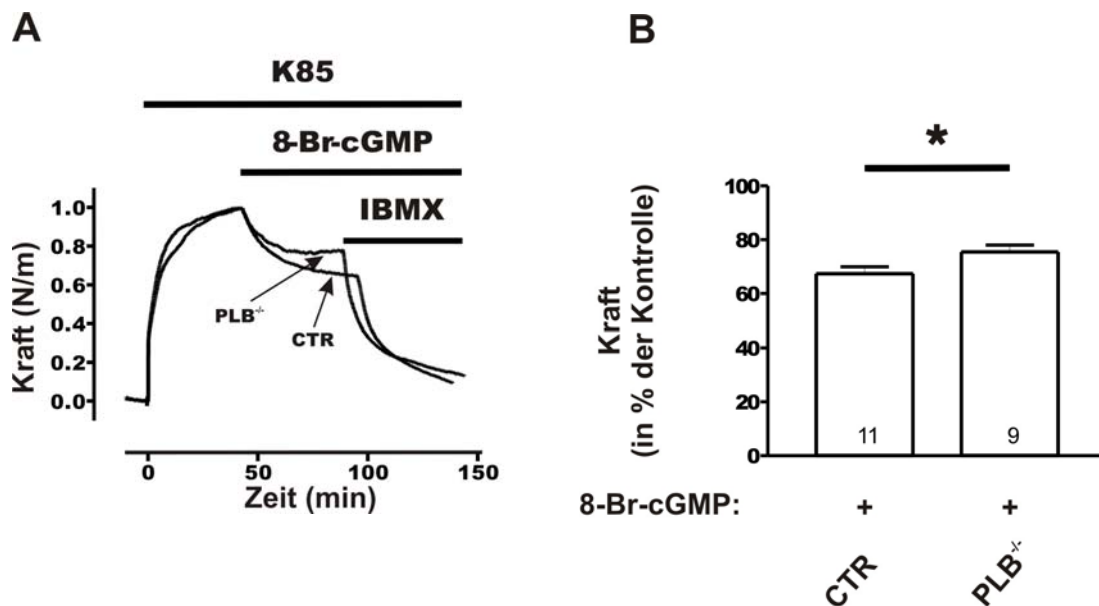


Abbildung C-24: Effekt von 8-Br-cGMP auf den Kalium-induzierten Gefäßtonus. (A) Gezeigt sind Originalregistrierungen von Wildtyp- und PLB^{-/-}-Aortenringen (freundlicherweise von Dr. Evangelia Kranias und Dr. Stefan Engelhardt zur Verfügung gestellt). Die Balken kennzeichnen die Anwesenheit von 85 mM KCl-haltigem Tyrodepuffer, 8-Br-cGMP (300 μ M) und IBMX (100 μ M). (B) Histogramm aller untersuchten Effekte von 8-Br-cGMP auf den Kalium-induzierten Tonus an der Aorta von Wildtyp- und PLB^{-/-}-Mäusen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM). Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in den Säulen angegeben. K85: 85 mM Kalium-Tyrode; IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin; PLB: Phospholamban; * $P < 0,05$

D. Diskussion

Stickstoffmonoxid und natriuretische Peptide senken den Gefäßtonus und den Blutdruck durch Bildung von cGMP (Pfeifer et al., 1999) und der nachfolgenden Aktivierung der cGKI ab. Schon vor etwa 15 Jahren haben Studien von isolierten Zellen und Gewebe aus Trachea bzw. Blutgefäßen gezeigt, dass zwischen der cGKI und der Relaxation der glatten Muskulatur ein Zusammenhang besteht (Cornwell and Lincoln, 1989; Felbel et al., 1988). Mit Hilfe einer cGKI-deletierten Maus ist bestätigt worden, dass die NO-induzierte Relaxation über cGMP und die cGKI vermittelt wird (Koeppen et al., 2004). Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der verschiedenen Mechanismen der cGMP-induzierten Vasorelaxation.

D.1. cGMP-vermittelte Relaxation nach adrenerger Stimulation glatter Muskelzellen

Der glatte Gefäßmuskel ist die kontraktile Komponente der Arterien und Venen (Clark and Pyne-Geithman, 2005). Die Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur trägt entscheidend zur Regulation und Aufrechterhaltung des Blutdrucks bei (Ogut and Brozovich, 2003).

Nach Bindung von α_1 -adrenergen Agonisten an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommt es zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Dieser Prozess wird auch pharmakomechanische Kopplung genannt und führt zum Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Rezeptor-vermittelt kommt es einerseits zur Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und/ oder zum Ca^{2+} -Einstrom, andererseits zur Zunahme der Empfindlichkeit des kontraktile Apparates gegenüber Ca^{2+} (Berridge et al., 2003; Gohla et al., 2000; McDaniel et al., 2001; Salomonsson et al., 2004). α_1 -adrenerge Rezeptoren sind an Pertussis Toxin-insensitive G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie gekoppelt und bewirken die Aktivierung der Phospholipase C (Hrometz et al., 1999), welche die Hydrolyse des Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphats (PIP_2) zu DAG und IP_3 katalysiert. Letzteres bindet an den IP_3 -Rezeptor und dient als intrazellulärer Agonist einer IP_3 -Rezeptor-abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum, um die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2002; Hisatsune et al., 2005). Neben der Ca^{2+} -Freisetzung ist auch der Ca^{2+} -Einstrom über die Zytoplasmamembran ein wesentlicher Mechanismus zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. In einer neuen Arbeit kann durch Experimente am perfundierten Hinterbein gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Einstrom über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle etwa zu 50 % an der Phenylephrin-induzierten Wirkung beteiligt ist (Moosmang et al., 2003).

Hormon-induzierte Kontraktionen können über mehrere cGMP/ cGK-abhängige Mechanismen relaxiert werden. Beispiele für Mechanismen der cGMP-induzierten Relaxation sind Hyperpolarisation von BK_{Ca}-Kanälen (Sausbier et al., 2005), Ca²⁺-Desensibilisierung kontraktile Elemente (Bonnevier and Arner, 2004; Lee et al., 1997; Somlyo and Somlyo, 2003) oder Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung (Geiselhöringer et al., 2004).

Diese Arbeit zeigt an der Mauseorta, dass die Hormon-induzierte Kontraktion cGKI-abhängig über Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung relaxiert wird. Die Experimente an den cGKI^{-/-}- und IRAG^{Δ12/Δ12}-Tieren demonstrieren, dass die cGKI und IRAG die 8-Br-cGMP-induzierte Reduktion des adrenerg-induzierten Gefäßtonus und des Ca²⁺-Signals vermitteln. Das Protein IRAG ist ein Substrat der cGKI und vermittelt die cGMP-induzierte Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung aus den IP₃-sensitiven Ca²⁺-Speichern von kultivierten COS-7-Zellen (Schlossmann et al., 2000). Dabei interagiert IRAG mit der Amino-terminalen Region der cGKIβ (Ammendola et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit zeigt die IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausmutante nach Deletion der IP₃R1-IRAG Kopplungsdomäne eine verringerte 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation des Hormon-induzierten Gefäßtonus. In weiteren Versuchen ist nach Vorinkubation von 8-Br-cGMP die Wirkung des zyklischen Nukleotids auf die adrenerg-induzierte Kontraktionsamplitude und das adrenerg-induzierte Ca²⁺-Signal vollständig aufgehoben. Die Ergebnisse der Noradrenalin-induzierten Ca²⁺-Transienten an Wildtyp- und cGKI^{-/-}-VSMCs in dieser Arbeit korrelieren mit einer an glatten Muskelzellen von Mauseorta durchgeführten Studie (Pfeifer et al., 1998). Dabei ist in Anwesenheit von 8-Br-cGMP der zweite Ca²⁺-Transient in Wildtyp-VSMCs unterdrückt, im Gegensatz zu den cGKI^{-/-}-VSMCs. Auch an humanen, glatten Muskelzellen des Kolons wird die Funktion von IRAG als Substrat in der NO/ cGMP/ cGK-vermittelten Hemmung der Hormon-induzierten Ca²⁺-Freisetzung bestätigt (Fritsch et al., 2004).

Die Befunde dieser Arbeit demonstrieren, dass nach adrenerger Stimulation der glatten Muskulatur die cGMP/ cGKI-induzierte Relaxation über die IRAG-vermittelte Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung gesteuert wird. Somit stellen die cGKI und IRAG zwei wichtige Elemente in der cGMP-vermittelten Signalkaskade dar.

D.2. cGMP-vermittelte Relaxation nach Kalium-induzierter Kontraktion glatter Muskelzellen

Die Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration führt zur Kontraktion glatter Muskulatur, ohne G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Signalwege zu aktivieren. Durch den extrazellulären Kaliumanstieg wird das Kalium-vermittelte Gleichgewichtspotential verringert und somit die glatte Muskelzelle depolarisiert (Ratz et al., 2005). Die Kalium-induzierte Kontraktion wird über Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vermittelt, wodurch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ansteigt (Thorneloe and Nelson, 2005). Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt wiederum zur Aktivierung der Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen MLCK und letztendlich zur Phosphorylierung der RLC (Ratz et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Kalium-induzierte Kontraktion der Mousaorta cGMP/ cGKI-abhängig relaxiert wird. Nach Kalium-induzierter Stimulation relaxiert 8-Br-cGMP den Gefäßtonus der IRAG $^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante vergleichbar zur Wildtyp-Aorta. IRAG spielt also bei dieser Relaxation keine Rolle. Auch am Kolon der Wildtyp-Maus und der IRAG $^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante wird die Kalium-induzierte Kontraktion von 8-Br-cGMP relaxiert (Geiselhoring et al., 2004). In beiden Geweben, sowohl am Kolon als auch an der Aorta, wird die Relaxation der Kalium-induzierten Kontraktion durch die cGKI vermittelt, da der 8-Br-cGMP-Effekt an der cGKI-deletierten Maus vollständig aufgehoben ist. Die Experimente dieser Arbeit demonstrieren, dass die cGMP/ cGKI-abhängige Relaxation der Kalium-induzierten Kontraktion IRAG-unabhängig vermittelt wird. Als möglicher Mechanismus der IRAG-unabhängigen Relaxation ist in dieser Arbeit die cGMP/ cGKI-abhängige Ca^{2+} -Desensibilisierung an der Mousaorta untersucht worden.

Die Mechanismen der Ca^{2+} -Sensibilisierung kontraktile Elemente sind mit Hilfe von Arbeiten an permeabilisierten Zellen charakterisiert worden (Kitazawa et al., 1989). Die permeabilisierte Aorta dient hier als Modell, um Relaxationsprozesse bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration zu untersuchen. Einige Arbeiten zeigen, dass die Ca^{2+} -Desensibilisierung durch Anstieg der MLCP-Aktivität (Lee et al., 1997; Wu et al., 1996) über den zyklischen Nukleotid-initiierten Signalweg gesteuert wird (Lee et al., 1997; Nishimura and van Breemen, 1989). Überraschenderweise demonstriert die vorliegende Arbeit, dass die Protein Kinase A in stärkerem Ausmaß als die cGKI an der cGMP-vermittelten Ca^{2+} -Desensibilisierung der Mousaorta beteiligt ist. Dies wird daraus deutlich, dass 8-Br-cGMP sowohl permeabilisierte Muskelringe von Wildtyp- als auch von cGKI $^{-/-}$ -Mäusen relaxiert. Dieser 8-Br-cGMP-Effekt kann nach Hemmung der Protein Kinase A teilweise

am Wildtyp-Gefäß, dagegen vollständig am cGKI^{-/-}-Gefäß aufgehoben werden. Derartige Kreuzaktivierungen zwischen zyklischen Nukleotiden und den zyklischen Nukleotid-abhängigen Kinasen in Bezug auf die Relaxation im glatten Muskel sind schon früher vermutet worden (Francis and Corbin, 1994; Lincoln et al., 1995). Der erste Hinweis einer cGMP-abhängigen Kreuzaktivierung mit der Protein Kinase A wird in der intakten Aorta der cGKI^{-/-}-Maus gezeigt (Sausbier et al., 2000). Hohe Konzentrationen an NO relaxieren den Hormon-induzierten Tonus der cGKI^{-/-}-Aorta unabhängig von der cGKI. Dieser Effekt kann durch Inkubation mit dem PDE-resistenten Protein Kinase A-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS abgeschwächt werden. Ein Hinweis, dass die Kreuzaktivierung mit der Protein Kinase A über den Botenstoff cGMP vermittelt wird, zeigt die Rechtsverschiebung der EC₅₀ der NO-induzierten Relaxation nach Hemmung der löslichen Guanylatzyklase in der cGKI^{-/-}-Maus (Sausbier et al., 2000). Ebenso wird das permeabilisierte Ileum von cGKI^{-/-}-Mäusen durch hohe 8-Br-cGMP-Konzentrationen cGKI-unabhängig relaxiert (Bonnevier et al., 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt auch an der permeabilisierten cGKI^{-/-}-Aorta eine cGKI-unabhängige Relaxation bei konstant eingestellter Ca²⁺-Konzentration. Diese Relaxation wird nach Inkubation eines Protein Kinase A-Inhibitorpeptids vollständig aufgehoben. Somit kann an der permeabilisierten cGKI^{-/-}-Aorta die cGMP-induzierte Ca²⁺-Desensibilisierung durch Kreuzaktivierung mit der Protein Kinase A eindeutig demonstriert werden. 8-Br-cGMP aktiviert die Protein Kinase A vor allem bei hohen Konzentrationen des zyklischen Nukleotids (> 100 µM 8-Br-cGMP), welche physiologische Relevanz haben können. Schon frühere Studien vermuten, dass NO sehr hohe cGMP-Konzentrationen in intakten Gefäßen bilden kann (Sausbier et al., 2000). Diese *in vivo*-Daten legen die Vermutung nahe, dass NO im glatten Gefäßmuskel die cGMP-Konzentration derart ansteigen lässt, dass die cGMP-induzierte Ca²⁺-Desensibilisierung nicht nur über die cGKI, sondern auch die Protein Kinase A abläuft.

Die G-Protein-Aktivierung mit dem Thromboxan-Rezeptoragonist U46619 und GTP_γS lösen im Gefäß zusätzliche Kontraktionen bei konstant eingestellter Ca²⁺-Konzentration aus. Phenylephrin führt in den Experimenten dieser Arbeit zu einer geringen Kontraktion bei „geklemmtem“ Ca²⁺-Spiegel, im Gegensatz zur Aorta der Ratte (Himpens et al., 1990; Sakurada et al., 2001) oder zur Pfortadervene des Kaninchens (Kitazawa et al., 2003). 8-Br-cGMP relaxiert den Gefäßtonus im gleichen Ausmaß, unabhängig von zuvor erfolgter Ca²⁺-Sensibilisierung mit Phenylephrin. Dagegen ist nach Ca²⁺-Sensibilisierung mit U46619 oder GTP_γS die Wirkung von 8-Br-cGMP signifikant unterdrückt. Der Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 relaxiert diesen Tonus in stärkerem Ausmaß, als Hinweis eines funktionsfähigen Ca²⁺-desensibilisierenden Apparats in der Mousaorta. 8-Br-cGMP und Y-27632

wirken somit auf unterschiedliche Elemente des Ca^{2+} -desensibilisierenden Apparats. Der cGMP/ cGKI-abhängige Signalweg kann die MYPT1-Untereinheit der MLCP phosphorylieren, welche mehrere Phosphorylierungsstellen besitzt (Wooldridge et al., 2004). Dagegen inhibiert Y-27632 die Rho-Kinase. Wooldridge et al. (2004) zeigen, dass die cGKI-abhängige Phosphorylierung an Ser 695 die Phosphorylierung durch die MYPT1-Kinase und vermutlich die Rho-Kinase am benachbarten Thr 696 unterdrückt und damit auch die Hemmung der Enzymaktivität der MLCP. In vorliegender Arbeit zeigen die Experimente an permeabilisierter Mauseaorta, dass nach Ca^{2+} -Sensibilisierung mit U46619 oder $\text{GTP}\gamma\text{S}$ die 8-Br-cGMP-vermittelte Relaxation unterdrückt wird. Eine mögliche Hypothese wäre, in Anlehnung an Wooldridge et al., 2004, die Phosphorylierung von Thr 696 der MYPT1-Untereinheit der MLCP durch U46619 oder $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Die Phosphorylierung von Thr 696 nach Ca^{2+} -Sensibilisierung könnte die cGKI-induzierte Phosphorylierung an Ser 695 unterdrücken und somit eine Erklärung für die verringerte 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation darstellen.

Die Ergebnisse an der permeabilisierten Aorta zeigen, dass die cGMP/ cGKI-abhängige Ca^{2+} -Desensibilisierung des Ca^{2+} -induzierten Gefäßtonus nur eine geringe Rolle spielt. Daher spielt vermutlich die Ca^{2+} -Desensibilisierung bei der cGKI-abhängigen Relaxation der Kalium-induzierten Kontraktion auch eine untergeordnete Rolle. Ein anderer Mechanismus der cGMP/ cGKI-vermittelten Relaxation ist die Absenkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, einerseits über Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung bzw. des Ca^{2+} -Einstroms, andererseits über Aktivierung der Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum (Schlossmann et al., 2003). In dieser Arbeit sind Kalziummessungen durchgeführt worden, um zu untersuchen, ob das Kalium-induzierte Ca^{2+} -Signal cGMP/ cGKI-abhängig reduziert werden kann. Damit soll der Mechanismus der cGMP/ cGKI-vermittelten Relaxation nach Kalium-induzierter Kontraktion näher beleuchtet werden. Nach Kalium-Stimulation wird das Ca^{2+} -Signal in VSMCs der Wildtyp-Maus und der IRAG $^{\Delta 12/\Delta 12}$ -Mausmutante durch 8-Br-cGMP reduziert, im Gegensatz zum Ca^{2+} -Signal in VSMCs der cGKI $^{-/-}$ -Maus. Diese Experimente demonstrieren, dass nach Kalium-Stimulation die cGMP/ cGKI-vermittelte Relaxation IRAG-unabhängig über Erniedrigung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermittelt wird. Im Einklang mit diesen Befunden wird an VSMCs die IRAG-unabhängige Reduktion des Kalium-vermittelten Ca^{2+} -Signals bestätigt (Geiselhöringer et al., 2004).

Ein wichtiger Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass die cGMP/ cGKI-abhängige Relaxation nach Kalium-induzierter Kontraktion über die Reduktion der zytosolischen

Ca^{2+} -Konzentration vermittelt wird. Der Mechanismus der cGMP-vermittelten Aufnahme von Ca^{2+} ins Sarkoplasmatische Retikulum (Twort and van Breemen, 1988) könnte zur Erklärung der Reduktion der Kalium-vermittelten Kontraktion und des Ca^{2+} -Signals dienen. Diese Aufnahme wird von einer Ca^{2+} -ATPase, der SERCA, durchgeführt. Welche Rolle spielt die Aktivierung der SERCA für die cGMP-gesteuerte Gefäßrelaxation nach Kalium-induzierter Stimulation? Zur Untersuchung dieser Frage haben wir den SERCA-Inhibitor Thapsigargin verwendet. Die Kontraktionsexperimente mit Thapsigargin lassen sich verschieden interpretieren. Vor Kurzem hat eine Arbeit gezeigt, dass die RhoA-Stimulation auch durch den Kalium-induzierten Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol vermittelt werden kann (Sakurada et al., 2003). Somit kann es auch nach Kalium- und Thapsigargin-vermitteltem zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg zu einer Ca^{2+} -abhängigen RhoA-Stimulation mit nachfolgender Ca^{2+} -Sensibilisierung kommen. Eine Interpretationsmöglichkeit der Kontraktionsmessungen mit Thapsigargin ist die cGMP-vermittelte Regulation des RhoA/ Rho-Kinase-Signalwegs. Auf den Thapsigargin-induzierten Tonus hat nur der Rho-Kinase-Hemmstoff eine relaxierende Wirkung, nicht aber 8-Br-cGMP. Somit würde 8-Br-cGMP den RhoA/ Rho-Kinase-Signalweg nicht beeinflussen. Auf der anderen Seite ist nach Thapsigargin-Inkubation der relaxierende Effekt von 8-Br-cGMP auf den Kalium-induzierten Tonus signifikant verringert. Hier könnte 8-Br-cGMP, zumindest teilweise, den relaxierenden Effekt über den RhoA/ Rho-Kinase-Weg vermitteln.

Die Aktivierung der SERCA könnte eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die cGMP-vermittelte Relaxation nach Kalium-Stimulation darstellen. Die SERCA vermittelt die Aufnahme des zytosolischen Ca^{2+} in das Sarkoplasmatische Retikulum (Wu et al., 2001). Der mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin-induzierte Gefäßtonus wird nicht von 8-Br-cGMP relaxiert. Dies steht im Einklang mit einer weiteren Arbeit, die zeigt, dass NO den Thapsigargin-induzierten Gefäßtonus nicht relaxiert (Cohen et al., 1999). Daneben wird auch der Kalium-induzierte Tonus und das Ca^{2+} -Signal in Anwesenheit von Thapsigargin signifikant geringer als ohne den SERCA-Inhibitor durch 8-Br-cGMP reduziert. Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass die SERCA für die cGMP-vermittelte Relaxation notwendig erscheint. Eine Arbeit an der Katzenaorta bestätigt, dass nach Thapsigargin-Inkubation die NO-vermittelte Relaxation des Kalium-induzierten Gefäßtonus unterdrückt ist (Mundina-Weilenmann et al., 2000). Die cGMP-induzierte Reduktion der Gefäßkontraktion und zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration könnte daher über den Mechanismus der Aktivierung der SERCA vermittelt werden.

Die cGMP-abhängige Aktivierung der SERCA erfolgt vermutlich über Regulatorproteine der SERCA. Phospholamban ist ein Membranprotein des Sarkoplasmatischen Retikulums mit einem Molekulargewicht von 6 kDa und hemmt in der unphosphorylierten Form die Aktivität der SERCA

(Sutliff et al., 2004). Phospholamban wird in der Mauseorta sowohl cAMP- als auch cGMP-abhängig phosphoryliert, wodurch die Hemmung der SERCA aufgehoben wird (Lalli et al., 1999). Auch an isolierten Muskelzellen der Rattenaorta wird die cGMP-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban bestätigt (Cornwell et al., 1991). Mittels PLB^{-/-}-Mäusen wird der Beitrag von Phospholamban (PLB) an der cGMP-vermittelten Relaxation des Kalium-induzierten Gefäßtonus untersucht. An PLB^{-/-}-Mäusen ist die 8-Br-cGMP-induzierte Relaxation der Kalium-vermittelten Kontraktion etwas verringert. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung von Phospholamban an der cGMP-vermittelten Relaxation nach Kalium-Stimulation, jedoch verläuft der größte Teil der Relaxation unabhängig von Phospholamban. Neben Phospholamban können auch andere Regulatorproteine der SERCA für den Effekt von 8-Br-cGMP verantwortlich sein. Sarcolipin ist ein weiteres Membranprotein des Sarkoplasmatischen Retikulums, das mit der SERCA interagiert und diese inhibiert (Asahi et al., 2003a). Sarcolipin und Phospholamban besitzen ähnliche transmembranäre Sequenzen, unterscheiden sich jedoch in ihren C-Termini (Asahi et al., 2003b). Die SERCA kann von Sarcolipin über direkte Interaktion oder durch Stabilisierung des SERCA-Phospholamban Komplexes inhibiert werden (Asahi et al., 2003a). Zusätzlich zu Phospholamban könnte daher auch Sarcolipin ein Substrat des cGMP/ cGK-abhängigen Signalwegs darstellen. Inwieweit dieses Protein an der cGK-vermittelten Relaxation eine Rolle spielt, ist noch völlig unklar und in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit verschiedene cGMP-induzierte Mechanismen zur Relaxation der Mauseorta. Die cGMP-vermittelte Relaxation verläuft nach α_1 -adrenerger Stimulation über die IRAG-vermittelte Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung und nach Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration über die IRAG-unabhängige Reduktion des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels.

E. Zusammenfassung

Das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) steuert die Relaxation glatter Muskulatur. Dabei aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase im Zytosol der glatten Muskelzelle. Die lösliche Guanylatzyklase bildet den Botenstoff cGMP, der die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) aktiviert. Die cGK gehört zur Familie der Serin/ Threonin-Proteinkinasen und führt nach Phosphorylierung von unterschiedlichen Signalproteinen zur Relaxation der glatten Muskulatur. Der Beitrag des NO/ cGMP/ cGK-Signalwegs zur glattmuskulären Relaxation kann mit Hilfe von genetisch veränderten Mauslinien, denen Komponenten dieses Signalwegs fehlen, untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit werden neben Wildtyp-Mäusen mit intaktem NO/ cGMP/ cGK-Signalweg die cGKI^{-/-}-Mäuse, denen das Protein cGKI deletiert ist, und die IRAG^{Δ12/Δ12}-Mausmutanten, die nach Zerstörung des Exon 12 des *IRAG*-Gens zwei hypomorphe IRAG-Allele besitzen, verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit werden die cGMP-abhängigen Mechanismen der Relaxation nach Hormon- und Kalium-induzierter Stimulation glatter Muskelzellen untersucht. Die Experimente werden einerseits am intakten und permeabilisierten Gefäß und andererseits an kultivierten, vaskulären glatten Muskelzellen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Existenz unterschiedlicher Mechanismen zur cGMP-vermittelten Relaxation an der Mauseorta. Nach Hormon-induzierter Stimulation wird der Gefäßtonus durch den cGMP/ cGKI-Signalweg relaxiert. Dabei wird der Effekt hauptsächlich über IRAG durch Hemmung der Ca²⁺-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern vermittelt. Die Kalium-vermittelte Kontraktion wird ebenso cGMP/ cGKI-abhängig relaxiert, jedoch unabhängig von IRAG. Überraschenderweise demonstrieren die Ergebnisse an der permeabilisierten Aorta, dass die cGMP/ cGKI-vermittelte Ca²⁺-Desensibilisierung eine untergeordnete Rolle spielt und in Gegenwart hoher cGMP-Konzentrationen über die Protein Kinase A vermittelt wird. Die Kontraktionsexperimente mit Thapsigargin weisen darauf hin, dass vermutlich die SERCA an der Relaxation des Kalium-induzierten Tonus beteiligt ist.

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., Geiselhoringer, 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.
- Asahi, M., Nakayama, H., Tada, M. and Otsu, K. (2003a) Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure. *Trends Cardiovasc Med*, **13**, 152-157.
- Asahi, M., Sugita, Y., Kurzydowski, K., De Leon, S., Tada, M., Toyoshima, C. and MacLennan, D.H. (2003b) Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5040-5045.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Lipp, P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature*, **395**, 645-648.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 151-171.
- Bonnevier, J. and Arner, A. (2004) Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2⁺) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem*, **279**, 28998-29003.
- Bonnevier, J., Fassler, R., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. and Arner, A. (2004) Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice. *J Biol Chem*, **279**, 5146-5151.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. and Roderick, H.L. (2002) Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7320-7322.
- Brooks, S.P. and Storey, K.B. (1992) Bound and determined: a computer program for making buffers of defined ion concentrations. *Anal Biochem*, **201**, 119-126.
- Chao, D.S., Silvagno, F., Xia, H., Cornwell, T.L., Lincoln, T.M. and Bredt, D.S. (1997) Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience*, **76**, 665-672.
- Cheng, H.C., Kemp, B.E., Pearson, R.B., Smith, A.J., Misconi, L., Van Patten, S.M. and Walsh, D.A. (1986) A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **261**, 989-992.
- Choudhury, N., Khromov, A.S., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (2004) Telokin mediates Ca²⁺-desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, **25**, 657-665.

- Clark, J.F. and Pyne-Geithman, G. (2005) Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. *Pathophysiology*, **12**, 35-45.
- Cohen, R.A., Weisbrod, R.M., Gericke, M., Yaghoubi, M., Bierl, C. and Bolotina, V.M. (1999) Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res*, **84**, 210-219.
- 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.
- Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A. and Lincoln, T.M. (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **40**, 923-931.
- de Vente, J., Asan, E., Gambaryan, S., Markerink-van Ittersum, M., Axer, H., Gallatz, K., Lohmann, S.M. and Palkovits, M. (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*, **108**, 27-49.
- Dedkova, E.N. and Blatter, L.A. (2002) Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol*, **539**, 77-91.
- Dejam, A., Hunter, C.J., Schechter, A.N. and Gladwin, M.T. (2004) Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*, **32**, 423-429.
- Deng, J.T., Van Lierop, J.E., Sutherland, C. and Walsh, M.P. (2001) Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem*, **276**, 16365-16373.
- Draijer, R., Vaandrager, A.B., Nolte, C., de Jonge, H.R., Walter, U. and van Hinsbergh, V.W. (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res*, **77**, 897-905.
- Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. and Morita, F. (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 1104-1107.
- 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.
- Felbel, J., Trockur, B., Ecker, T., Landgraf, W. and Hofmann, F. (1988) Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J Biol Chem*, **263**, 16764-16771.
- Filtz, T.M. and Niibori, Y. (2004) Desensitization of angiotensin-stimulated inositol phosphate accumulation in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **502**, 11-19.
- Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1994) Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv Pharmacol*, **26**, 115-170.
- Fritsch, R.M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhoring, A., Hofmann, F. and Allescher, H.D. (2004) InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle. *J Biol Chem*, **279**, 12551-12559.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. and Keef, K.D. (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274**, 10927-10935.

- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.
- Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A. and Lohmann, S.M. (1996) Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest*, **98**, 662-670.
- Geiselhoring, 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. (2004) IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *Embo J*, **23**, 4222-4231.
- Gohla, A., Schultz, G. and Offermanns, S. (2000) Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res*, **87**, 221-227.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- Hamaguchi, T., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Koyama, M., Machida, H., Takase, K., Amano, M., Kaibuchi, K., Hartshorne, D.J. and Nakano, T. (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochem Biophys Res Commun*, **274**, 825-830.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S. and Murad, F. (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, **7**, 801-819.
- Hartshorne, D.J. (1998) Myosin phosphatase: subunits and interactions. *Acta Physiol Scand*, **164**, 483-493.
- Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 376-382.
- Himpens, B., Kitazawa, T. and Somlyo, A.P. (1990) Agonist-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Arch*, **417**, 21-28.
- Hisatsune, C., Nakamura, K., Kuroda, Y., Nakamura, T. and Mikoshiba, K. (2005) Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem*, **280**, 11723-11730.
- Hofmann, F. (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **280**, 1-4.
- 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., Gensheimer, H.P. and Gobel, C. (1985) cGMP-dependent protein kinase. Autophosphorylation changes the characteristics of binding site 1. *Eur J Biochem*, **147**, 361-365.
- Hrometz, S.L., Edelmann, S.E., McCune, D.F., Olges, J.R., Hadley, R.W., Perez, D.M. and Piascik, M.T. (1999) Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther*, **290**, 452-463.
- 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.
- Ito, M., Dabrowska, R., Guerriero, V., Jr. and Hartshorne, D.J. (1989) Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, **264**, 13971-13974.
- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. and Hartshorne, D.J. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*, **259**, 197-209.

- Joyce, N.C., DeCamilli, P., Lohmann, S.M. and Walter, U. (1986) cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, **11**, 191-198.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-473.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P. and Brautigan, D.L. (2000) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, **275**, 9897-9900.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P. and Khalequzzaman, M. (2003) Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, **546**, 879-889.
- Kitazawa, T., Kobayashi, S., Horiuti, K., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1989) Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca²⁺. *J Biol Chem*, **264**, 5339-5342.
- Kitazawa, T., Polzin, A.N. and Eto, M. (2004) CPI-17-deficient smooth muscle of chicken. *J Physiol*, **557**, 515-528.
- Klein, C. (2002) Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell Signal*, **14**, 493-498.
- 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.
- Kobayashi, S., Kitazawa, T., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1989) Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca²⁺ release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem*, **264**, 17997-18004.
- 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.
- Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J. and Nakano, T. (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*, **475**, 197-200.
- Krumenacker, J.S., Hanafy, K.A. and Murad, F. (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*, **62**, 505-515.
- Kumar, R., Joyner, R.W., Komalavilas, P. and Lincoln, T.M. (1999) Analysis of expression of cGMP-dependent protein kinase in rabbit heart cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **291**, 967-975.
- Lalli, M.J., Shimizu, S., Sutliff, R.L., Kranias, E.G. and Paul, R.J. (1999) [Ca²⁺]_i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol*, **277**, H963-970.
- Landgraf, W., Hofmann, F., Pelton, J.T. and Huggins, J.P. (1990) Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism. *Biochemistry*, **29**, 9921-9928.
- Lee, M.R., Li, L. and Kitazawa, T. (1997) Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 5063-5068.
- Lincoln, T.M., Dey, N. and Sellak, H. (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*, **91**, 1421-1430.

- Lincoln, T.M., Komalavilas, P., Boerth, N.J., MacMillan-Crow, L.A. and Cornwell, T.L. (1995) cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv Pharmacol*, **34**, 305-322.
- Lloyd-Jones, D.M. and Bloch, K.D. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*, **47**, 365-375.
- Lohmann, S.M., Walter, U., Miller, P.E., Greengard, P. and De Camilli, P. (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 653-657.
- MacDonald, J.A., Eto, M., Borman, M.A., Brautigan, D.L. and Haystead, T.A. (2001) Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett*, **493**, 91-94.
- Marchant, J.S. (2005) Cellular signalling: STIMulating calcium entry. *Curr Biol*, **15**, R493-495.
- McDaniel, S.S., Platoshyn, O., Wang, J., Yu, Y., Sweeney, M., Krick, S., Rubin, L.J. and Yuan, J.X. (2001) Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **280**, L870-880.
- Moore, E.D., Becker, P.L., Fogarty, K.E., Williams, D.A. and Fay, F.S. (1990) Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium*, **11**, 157-179.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F. and Klugbauer, N. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J*, **22**, 6027-6034.
- Mulvany, M.J. (1988) *Procedures for investigation of small vessels using small vessel myograph*. Mulvany, M. J., Aarhus.
- Mundina-Weilenmann, C., Vittone, L., Rinaldi, G., Said, M., de Cingolani, G.C. and Mattiazzi, A. (2000) Endoplasmic reticulum contribution to the relaxant effect of cGMP- and cAMP-elevating agents in feline aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H1856-1865.
- Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S. and Nakano, T. (1999) Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal*, **11**, 671-676.
- Nishimura, J. and van Breemen, C. (1989) Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 929-935.
- Ogut, O. and Brozovich, F.V. (2003) Regulation of force in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol*, **35**, 347-355.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.
- 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.
- Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A. and Lincoln, T.M. (1995) Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. *Blood*, **85**, 222-230.

- Qian, Y., Chao, D.S., Santillano, D.R., Cornwell, T.L., Nairn, A.C., Greengard, P., Lincoln, T.M. and Bredt, D.S. (1996) cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci*, **16**, 3130-3138.
- Ratz, P.H., Berg, K.M., Urban, N.H. and Miner, A.S. (2005) Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**, C769-783.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C. and Hofmann, F. (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem*, **202**, 1339-1344.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. and Hofmann, F. (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2623-2627.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X.B. and Beavo, J.A. (2003) PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *Embo J*, **22**, 469-478.
- Sakurada, S., Okamoto, H., Takuwa, N., Sugimoto, N. and Takuwa, Y. (2001) Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C571-578.
- Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. and Takuwa, Y. (2003) Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res*, **93**, 548-556.
- Salomonsson, M., Sorensen, C.M., Arendshorst, W.J., Steendahl, J. and Holstein-Rathlou, N.H. (2004) Calcium handling in afferent arterioles. *Acta Physiol Scand*, **181**, 421-429.
- Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X.B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C.A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R., Hofmann, F., Knaus, H.G., Kenyon, C., Shipston, M.J., Storm, J.F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M. and Ruth, P. (2005) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation*, **112**, 60-68.
- 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.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. and Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 21722-21729.
- Sawada, N., Itoh, H., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Fukunaga, Y., Sakaguchi, S., Sone, M., Yamahara, K., Yurugi, T. and Nakao, K. (2001) cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 798-805.
- 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 Ibeta. *Nature*, **404**, 197-201.
- Schlossmann, J., Feil, R. and Hofmann, F. (2003) Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, **35**, 21-27.
- Schlossmann, J., Feil, R. and Hofmann, F. (2005) Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci*, **10**, 1279-1289.
- Shmygol, A. and Wray, S. (2004) Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. *Cell Calcium*, **35**, 501-508.

- Sigl, K. (2004) *Regulation des zytosolischen Kalziums durch IRAG*. Sigl, K., München.
- Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1998) From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand*, **164**, 437-448.
- Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **522 Pt 2**, 177-185.
- 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.
- Sonnenburg, W.K. and Beavo, J.A. (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114.
- Stevenson, A.S., Matthew, J.D., Eto, M., Luo, S., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (2004) Uncoupling of GPCR and RhoA-induced Ca²⁺-sensitization of chicken amnion smooth muscle lacking CPI-17. *FEBS Lett*, **578**, 73-79.
- 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.
- Surks, H.K., Richards, C.T. and Mendelsohn, M.E. (2003) Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA. *J Biol Chem*, **278**, 51484-51493.
- Sutliff, R.L., Conforti, L., Weber, C.S., Kranias, E.G. and Paul, R.J. (2004) Regulation of the spontaneous contractile activity of the portal vein by the sarcoplasmic reticulum: evidence from the phospholamban gene-ablated mouse. *Vascul Pharmacol*, **41**, 197-204.
- 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.
- Taniguchi, J., Furukawa, K.I. and Shigekawa, M. (1993) Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, **423**, 167-172.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2466-2470.
- Thorneloe, K.S. and Nelson, M.T. (2005) Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol*, **83**, 215-242.
- Trepakova, E.S., Gericke, M., Hirakawa, Y., Weisbrod, R.M., Cohen, R.A. and Bolotina, V.M. (2001) Properties of a native cation channel activated by Ca²⁺ store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **276**, 7782-7790.
- Trinkle-Mulcahy, L., Ichikawa, K., Hartshorne, D.J., Siegman, M.J. and Butler, T.M. (1995) Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with a decreased activity of myosin light chain phosphatase in alpha-toxin-permeabilized smooth muscle. *J Biol Chem*, **270**, 18191-18194.
- Twort, C.H. and van Breemen, C. (1988) Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res*, **62**, 961-964.

- Ushio-Fukai, M., Griendling, K.K., Akers, M., Lyons, P.R. and Alexander, R.W. (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*, **273**, 19772-19777.
- 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.
- 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.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K.H. and Walter, U. (1986) Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem*, **158**, 203-210.
- Walford, G. and Loscalzo, J. (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*, **1**, 2112-2118.
- Wang, X., Huang, G., Luo, X., Penninger, J.M. and Muallem, S. (2004) Role of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in Ca²⁺ oscillations and adaptation of Ca²⁺ signaling to reduce excitability of RGS2^{-/-} cells. *J Biol Chem*, **279**, 41642-41649.
- Webb, R.C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, **27**, 201-206.
- Werner, C., Raivich, G., Cowen, M., Strelakova, T., Sillaber, I., Buters, J.T., Spanagel, R. and Hofmann, F. (2004) Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci*, **20**, 3498-3506.
- 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.
- Wu, K.D., Bungard, D. and Lytton, J. (2001) Regulation of SERCA Ca²⁺ pump expression by cytoplasmic Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**, C843-851.
- Wu, X., Haystead, T.A., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1998) Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *J Biol Chem*, **273**, 11362-11369.
- Wu, X., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, **220**, 658-663.
- Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M. and Liu, M. (2001) Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **276**, 19770-19777.
- Xiao, D., Longo, L.D. and Zhang, L. (2005) Alpha1-adrenoceptor-mediated phosphorylation of MYPT-1 and CPI-17 in the uterine artery: role of ERK/PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H2828-2835.
- Zhao, J., Trewella, J., Corbin, J., Francis, S., Mitchell, R., Brushia, R. and Walsh, D. (1997) Progressive cyclic nucleotide-induced conformational changes in the cGMP-dependent protein kinase studied by small angle X-ray scattering in solution. *J Biol Chem*, **272**, 31929-31936.
- Zimmerman, A.L., Yamanaka, G., Eckstein, F., Baylor, D.A. and Stryer, L. (1985) Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8813-8817.

F.2. Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Geiselhoringer, 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.

Abstracts

Worner, R., Wegener, J.W., Wolfsgruber, W., Goldis, V., Feil, S., Feil, R. and Hofmann, F. (2004) Analysis of intestinal motility in conventional and smooth muscle-specific cGKI knockout mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, **369**(Suppl. 1), R43.

Worner, R., Sigl, K., Schlossmann, J., Feil, R., Hofmann, F. and Wegener, J.W. (2005) Differential mechanisms of relaxation by cGMP kinase in vascular smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, **371**(Suppl. 1), R50.

Worner, R., Feil, R., Hofmann, F. and Wegener, J.W. (2005) Protein Kinase A mediates 8-Br-cGMP-induced Ca²⁺-desensitization in murine aorta. *BMC Pharmacol.*, **5**(Suppl. 1), P63.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für sein stetes Interesse an meiner Arbeit. Zweifellos hat er durch seine Anregungen und Hilfe entscheidend zum Fortgang der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die Übernahme der Berichterstattung vor der Fakultät.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Jörg Wegener für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung und für sein persönliches Engagement bedanken.

Herrn Prof. Dr. Robert Feil für die hilfreiche Betreuung der Kalziummessungen an den kultivierten glatten Muskelzellen.

Susanne, Sabine, Maria und im Besonderen Pascal für das gute Betriebsklima, die reibungslose Zusammenarbeit bei der Durchführung von Experimenten und für allerlei Hilfestellungen bei Fragen im Laboralltag.

Herrn Sahiner und Herrn Durmaz für die stetige Hilfe und Versorgung der Mäuse im Tierstall.

Herrn PD Dr. Thomas Kleppisch als Jogging-Partner für die unzähligen Runden durch den Englischen Garten.

Der Werkstatt danke ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei Problemen im Laboralltag.

Herzlichen Dank auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ein Extra-Dankeschön an Bettina für die Korrektur der Arbeit.

Und ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihren Rückhalt, ihr Verständnis und ihre großzügige Unterstützung diese Ausbildung ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

René Theodor Wörner
geboren am 12. März 1976 in Freising
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schule

1982 - 1986 Grundschule Gaustadt, Bamberg
1986 - 1995 Clavius-Gymnasium, Bamberg,
mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

September 1995 Zivildienst bei der Dienststelle des Malteser-Hilfsdienstes Bamberg
- September 1996

Studium

November 1996 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
- September 2000

März 1999	1. Staatsexamen
September 2000	2. Staatsexamen
Dezember 2001	3. Staatsexamen

Praktika

Famulatur

März 1997 E.T.A.-Hoffmann-Apotheke, Bamberg
September 1997 Wallenstein-Apotheke, Bamberg

Pharmazeutisches Praktikum

Oktober 2000 Apotheke am Odeonsplatz, München
- April 2001

Mai 2001 Zentralapotheke der Kreiskrankenhäuser des Landkreises
- Oktober 2001 München, München-Pasing

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit Februar 2002 wissenschaftlicher Angestellter am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie der TU München
bei Prof. Dr. Franz Hofmann