



**Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt**

Lehrstuhl für Humanbiologie

Die Rolle des cGMP/cGKI Signalweges und der Trpc-Kanäle in der Regulation des vaskulären Tonus

Florian Bernhard Loga

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Martin Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Michael Schemann

2. Univ.-Prof. Dr. Franz Hofmann (i. R.)

Die Dissertation wurde am 11.07.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.10.2013 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungen	9
1. Einleitung	11
1.1 Blutdruckregulation	12
1.2 Kontraktion der glatten Muskulatur	13
1.3 Trp-Kanäle der <i>klassischen Unterfamilie</i> (Trpc).....	15
1.4 Relaxation der glatten Muskulatur	17
1.4.1 NO/cGMP/cGK Signalweg.....	17
1.4.2 cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur.....	20
1.5 Funktioneller Zusammenhang zwischen Trpc-Kanälen und dem NO/cGMP/cGKI Signalweg.....	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.2 Geräte	25
2.3 Versuchstierhaltung.....	26
2.4 Versuchstiere.....	26
2.5 Präparation der murinen <i>Aorta abdominalis</i> und <i>Aorta thoracalis</i>	27
2.6 Physiologische Methoden.....	28
2.6.1 Hinterbein-Perfusion.....	28
2.6.1.1 Apparativer Aufbau und Durchführung	29
2.6.1.2 Auswertung der Hinterbein-Perfusion	33
2.6.2 Kraftmessung am glatten Muskel (<i>Aorta thoracalis</i>)	35
2.6.2.1 Versuchsapparatur und Durchführung.....	35
2.6.2.2 Auswertung der Kraftmessung an Aortenringen	38
2.7 Molekularbiologische Methoden	39
2.7.1 Isolierung genomischer DNS aus Mausgewebe	39
2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNS aus Mausgewebe	39
2.7.3 Konzentrationsbestimmung der RNS.....	40
2.7.4 DNS-Verdau	41

2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion	42
2.7.5.1 Amplifikation genomischer DNS (Genotypisierung)	42
2.7.5.2 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR.....	43
2.7.5.3 Agarose-Gelelektrophorese	45
2.7.5.4 Auswertung der Agarosegele	46
2.8 Zellbiologische Methoden	46
2.8.1 Isolierung endothelialer und glattmuskulärer Zellen aus muriner <i>Aorta thoracalis</i>	46
2.8.2 Immunocytochemische Untersuchung.....	48
2.8.2.1 Durchführung des Versuches.....	49
2.8.2.2 Auswertung des Versuches	50
2.8.3 Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$	50
2.8.3.1 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2.....	51
2.8.3.2 Versuchsapparatur	52
2.8.3.3 Durchführung des Versuches	53
2.8.3.4 Auswertung des Versuches	54
2.9 Statistische Methoden	55
3. Ergebnisse	56
3.1 Effekte vasoaktiver Pharmaka auf die Kontraktilität der <i>Aorta thoracalis</i> und des Gefäßsystems der Hinterbeine verschiedener Mausmodelle.....	56
3.1.1 Effekt von PE+L-NAME auf die Kontraktilität der <i>Aorta thoracalis</i>	56
3.1.2 Effekt von Phenylephrin auf den systemischen Druck.....	58
3.1.3 Effekt von 8-Br-cGMP auf die PE+L-NAME-induzierte Kontraktion der <i>A. thoracalis</i>	61
3.1.4 Effekt von 8-Br-cGMP auf den PE-vermittelten systemischen Druckanstieg.....	63
3.1.5 Effekt von Phenylephrin auf die Kontraktilität der <i>A. thoracalis</i>	65
3.1.6 Effekt von Carbachol auf die PE-vermittelte Kontraktion der <i>A. thoracalis</i>	67
3.2 Immunocytochemische Analyse der Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6	68
3.2.1 Expression zellspezifischer Marker.....	68
3.2.2 Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten Endothelzellen der <i>A. thoracalis</i>	69

3.2.3 Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten glatten Muskelzellen der <i>A. thoracalis</i>	71
3.3 RT-PCR Analyse der Gesamt-RNS intakter und Endothel-befreiter Aorten von WT-Mäusen.....	73
3.4 Intrazelluläre Calcium-Messung $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit vasoaktiven Pharmaka	75
3.4.1 Calcium-Messung in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der <i>A. thoracalis</i>	75
3.4.2 Calcium-Messung in frisch isolierten Endothelzellen der <i>A. thoracalis</i>	77
4. Diskussion	79
4.1 Effekte von PE, L-NAME und CCh auf die Kontraktilität der <i>Aorta</i> <i>thoracalis</i> und des Gefäßsystems der Hinterbeine in den verschiedenen Mausmodellen	79
4.2 Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs von Trpc- Kanälen und dem cGMP/cGKI Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen	82
4.3 Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs von Trpc- Kanälen und dem cGMP/cGKI Signalweg in Endothelzellen.....	84
5. Zusammenfassung	87
6. Abstract	89
7. Literaturverzeichnis	90
8. Anhang	101
8.1 Verwendete Primer.....	101
8.1.1 Primer zu Genotypisierung	101
8.1.2 Primer für RT-PCR	102
8.2 Verwendete Antikörper	103
8.2.1 Primäre Antikörper.....	103
8.2.2 Sekundäre Antikörper.....	103
9. Eigene Publikationen	104
10. Danksagung	106
11. Eidesstattliche Erklärung	107
12. Lebenslauf	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die 10 häufigsten Todesursachen weltweit (2008).	11
Abbildung 2: Signifikante Abnahme der kardiovaskulären Letalität bei Patienten mit systolischer-diastolischer bzw. isolierter systolischer Hypertonie unter antihypertensiver Behandlung.	12
Abbildung 3: Rezeptor- und Speicher-aktivierter Ca^{2+} -Einstrom	14
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Trpc-Kanal-Unterfamilie.	16
Abbildung 5: Der NO/cGMP/cGK Signalweg.	19
Abbildung 6: Zelluläre Abläufe der Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur.	21
Abbildung 7: Inhibierung des Trpc1/Trpc3- Heteromers durch cGK.....	22
Abbildung 8: PE-induzierte Kontraktion in Aortenringen von WT-Mäusen und heterozygoten Kontrolltieren mit intaktem Endothel.	27
Abbildung 9: Apparativer Aufbau der Hinterbein-Perfusionsanlage.	29
Abbildung 10: Systemischer Druck der einzelnen Mauslinien bei der Hinterbein-Perfusion.	30
Abbildung 11: Relaxation des PE-Tonus durch CCh im WT-Hinterbein.....	31
Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von PE und 8-Br-cGMP auf den systemischen Druck im Hinterbeinmodell der WT-Maus.	32
Abbildung 13: Graphische Auswertung der Hinterbein-Perfusion.	34
Abbildung 14: Apparativer Aufbau für die Kraftmessung am glatten Gefäßmuskel unter physiologischen Bedingungen.	35
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von PE in Aortenringen von WT und Trpc6-KO-Mäusen bzw. von CCh in Aortenringen von WT-Mäusen.....	37
Abbildung 16: Relaxation des PE-Tonus (3 μ M) durch CCh in der Aorta von Kontrolltieren.	38
Abbildung 17: Prinzip der intrazellulären Calcium-Messung.	51
Abbildung 18: Apparativer Aufbau der Anlage zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$	52
Abbildung 19: Eichkurve Fura-2 (AM)	55
Abbildung 20: PE-induzierte Kraft in murinen Aorten in Anwesenheit von L-NAME.58	
Abbildung 21: PE-induzierter Druckanstieg im Gefäßsystem muriner Hinterbeine. .59	
Abbildung 22: Effekt von L-NAME auf den PE-induzierten Druckanstieg im murinen Hinterbein.	60

Abbildung 23: Reduktion des PE-induzierten Kraftanstiegs durch 8-Br-cGMP in murinen Aorten.	62
Abbildung 24: Reduktion des PE-induzierten Druckanstieges durch 8-Br-cGMP im murinen Hinterbein.....	64
Abbildung 25: PE-induzierte Kraft in intakten murinen Aorten.	66
Abbildung 26: Relative PE-induzierte Kraft in intakten murinen Aorten.	66
Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von CCh in Aortenringen unterschiedlicher Mauslinien.	67
Abbildung 28: Analyse der Spezifität des Endothelzell- und Glattmuskelzell-Markers mittels Immunocytochemie.	69
Abbildung 29: Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in Endothelzellen muriner Aorten.	70
Abbildung 30: Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in glatten Gefäßmuskelzellen muriner Aorten.....	72
Abbildung 31: Analyse der Gesamt-RNS aus intakten und Endothel-befreiten WT-Aorten mittels RT-PCR.	74
Abbildung 32: Intrazelluläre $[Ca^{2+}]$ in glatten Gefäßmuskelzellen muriner Aorten....	76
Abbildung 33: Intrazelluläre $[Ca^{2+}]$ in Endothelzellen muriner Aorten.	78
Abbildung 34: Rolle des cGMP/cGKI Signalweges und des endothelialen Trpc6-Kanals in der Regulation des vaskulären Tonus.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pufferlösung für Hinterbein-Perfusion (CO ₂ -Tyrode).....	28
Tabelle 2: Stammlösungen der vasoaktiven Pharmaka.....	33
Tabelle 3: Herstellung von Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H ₂ O).....	40
Tabelle 4: Ansatz für DNS-Verdau.....	41
Tabelle 5: Ansatz für 10x Reaktionspuffer-Puffer ohne dNTPs.....	41
Tabelle 6: PCR-Reaktionsansatz zur Genotypisierung.....	43
Tabelle 7: Ansatz für (A) 5x RT Green buffer und (B) dNTP Mix.....	43
Tabelle 8: PCR-Protokoll in Abhängigkeit der zu untersuchenden Amplifikate und der dazugehörigen Primer.....	43
Tabelle 9: Reaktionsansatz RT-PCR nach QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.....	44
Tabelle 10: RT-PCR-Protokoll nach QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.....	44
Tabelle 11: Zusammensetzung 6x DNS-Ladepuffer.....	45
Tabelle 12: Zusammensetzung (A) 10x Tris-Borat-EDTA (TBE) und (B) DNS- Standard (1 kb Leiter).....	46
Tabelle 13: Zusammensetzung Ca ²⁺ -freie Tyrode (VSMC-Präparation).....	48
Tabelle 14: Lösung A zur Isolation von VSMCs.....	48
Tabelle 15: Lösung B zur Isolation von VSMCs.....	48
Tabelle 16: Zusammensetzung phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).....	49
Tabelle 17: Zusammensetzung Paraformaldehydlösung (4 %).....	49
Tabelle 18: Stammlösung des (A) Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 (AM) und (B) Calcium Ionophores 4-Br-A23187.....	54
Tabelle 19: Zusammensetzung HEPES-Tyrode für Calcium-Bestimmung.....	54
Tabelle 20: Verwendete primäre Antikörper für die Immunocytochemie.....	103
Tabelle 21: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunocytochemie.....	103

Abkürzungen

4-Br-A23187	4-Bromo-A23187	IP ₃ RI	IP ₃ -Rezeptor I
8-Br-cGMP	8-Bromo-cGMP	IRAG	inositol 1,4,5-triphosphate-associated cGMP kinase substrate
Abb.	Abbildung	kb	kilo base
ACh	Acetylcholin	KO	Knockout
α-SMA	alpha-smooth muscle actin	KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
AM (Fura-2)	Acetoxymethylester	L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
Ang II	Angiotensin II	mg, µg	Milligramm, Mikrogramm
Ang II RI	Angiotensin II Rezeptor Typ I	min, ms	Minute, Millisekunde
ANOVA	analysis of variance	ml, µl	Milliliter, Mikroliter
BK _{Ca}	large-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel	MLC	myosin light chain
bp	base pairs	MLCK	myosin light chain kinase
BSA	Bovines Serumalbumin	MLCP	myosin light chain phosphatase
Ca ²⁺	Calcium	mm	Millimeter
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Konzentration	mM, µM	Millimolar, Mikromolar
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	mmHG	Millimeter Quecksilber
Ca _v 1.2	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	MYPT1	myosin phosphatase target subunit 1
CCh	Carbachol	Na ⁺	Natrium
CD31	cluster of differentiation 31	NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
cDNS	komplementäre DNS	nm	Nanometer
cGK (I,α,β;II)	cGMP-abhängige Proteinkinase (I,α,β;II), auch PKG	nNOS	neuronale NOS
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat	NO	Stickstoffmonoxid
CNG	Cyclic nucleotide-gated ion channel	NOS	NO-Synthase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	NP	natriuretisches Peptid
ctr	Kontrolle	n.s.	nicht signifikant
DAG	Diacylglycerol	Orai	Calcium release-activated calcium channel protein 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat	p	probability
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	P2Y	purinergic G protein-coupled receptor
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	Phosphate buffered saline
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PCR	polymerase chain reaction
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PDE	Phosphodiesterase
EC	Endothelzelle	PE	Phenylephrin
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration	PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
EDRF	endothelium-derived relaxing factor	PFA	Paraformaldehyd
eNOS	endotheliale NOS	pGC	partikuläre Guanylylzyklase
ER	endoplasmatisches Retikulum	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
FBS	Fetal Bovine Serum	PKA	Proteinkinase A
GPCR	G protein-coupled receptor	PKC	Proteinkinase C
GTP	Guanosintriphosphat	ROI	region of interest
h	Stunde	PLCβ, γ	Phospholipase Cβ, γ
HEK293	Human Embryonic Kidney-Zellen 293	RGS2	Regulator of G-protein signalling 2
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	RNS	Ribonukleinsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	ROCE	receptor-operated Ca ²⁺ entry
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin	rpm	rounds per minute
ICC	Immunocytochemie	RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
iNOS	Induzierbare NOS	SEM	standard error of the mean
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat	SERCA	sacroplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase

SOCE	store-operated Ca ²⁺ entry	UTP	Uridintriphosphat
STIM	Stromal interaction molecule	VOC	voltage-operated Ca ²⁺ channel
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer	VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle
Trp	transient receptor potential cation channel	WHO	World Health Organization
Trpc	Canonical transient receptor potential cation channel	WT	Wildtyp

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Abb. 1). Diese Erkrankungen werden durch verschiedene Risikofaktoren wie einen erhöhten Blutzuckerspiegel, Fettleibigkeit, Hypercholesterinämie und Bluthochdruck begünstigt (Thefeld, 2000). Treten alle vier Faktoren gleichzeitig auf, spricht man auch vom metabolischen Syndrom (NIH, 2011), welches unmittelbar das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen steigert und zu einer erhöhten Mortalität führt (Lakka *et al.*, 2002).

World	Deaths in millions	% of deaths
Ischaemic heart disease	7.25	12.8%
Stroke and other cerebrovascular disease	6.15	10.8%
Lower respiratory infections	3.46	6.1%
Chronic obstructive pulmonary disease	3.28	5.8%
Diarrhoeal diseases	2.46	4.3%
HIV/AIDS	1.78	3.1%
Trachea, bronchus, lung cancers	1.39	2.4%
Tuberculosis	1.34	2.4%
Diabetes mellitus	1.26	2.2%
Road traffic accidents	1.21	2.1%

Abbildung 1: Die 10 häufigsten Todesursachen weltweit (2008). (WHO, 2011)

Der wohl bedeutendste Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist der Bluthochdruck (Hypertonie). Nach Schätzungen der WHO leidet weltweit jeder dritte Erwachsene an erhöhtem Blutdruck (RKI, 2013). Selten erkannt und ohne direkte Beschwerden, ist ein erhöhter Blutdruck die Ursache für knapp mehr als die Hälfte aller Schlaganfälle und Fälle von ischämischen Herzkrankheiten (Lawes *et al.*, 2008). Deshalb wird die Hypertonie auch als schleichender Tod bezeichnet (Strauer, 2004). Allein in Deutschland leiden laut Robert-Koch-Institut ein gutes Viertel der Frauen (27 %) und Männer (26 %) wissentlich an einem erhöhten Blutdruck (RKI, 2012). Die Entstehung eines Bluthochdrucks wird durch zahlreiche Faktoren begünstigt, unter anderem auch durch einen unnatürlichen Lebensstil. Dieser äußert sich in mangelnder Bewegung, Übergewicht, ungesunder Ernährung und erhöhtem Tabak- und Alkoholkonsum. Des Weiteren können hohe Cholesterin- und Blutzuckerwerte zu

einem Bluthochdruck führen. Aber auch Stress und eine genetische Prädisposition sind mögliche Ursachen (UCB-Pharma, 2013).

Da viele der Risikofaktoren auf einen unnatürlichen Lebensstil zurückzuführen sind, lässt sich das Risiko für Bluthochdruck oft durch Änderung der Verhaltensweisen deutlich reduzieren. Die Kooperations-Willigkeit (compliance) der Patienten bei dieser Therapie ist erfahrungsgemäß allerdings leider gering. Daher wird meist eine medikamentöse Therapie des Bluthochdrucks durchgeführt, die das Risiko der Mortalität deutlich vermindert (Abb. 2).

	Systolische-diastolische Hypertonie		Isolierte systolische Hypertonie	
	Risikoreduktion	<i>p</i>	Risikoreduktion	<i>p</i>
Letalität				
Alle Ursachen	-14%	< 0.01	-13%	0.02
Kardiovaskulär	-21%	< 0.001	-18%	0.01
Nicht-Kardiovaskulär	-1%	NS		NS
Schlaganfall	-42%	< 0.001	-30%	<0.001
Herzinfarkt	-14%	< 0.01	-23%	<0.001

Abbildung 2: Signifikante Abnahme der kardiovaskulären Letalität bei Patienten mit systolischer-diastolischer bzw. isolierter systolischer Hypertonie unter antihypertensiver Behandlung. (Hochdruckliga, 2008)

Durch fortlaufende Untersuchungen und Aufklärungen zellulärer und molekularer Mechanismen der Hypertonie können neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit neuen molekularen Mechanismen, die an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sein könnten.

1.1 Blutdruckregulation

Der Blutdruck wird durch die Herzfrequenz, das Herzschlagvolumen und den peripheren Widerstand festgelegt (Seibt *et al.*, 1998). Alle drei Parameter werden durch Adrenalin über das sympathische Nervensystem gesteigert, um den Blutdruck an physiologische Belastungen, wie z.B. die fight-or-flight Situation, anzupassen. Die Herz-Parameter werden dabei über die β -adrenerge Signalkaskade, der periphere Widerstand über die α -adrenerge Signalkaskade in der Gefäßmuskulatur gesteigert. Die Hauptwirkung der α -adrenergen Kaskade erfolgt in den Arteriolen, die auch als Widerstandsgefäße bezeichnet werden. Der periphere Widerstand wird durch den

Tonus der glatten Muskulatur in diesen Gefäßen bestimmt. Der Tonus wiederum wird durch eine Vielzahl von Hormonen/Signalkaskaden, welche entweder zur Kontraktion (α 1-adrenerge Agonisten, Angiotensin II, Endothelin) oder zur Relaxation (NO/cGMP, β 2-adrenerge Agonisten, Prostaglandine) der Gefäßmuskulatur führen, reguliert.

1.2 Kontraktion der glatten Muskulatur

Calcium (Ca^{2+}) spielt bei der Regulation des Tonus der Muskulatur eine zentrale Rolle (Berridge *et al.*, 2000). Der kontraktile Tonus der glatten Muskulatur ist in der Regel direkt proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Dieser Anstieg kann auf zweifache Weise erfolgen: (1.) Ca^{2+} wird aus intrazellulären Speichern freigesetzt (endoplasmatisches Retikulum, ER) oder (2.) extrazelluläres Ca^{2+} strömt über spannungsunabhängige und -abhängige Calcium-Kanäle in die Zelle ein. An diesen Prozessen sind unterschiedliche zelluläre Signalkaskaden beteiligt.

Agonisten wie Phenylephrin (PE) oder Angiotensin II (Ang II) induzieren die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung durch Bindung an ihren jeweiligen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). Im Falle des PE handelt es sich um einen α 1-adrenergen Rezeptor (Chen *et al.*, 2005), im Falle des Ang II um einen Angiotensin II Rezeptor Typ I (Ang II RI) (Crowley *et al.*, 2004). Durch Agonisten-Bindung kommt es zur Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen, welche die Phospholipase C β (PLC β) ansteuern. Die aktivierte PLC β katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ bindet am IP $_3$ -Rezeptor Typ 1 (IP $_3$ RI) des ER. Die Aktivierung dieses Ca^{2+} -Kanals führt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER ins Zytosol (Abb. 3).

Das gleichzeitig mit IP $_3$ gebildete DAG aktiviert neben der Ca^{2+} -unabhängigen Proteinkinase C-Signalkaskade (Lee *et al.*, 1994) auch direkt Trpc3- und Trpc6-Kanäle (transient receptor potential cation channels) (Hofmann *et al.*, 1999b), wodurch es zu einem Rezeptor-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom (receptor-operated Ca^{2+} entry, ROCE) ins Zytosol kommt (Abb. 3) (Dietrich *et al.*, 2010). Eine weitere spannungsunabhängige Möglichkeit des Einstroms extrazellulären Calciums ist der so genannte Speicher-aktivierte Ca^{2+} -Einstrom (store-operated Ca^{2+} entry; SOCE) (Abb. 3) (Dietrich *et al.*, 2005a). Hierbei sind unter anderem die Trpc-Kanäle 3, 6 und 7 beteiligt, welche durch die IP $_3$ -induzierte Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -

Speicher aktiviert werden und funktionell mit anderen Komponenten des SOCE (STIM, Orai1) interagieren können (Liao *et al.*, 2009).

Eine letzte Möglichkeit zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, ist der spannungsabhängige Einstrom durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle. Hierbei spielt vor allem der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal eine wichtige Rolle (Hofmann *et al.*, 1999a; Moosmang *et al.*, 2003).

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (myosin light chain kinase, MLCK), welche die Myosin-Leicht-Kette (myosin light chain, MLC) phosphoryliert. Dadurch kommt es zur Aktin-Myosin-Brückenbildung und letztlich zur Kontraktion der glatten Muskulatur (Hofmann *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2006). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die zellulären Abläufe während der Kontraktion der glatten Muskulatur.

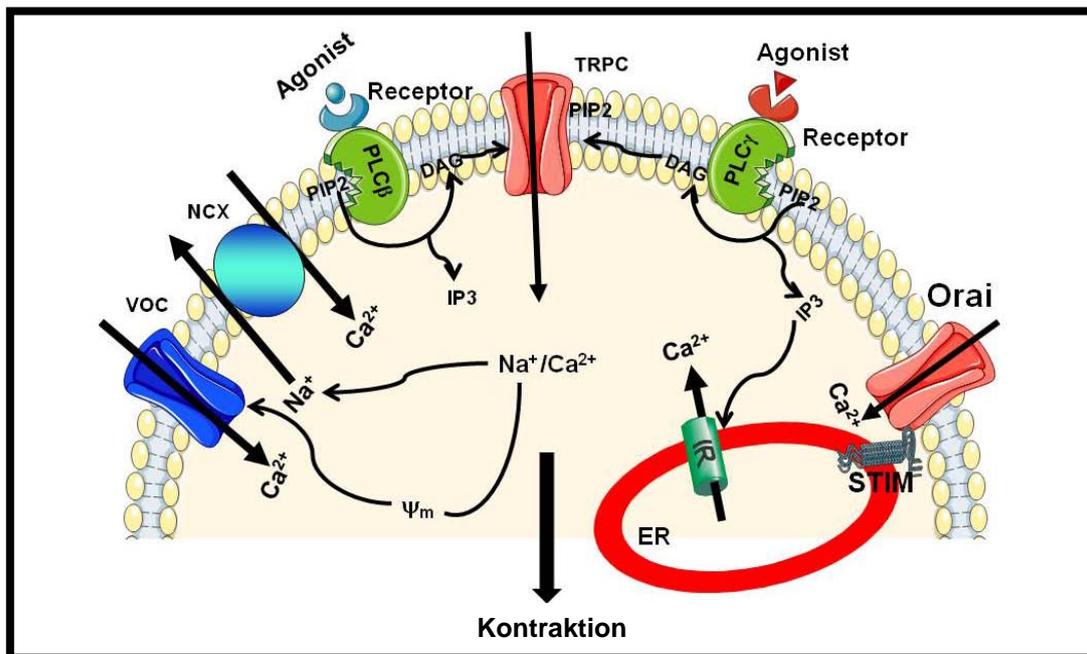


Abbildung 3: Rezeptor- und Speicher-aktivierter Ca^{2+} -Einstrom.

Agonisten wie PE oder Ang II führen durch Bindung am jeweiligen GPCR zur Aktivierung der PLCβ oder PLCγ und somit zur Bildung von IP₃ und DAG. IP₃ führt zum Ca^{2+} -Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und somit letztlich zum Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) über STIM und Orai ins Zytosol. DAG hingegen aktiviert direkt den Rezeptor-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom (receptor-operated Ca^{2+} entry, ROCE) über TrpC-Kanäle, wodurch es zum Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} und Na^+ kommt. Einströmendes Na^+ führt sowohl zur Depolarisation der Zelle und somit zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (voltage-operated Ca^{2+} channel, VOC), als auch zur Aktivierung von $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern (NCX).

Der erhöhte intrazelluläre Calcium-Spiegel führt letztlich zur Kontraktion der glatten Muskulatur. (modifiziert nach Trebak, 2012)

1.3 Trp-Kanäle der *klassischen Unterfamilie (Trpc)*

Untersuchungen der Phototransduktion in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* führten zur Identifizierung und Charakterisierung der Trp (transient receptor potential)-Kanäle. Cosens *et al.* (1969) beschrieben die ursprüngliche *Drosophila* Trp Mutante als "a mutant strain of *D. melanogaster* which, though behaving phototactically positive in a T-maze under low ambient light, is visually impaired and behaves as though blind". Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Mutation ein Defekt in einem Ca^{2+} -permeablen Kanal zugrunde liegt, welcher als Trp-Kanal bezeichnet wurde (Hardie *et al.*, 1992). Grundsätzlich lassen sich die Trp-Kanäle in sieben Unterfamilien gliedern: TrpC, TrpV, TrpM, TrpN, TrpA, TrpP und TrpML (Venkatachalam *et al.*, 2007). Die Benennung der einzelnen Unterfamilien bezieht sich auf die Bezeichnung des Mitgliedes der jeweiligen Unterfamilie, welches als erstes entdeckt wurde (Montell *et al.*, 2002). Generell bestehen Trp-Kanäle aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) mit einem intrazellulären Carboxy- und Aminoterminus (Clapham *et al.*, 2001).

Kanäle der Trpc-Unterfamilie wurden in der glatten Gefäßmuskulatur beschrieben und sollen durch die Kontrolle des peripheren Widerstands an der Blutdruckregulation beteiligt sein (Abramowitz *et al.*, 2009; Dietrich *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2008). Diese Unterfamilie wird als „klassische“ (engl. classical, canonical; C) Unterfamilie bezeichnet, da die Kanäle dieser Unterfamilie die größte Homologie zu den an der Phototransduktion in *Drosophila melanogaster* beteiligten Trp-Kanälen aufweisen. Innerhalb der Trpc-Unterfamilie gibt es sieben Untergruppen (Trpc1-Trpc7). Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau der Trpc-Kanäle. Neben den sechs Transmembrandomänen (S1-S6), welche allen Unterfamilien gemein sind, findet sich eine konservierte Trp-Domäne, vier N-terminale Ankyrin-Wiederholungen und eine putative Porenregion zwischen S5 und S6. Des Weiteren sind Trpc3-Kanäle einfach und Trpc6-Kanäle doppelt glykosyliert (Dietrich *et al.*, 2010). Trpc-Kanäle können als Homo- und Heterotetramere auftreten (Watanabe *et al.*, 2008), so zum Beispiel Trpc4/5 oder Trpc3/6/7 (Hofmann *et al.*, 2002).

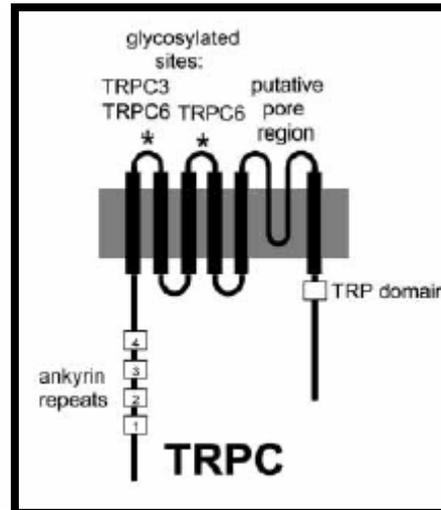


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Trpc-Kanal-Unterfamilie.

Trpc-Kanäle bestehen aus vier N-terminalen Ankyrin-Wiederholungen, sechs Transmembrandomänen, einer Porenregion und einer konservierten Trp-Domäne. Trpc3-Kanäle besitzen eine, Trpc6-Kanäle zwei Glykosylierungsstellen (nach Dietrich *et al.*, 2010).

Trpc-Kanäle werden in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, so auch in Endothelzellen (endothelial cell; EC) (Senadheera *et al.*, 2012; Weissmann *et al.*, 2012) und glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cell; VSMC) (Dietrich *et al.*, 2010). Vor allem in der Gefäßmuskulatur nehmen die Trpc1-, Trpc3- und Trpc6-Kanäle eine zentrale Rolle ein (Abramowitz *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2010). So konnte gezeigt werden, dass eine $\alpha 1$ -adrenerg-induzierte Kontraktion durch Unterdrückung der Trpc6-Expression mittels Antisense-Oligonukleotide in Myozyten der Pfortader blockiert werden konnte (Inoue *et al.*, 2001). Dies verdeutlicht, dass für die Kontraktion der Muskulatur der Trpc6-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE, SOCE) essentiell ist (Dietrich *et al.*, 2010). Ausgehend von diesem Befund generierten Dietrich *et al.* (2005b) eine Trpc6-Knockoutmaus und stellten zu ihrer Verwunderung einen erhöhten Blutdruck fest. Erklärt wurde diese Beobachtung mit einem Kompensationsmechanismus, bei dem Trpc3-Kanäle die Aufgabe der Trpc6-Kanäle übernehmen. Überdies hinaus beobachteten sie, dass Glattmuskelzellen dieser Knockoutmäuse höhere Membranpotentiale und verstärkte Agonisten-induzierte Ca^{2+} -Einströme aufwiesen.

Auch sind Trpc6-Kanäle an der Regulation des myogenen Tonus der glatten Gefäßmuskulatur kleiner Widerstandsgefäße beteiligt (Voets *et al.*, 2009). Ein Anstieg des Drucks in diesen Gefäßen führt zur Erhöhung des myogenen Tonus.

Dieses Phänomen wird auch als Bayliss-Effekt bezeichnet (Bayliss, 1902). Trpc6-KO-Mäuse zeigten diesen Effekt nur stark vermindert (Welsh *et al.*, 2002).

Neuere Studien weisen darauf hin, dass Trpc-Kanäle in glatten Muskelzellen durch die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) gehemmt werden (Chen *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2008). Die cGKI ist ein Schlüsselenzym für die Einleitung der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Im Folgenden soll zunächst auf die cGKI-vermittelte Relaxation der Muskulatur eingegangen werden, ehe unter 1.5 der eben erwähnte funktionelle Zusammenhang näher betrachtet wird.

1.4 Relaxation der glatten Muskulatur

Der kontraktile Status der glatten Muskulatur wird durch das Wechselspiel zwischen kontraktionsfördernden und kontraktionshemmenden Signalkaskaden bestimmt. Die kontraktionsfördernden Kaskaden werden meist durch intrazelluläres Ca^{2+} ausgelöst, während die kontraktionshemmenden, d.h. muskelerschlaffenden (-relaxierenden) Kaskaden auf verschiedene zelluläre Mechanismen zurückgreifen.

Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kann auf vierfache Weise erfolgen: (1.) durch aktive Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, (2.) durch Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung/des Ca^{2+} -Einstroms, (3.) durch Desensitisierung des kontraktile Apparates und (4.) durch die Öffnung von Kalium-Kanälen, was zu einer Hyperpolarisation und nachfolgend zur Blockierung des spannungsvermittelten Ca^{2+} -Einstroms führt (Knox *et al.*, 1995).

Diese Mechanismen gibt es sowohl bei der β -adrenerg-, als auch bei der NO-induzierten Relaxation (Torphy *et al.*, 1994).

1.4.1 NO/cGMP/cGK Signalweg

Der gasförmige Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wesentliches Signalmolekül im Körper von Säugetieren. Mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden in Sauerstoff-haltigen wässrigen Lösungen (Ignarro *et al.*, 1993), kommt NO besonders bei schnellen und räumlich begrenzten Signalweiterleitungen zum Einsatz (Cohen *et al.*, 1997). Dabei sind die Regulation des Blutdrucks, der Hämostase und der kardialen und vaskulären Umgestaltung (Feil *et al.*, 2003; Pfeifer *et al.*, 1999), die Inhibierung der Blutplättchenfunktion und der Proliferation glattmuskulärer Zellen

(Lloyd-Jones *et al.*, 1996), sowie die cytotoxischen Eigenschaften bei der Abwehr von Bakterien durch Makrophagen zu nennen (Wang *et al.*, 1994). Die Entdeckung dieses Signalmoleküls führte 1998 zur Verleihung des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin an die Herren Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad „for their discoveries concerning nitric oxide as a signalling molecule in the cardiovascular system“ (Nobelprize.org, 2013).

Generell katalysieren NO-Synthasen (NOS) die Bildung von NO aus L-Arginin (Lloyd-Jones *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1988). Dabei gilt es drei Formen der NOS zu unterscheiden: (1.) endotheliale NOS (eNOS), (2.) induzierbare NOS (iNOS) und (3.) neuronale NOS (nNOS) (Daff, 2010).

Die Entdeckung des endothelium-derived relaxing factor (EDRF), welcher später als NO identifiziert wurde (Fleming *et al.*, 1999), verdeutlicht die Notwendigkeit der eNOS für die Relaxation der glatten Muskulatur. Nach Bindung von Acetylcholin oder eines anderen muskarinergen Agonisten an den entsprechenden Rezeptor der Endothelzelle kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom (Vanhoutte, 2004). Der intrazellulär ansteigende Ca^{2+} -Spiegel führt zur Aktivierung der eNOS und nachfolgender NO Produktion (Dudzinski *et al.*, 2006).

Das gebildete NO kann frei diffundieren und sehr leicht über die Zellmembran in benachbarte Zellen gelangen (Abb. 7). In Zielzellen kann NO über mehrere Signalkaskaden wirken. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen zwei Möglichkeiten: (1.) direkte Effekte von NO, die zu einer Änderung der Aktivität von Zielproteinen führen (z.B. Nitrosylierung von Cysteinen) und (2.) die NO-abhängige Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC) (Hanafy *et al.*, 2001; Schlossmann *et al.*, 2003).

Die sGC katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) (Friebe *et al.*, 2003). Phosphodiesterasen (PDEs), besonders die PDE5, sind in der Lage intrazelluläres cGMP zu hydrolysieren und somit einem cGMP-Anstieg entgegenzuwirken (Rybalkin *et al.*, 2003; Sonnenburg *et al.*, 1994). Neben der Aktivierung der sGC durch NO können auch Hormon-aktivierte GC zur Bildung von intrazellulärem cGMP führen. Ein Beispiel ist der Rezeptor für ANP, der eine membran-gebundene GC darstellt (Hamad *et al.*, 1997) (Abb. 5).

cGMP, als sekundärer Botenstoff, hat eine Vielzahl von Zielproteinen in der Zelle. So reguliert es die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Adenosin-3',5'-

monophosphat (cAMP), indem es cAMP-spezifische PDEs aktiviert oder hemmt (Sonnenburg *et al.*, 1994). Des Weiteren ist cGMP in der Lage zyklische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG) zu öffnen, wodurch Ca^{2+} in die Zelle einströmen kann (Biel *et al.*, 1998). Überdies hinaus werden auch cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) durch cGMP aktiviert (Pfeifer *et al.*, 1999; Ruth, 1999). Abbildung 5 fasst die Aktivierung des NO/cGMP/cGK Signalweges zusammen.

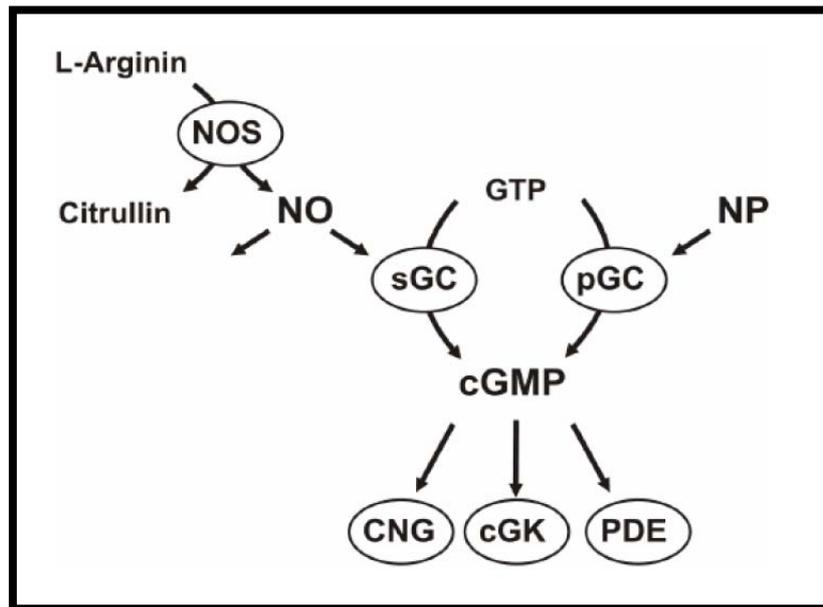


Abbildung 5: Der NO/cGMP/cGK Signalweg.

NO-Synthasen (NOS) katalysieren die Oxidation von L-Arginin zu NO. Das gebildete NO vermittelt sowohl cGMP-unabhängige Effekte, als auch die Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC), welche die Bildung von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) katalysiert. cGMP kann auch über die partikuläre GC (pGC), welche durch natriuretische Peptide (NP) aktiviert wird, gebildet werden. Zielproteine von cGMP sind zyklische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG), Phosphodiesterasen (PDE) und cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) (nach Lukowski, 2006).

Die cGK ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und kommt in Säugetieren in zwei Formen vor: (1.) die zytosolische cGKI (75 kDa) und (2.) die membrangebundene cGKII (85 kDa). Beide Formen bilden Homodimere mit identischen Untereinheiten aus. Jede Untereinheit besteht aus drei funktionellen Domänen: (1.) einer regulatorischen Domäne, welche zwei nicht-identische cGMP-Bindungsstellen enthält, (2.) einer Kinasedomäne, welche für die Phosphorylierung von Zielproteinen verantwortlich ist und (3.) einer N-terminalen Domäne, welche unter anderem die

Homodimerisierung und die Interaktion mit Partnerproteinen vermittelt (Hofmann *et al.*, 2006).

Die cGKI ist vor allem in glatten Muskelzellen, Thrombozyten, im Herzen und im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden, die cGKI β überwiegend in Nierenzellen, der Leber und Chondrozyten (Feil *et al.*, 2003; Hofmann, 2005).

Die cGKI ist im kardiovaskulären System an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Es wurde anhand von cGKI-KO-Mäusen gezeigt, dass die NO/cGMP-induzierte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch die cGKI vermittelt wird, da NO in cGKI-KO-Mäuse keine Wirkung zeigte (Koeppen *et al.*, 2004; Pfeifer *et al.*, 1998).

1.4.2 cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur

Zwei Isoformen der cGKI sind bekannt: cGKI α und cGKI β . Beide sind das Produkt eines Gens und unterscheiden sich N-terminal in den ersten 100 Aminosäuren, in der zur Aktivierung notwendigen cGMP-Konzentration (Pfeifer *et al.*, 1999), in der Verteilung im Gewebe und in der Substratspezifität (Feil *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2000). Zur Aktivierung der cGKI α -Isoform *in vitro* ist etwa 10 mal weniger cGMP notwendig als zur Aktivierung der cGKI β -Isoform (Ruth *et al.*, 1991), *in vivo* ist die zur Aktivierung der beiden Isoformen erforderliche cGMP-Konzentration gleich (Weber *et al.*, 2007).

In der glatten Gefäßmuskelzelle sind beide Isoformen der cGKI exprimiert (Geiselhoringer *et al.*, 2004; Keilbach *et al.*, 1992). Diese sind in der Lage sowohl der Hormonrezeptor-induzierten, als auch der Depolarisations-induzierten Kontraktion entgegen zu wirken. So aktiviert die cGKI α -Isoform das Protein RGS2 (regulator of G protein signalling 2), welches den G $_q$ -gekoppelten Rezeptor inhibiert und damit eine Signalweiterleitung verhindert (Tang *et al.*, 2003). Ein weiteres Zielprotein dieser Isoform ist MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1). Durch Bindung dieses Proteins kommt es zur Aktivierung der MLCP (myosin light chain phosphatase), welche die phosphorylierte MLC dephosphoryliert und somit die Relaxation induziert (Surks *et al.*, 1999). Ein Interaktionspartner der cGKI β -Isoform ist IRAG (inositol 1,4,5-triphosphate-associated cGMP kinase substrate). Durch Bindung dieses Moleküls an den IP $_3$ RI wird die IP $_3$ -induzierte Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verhindert (Schlossmann *et al.*, 2000). Auch BK $_{Ca}$ -Kanäle (large-conductance Ca $^{2+}$ -activated K $^+$ channel) können durch die cGKI aktiviert werden. Dabei kommt es zur

Hyperpolarisation der Membran, wodurch sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle schließen (Sausbier *et al.*, 2000). Des Weiteren erhöht die cGKI durch Phosphorylierung von SERCA (sacroplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)/Phospholamban die Ca^{2+} -Aufnahme in das ER (Koller *et al.*, 2003; Lalli *et al.*, 1999). Alle Relaxationsmechanismen können in einem Zelltyp vorkommen, dabei aber unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So zeigte die cGMP/cGKI-vermittelte Relaxation eine Ca^{2+} -Abhängigkeit im glatten Muskel vom Colon, aber nicht im Jejunum (Frei *et al.*, 2009).

Abbildung 6 fasst die verschiedenen Relaxationsmechanismen der cGKI zusammen. Wie bereits unter 1.3 erwähnt, zeigen neuere Studien, dass die cGKI auch die Aktivität von Trp-Kanälen beeinflussen kann. Darauf soll im folgenden Punkt genauer eingegangen werden.

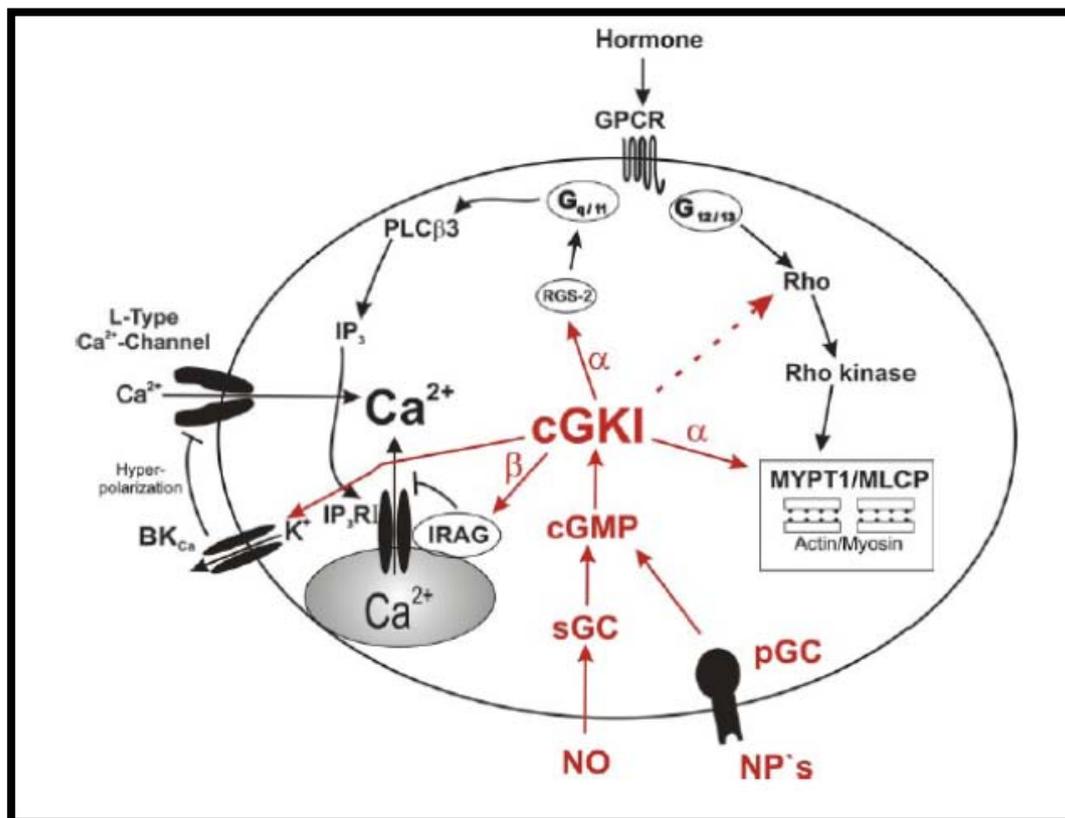


Abbildung 6: Zelluläre Abläufe der Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur.

Die schwarzen Pfeile zeigen die Signalwege der Kontraktion, die roten die Signalwege der Relaxation der glatten Muskelzellen an. Für weitere Erklärungen siehe Text. (nach Hofmann *et al.*, 2006)

1.5 Funktioneller Zusammenhang zwischen Trpc-Kanälen und dem NO/cGMP/cGKI Signalweg

Neuere Studien liefern Hinweise darauf, dass offenbar ein funktioneller Zusammenhang zwischen Trpc-Kanälen, besonders Trpc1, Trpc3 und Trpc6, und dem NO/cGMP/cGKI Signalweg besteht. So wurde in mit Trpc3-transfizierten HEK293-Zellen gezeigt, dass die cGKI Trpc3-Kanäle direkt (Kwan *et al.*, 2004) oder indirekt über die Proteinkinase C (PKC) (Kwan *et al.*, 2006) durch Phosphorylierung der Positionen T11 und S263 inhibiert. Auch Trpc6-Kanäle werden in kultivierten Glattmuskelzellen durch den NO/cGMP/cGKI Signalweg negativ reguliert (Takahashi *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2009) verwendeten frisch isolierte glatte Muskelzellen aus der *Arteria carotis* der Ratte und zeigten einen funktionellen Zusammenhang zwischen der cGKI (Proteinkinase G, PKG) und dem Heteromerkomplex Trpc1/Trpc3 (Abb. 7). Allerdings ist unklar, inwieweit diese Effekte physiologisch für die Blutdruckregulation im Gesamttier relevant sind. Daher sind weitere Untersuchungen (*in vivo*) notwendig, um diesen funktionellen Zusammenhang in glatten Gefäßmuskelzellen genauer zu analysieren.

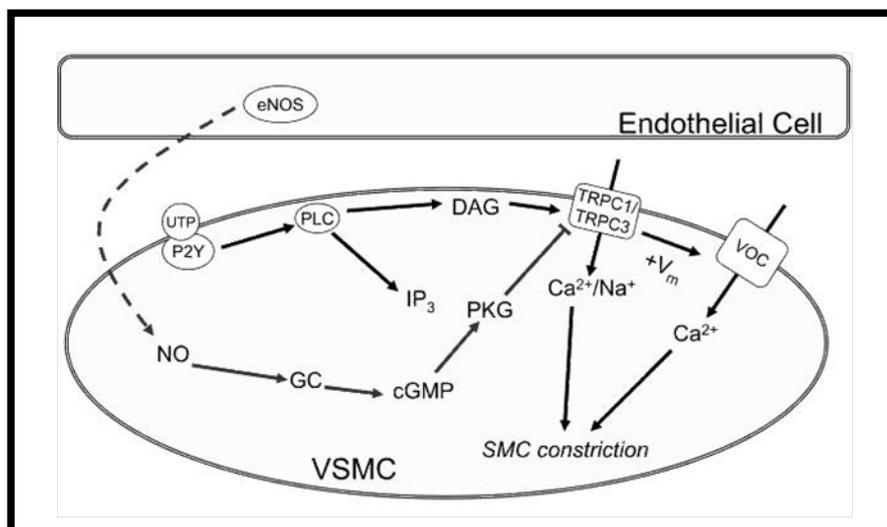


Abbildung 7: Inhibition des Trpc1/Trpc3-Heteromers durch cGK.

Nach Stimulation des GPCR (P2Y) kommt es unter anderem zur Bildung von DAG, welches den Heteromerkomplex Trpc1/Trpc3 stimuliert und somit einen Ca^{2+} - und Na^{+} -Einstrom bewirkt. Einströmendes Na^{+} führt zur Depolarisation der VSMC und zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (VOC, voltage-operated channels). Die ansteigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt letztlich zur Kontraktion der Zelle. Endothelial gebildetes NO diffundiert in die VSMC und induziert die Bildung von cGMP, welches die Proteinkinase G (PKG, cGKI) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert den Heteromerkomplex und inhibiert diesen somit. (nach Chen *et al.*, 2009)

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen Trpc-Kanälen, vor allem Trpc3 und Trpc6, und dem cGMP/cGKI Signalweg in der glatten Muskulatur und im Endothel zu analysieren. Hierzu wurden Trpc3-KO- und Trpc6-KO-, Trpc3/Trpc6-KO- und Trpc1/Trpc3/Trpc6-KO-Mäuse verwendet. Die Doppel-KO-Mäuse dienen der Untersuchung der Hypothese, dass Trpc3-Kanäle in Trpc6-KO-Mäusen überexprimiert werden (Dietrich *et al.*, 2005b), die Dreifach-KO-Mäuse als zusätzliche Kontrolle.

Mittels Aortenkraftmessung bzw. Hinterbein-Perfusion wurde der Effekt von PE in den verschiedenen Mauslinien untersucht. Der cGMP/cGKI Signalweg wurde durch das membrangängige cGMP-Analogon 8-Br-cGMP aktiviert.

Zusätzlich wurde die Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten Glattmuskelzellen und Endothelzellen aus der Aorta der jeweiligen KO-Mäuse und Kontrolltiere bzw. von WT-Mäusen untersucht. Hierbei kamen immunocytochemische Experimente bzw. RT-PCR-Analysen zum Einsatz.

Überdies hinaus wurde der Einfluss des cGMP/cGKI-Signalwegs auf Agonisten-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen in frisch isolierten EC und VSMC aus der Aorta von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs gemessen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Sigma-Aldrich, Carl Roth, Sarstedt, Biochrom oder TPP AG bezogen.

Beschreibung	Hersteller
4-Br-A23187	Enzo Life Sciences
5/0 Seide	Resorba
8-Br-cGMP	Biolog
12-Lochplatte	Corning Incorporated
Agarose	Biozym
Carbogen	Sauerstoffwerk Friedrichshafen
Collagenase Typ II	Worthington
DMEM (high glucose)	PAA Laboratories
DNase I, Amplification Grade	Invitrogen
DNS-Standard (1 kb ladder)	Invitrogen
Einbettmedium (Large Volume Vision Mount)	Thermo Scientific
Foetales Kälberserum (FBS)	Gibco
Fura-2	Invitrogen
Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit	Invitrogen
gestopfte Spitzen (20, 200, 1000 µl)	Sorenson BioScience
Glasplättchen (20 mm. 22 mm)	Menzel Gläser
GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit	Promega
Kanülen (Gr. 16)	Braun
OneStep RT-PCR kit	Qiagen
PCR-Tubes	Biozym
PeqGOLD RNApure	Peqlab
Petrischale (Collagen I-beschichtet, 35 mm)	BD
Petrischale (Gelatine-beschichtet, 100 mm)	BD
Proteinase K	Roche Applied Science
Reagiergefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Rundbodenröhrchen (14 ml)	BD
Spritzen (1 ml, 10 ml)	Braun bzw. BD
Thermopapier (K65HM-CE/KP65HM-CE)	Mitsubishi

2.2 Geräte

Beschreibung	Hersteller
4 °C Kühlschrank	Liebherr
-20 °C Tiefkühler	AEG
-80 °C Tiefkühler HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific
Akku-Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA Biosciences
Analysenwaage Sartorius CP225D	Data Weighing Systems
Autoklav (Systec 3850 ELVC)	tuttnauer
Brutschrank Binder CB53	Binder
Druckmesser	Hugo Sachs Elektronik (HSE)
Elektrophoresekammer (Maxi horizontal)	Neolab
Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 35M	Carl Zeiss
Geldokumentation (Dark Hood DH-40/50)	biostep
Heizblock (Thermostat 5320)	Eppendorf
Heiz-Thermomixer HLC HTMR-133-2	neoLab
Homogenisierungssystem Miccra D-8	ART Prozess- & Labortechnik
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Carl Zeiss
Laser Scanning Microscope LSM510	Carl Zeiss
Leistungs- und Steuerungsgerät (ICU)	TILL Photonics
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss
Lichtmikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss
Magnetrührer (Combimag RCH/RCT)	IKA Labortechnik
MCCD Kamera (Qimaging RETIGA-2000RV)	TILL Photonics
Membran-Dosier-Pumpe Simdos 10	KNF Lab
Messkammern (Metall)	Werkstatt IPT, TU München
Mikrowelle	Privileg
Minipumpe Laboport	KNF Lab
Monochromator (Polychrome V)	TILL Photonics
Multi Myograph 610M	Danish Myo Technology
NanoDrop 2000	Peqlab
Peristaltikpumpe minipuls2	Gilson
pH-Meter (766 Calimatic)	Knick
Pipettierhilfe Pipetman (20, 200, 1000)	Gilson
Präparationsbesteck (Pinzette, Präzisionsschere)	World Precision Instruments
Reinstwasseranlage (Gen Pure Pro UV/UF)	Thermo Scientific
Schüttler (KS250 basic)	IKA Labortechnik
Spannungsquelle Standard Powerpack P25	Biometra
Temperierte feuchte Kammer Typ 834/1	HSE
Thermocycler peqstar	Peqlab

Thermocycler UNO Thermoblock	Biometra
Thermomixer Compact	Eppendorf
Thermoprinter (P93D)	Mitsubishi
Vortex-Mixer Reax 2000	Heidolph
Waage Explorer Pro EP612CM	Ohaus
Wasserbad ministat	Huber uk
Zentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf
SIGMA Compact Centrifuge 2-16	SciQuip
Tischzentrifuge (Micro Centrifuge)	Roth

2.3 Versuchstierhaltung

Alle Versuchstiere wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen gezüchtet und versorgt. Die Tiere wurden bei einem 12h/12h Hell-/Dunkelzyklus in Typ II oder Typ III (5 bzw. 10 adulte Tiere) Makrolon Käfigen gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Für die Zucht wurden weibliche Tiere im Alter von 6-30 Wochen und männliche Tiere mit einem Mindestalter von 8 Wochen verwendet. Zur Genotypisierung der Jungtiere wurde 7-9 Tage nach der Geburt Schwanzgewebe für eine PCR-Analyse (2.7.5) entnommen. Im Alter von vier Wochen wurden die Nachkommen von ihren Müttern separiert und entsprechend ihres Geschlechtes gehalten.

2.4 Versuchstiere

Folgende Mauslinien wurden für die vorliegende Arbeit verwendet: Wildtyp (WT, +/+)-Mäuse, konventionelle cGKI-Knockoutmäuse (cGKI-KO, cGKI^{-/-}) (Genotyp: cGKI^{L1/L1}) (Pfeifer *et al.*, 1998), glattmuskel-spezifische cGKI-Knockoutmäuse (sm-cGKI-KO, sm-cGKI^{-/-}) (Genotyp: SM22α-Cre^{tg/+} cGKI^{L-/L2}) und ihre Kontrollen (sm-cGKI^{+/-}) (Genotyp: SM22α-Cre^{tg/+} cGKI^{+/L2}) (Lukowski *et al.*, 2008), Trpc6-Knockoutmäuse (Trpc6-KO) (Genotyp: Trpc6^{-/-}) und ihre Kontrollen (Genotyp: Trpc6^{+/-}) (Dietrich *et al.*, 2005b), Trpc3-Knockoutmäuse (Trpc3-KO) (Genotyp: TRPC3^{-/-}) und ihre Kontrollen (Genotyp: TRPC3^{+/-}) (Hartmann *et al.*, 2008), Trpc3/Trpc6 Doppel-Knockoutmäuse (Trpc3/6-KO) (Genotyp: Trpc3^{-/-}/6^{-/-}) und ihre Kontrollen (Genotyp: Trpc3^{+/-}/6^{+/-}), und Trpc1/Trpc3/Trpc6 Dreifach-Knockoutmäuse (Trpc1/3/6-KO) (Genotyp: Trpc1^{-/-}/3^{-/-}/6^{-/-})

und ihre Kontrollen (Genotyp: $Trpc1^{+/-}/3^{+/-}/6^{+/-}$) (Liu *et al.*, 2007). Der genetische Hintergrund der Mäuse war Sv129 oder Bl6. Da die heterozygoten Kontrollen (Ctr) der verwendeten Mauslinien keine Unterschiede in den untersuchten Effekten zu den WT-Mäusen aufwiesen, wurden alle WT- und Kontrollmäuse für die statistische Auswertung zusammengefasst. Abbildung 8 zeigt dies exemplarisch für die PE-induzierte Kontraktion in Aortenringen mit unbeschädigtem Endothel von WT-Mäusen und den heterozygoten Kontrolltieren. Versuchstiere beider Geschlechter waren zum Zeitpunkt der Experimente mindestens 8 Wochen alt.

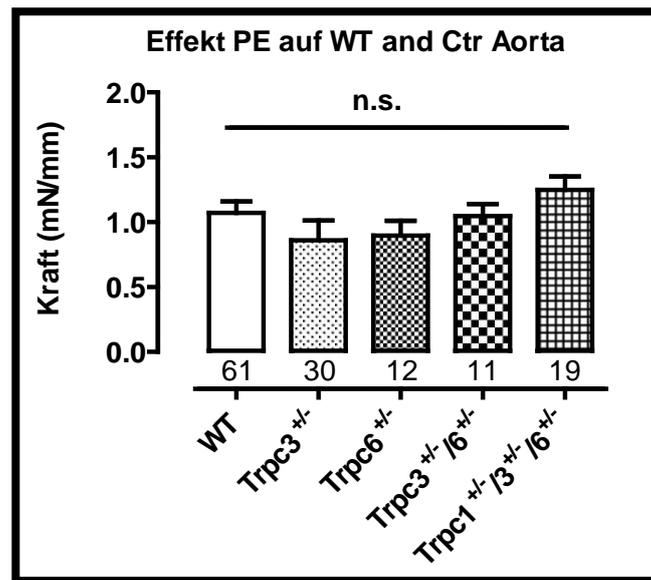


Abbildung 8: PE-induzierte Kontraktion in Aortenringen von WT-Mäusen und heterozygoten Kontrolltieren mit intaktem Endothel.

Die Säulen zeigen die Mittelwerte \pm SEM. Die Zahlen geben die Anzahl an Experimenten an (Anzahl Versuchstiere: Anzahl Experimente / 4). Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) ausgewertet. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den WT-Mäusen und den heterozygoten Kontrolltieren nach PE-Stimulation. n.s., nicht signifikant

2.5 Präparation der murinen *Aorta abdominalis* und *Aorta thoracalis*

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde entweder das Gefäßsystem der Hinterbeine oder die thorakale Aorta der Maus benötigt.

Für die Perfusion der Hinterbeine (2.6.1) wurde nach kranialer Dislokation die Bauchhöhle des Tieres geöffnet und die *Aorta abdominalis* unter dem Lichtmikroskop freipräpariert. Dabei wurde zusätzlich die *Vena cava inferior* längs aufgeschnitten, um einen möglichen Blutstau zu vermeiden. Nach Überführung der Maus in die feuchte Kammer der Perfusionsanlage, wurde eine Metallkanüle (Durchmesser: 0,8

mm, ohne Korb, schräger Schliff) in die *A. abdominalis* eingeführt und mit 5/0 Seide fixiert.

Die *A. thoracalis* wurde sowohl für die Kraftmessung am glatten Muskel (2.6.2), als auch für die molekularbiologischen (2.7.2) und zellbiologischen (2.8) Experimente verwendet. Nach bereits erwähnter kranialer Dislokation wurde der Brustkorb des Tieres geöffnet, die thorakale Aorta freipräpariert und unter Vermeidung von Zug- und Druckkräften in Carbogen-begaste CO₂-Tyrode (Pufferlösung, 37 °C) (Tab. 1) (2.6.2; 2.7.2) oder in Kulturmedium (DMEM, 37 °C) (2.8) überführt. Anschließend wurde diese unter dem Lichtmikroskop mit der jeweiligen Lösung vorsichtig, um eine Beschädigung des Endothels zu vermeiden, gespült (Spritze und Kanüle) und von umliegendem Fettgewebe mittels Pinzette und Präzisionsschere befreit, ehe sie für die folgenden Versuche verwendet wurde.

Für die Isolierung der Gesamt-RNS (2.7.2) wurden die gesäuberten Aorten umgehend im Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff transferiert und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80° C gelagert. Bei einem Teil der Aorten wurde vorher das Endothel entfernt. Dazu wurden die Aorten der Länge nach aufgeschnitten und das Endothel mit einem Skalpell vorsichtig abgeschabt.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [g/l]
NaCl	58,44	8
KCl	74,56	0,4
CaCl ₂	147,02	0,265
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,30	0,2
NaHCO ₃	84,01	1
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,058
D(+)-Glucose	180,16	1

Tabelle 1: Pufferlösung für Hinterbein-Perfusion (CO₂-Tyrode).

2.6 Physiologische Methoden

2.6.1 Hinterbein-Perfusion

Mit Hilfe des Hinterbein-Perfusionsmodells lässt sich der periphere Gefäßwiderstand in den Hinterbeinen der Maus messen. Nachstehend wird diese Methode beschrieben.

2.6.1.1 Apparativer Aufbau und Durchführung

Abbildung 9 zeigt den apparativen Aufbau der Anlage für die Hinterbein-Perfusion. Die Anlage besteht aus einer Pumpe, einem Wasserbad, einer temperierten, feuchten Kammer, einem Druckmesser und einem Computer. Die Pumpe war über ein Schlauchsystem mit dem Gefäßsystem der Hinterbeine verbunden und pumpte Carbogen-begaste CO₂-Tyrode (Pufferlösung, 37 °C) (Tab. 1), mit oder ohne vasoaktive Pharmaka, durch das System. Des Weiteren war in diesem Schlauchsystem ein Drucksensor über eine T-Verbindung angeschlossen, welcher mit dem Druckmesser/Computer verbunden war. Zur digitalen Erfassung des mittleren Drucks wurde die Software *HSE-BDAS W (Version 1.1.1.202)* verwendet.

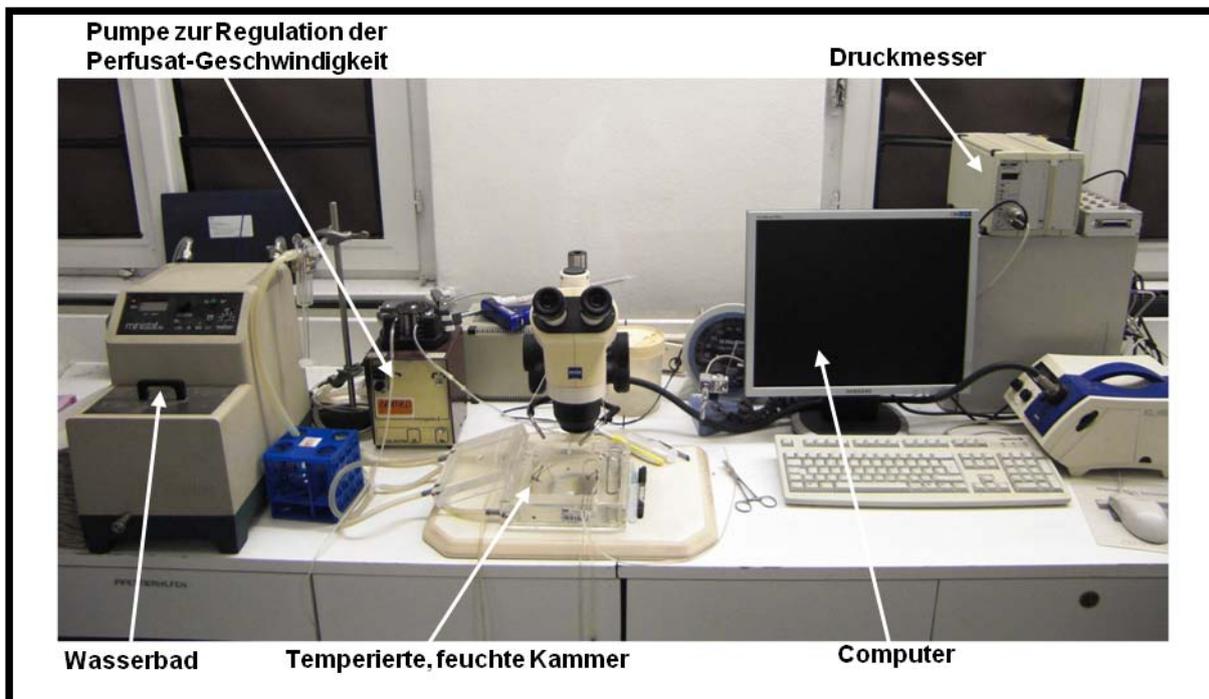


Abbildung 9: Apparativer Aufbau der Hinterbein-Perfusionsanlage.

Gezeigt ist der apparative Aufbau der Messanlage im Überblick. Beschreibung siehe Text.

Die feuchte Kammer besteht aus zwei Teilen, die beide mit dem Wasserbad auf 37°C geheizt wurden. Um das Austrocknen der Präparate zu verhindern, blieb der Deckel der Kammer während des Experiments geschlossen.

Mit Hilfe der Pumpe wurden die Hinterbeine zunächst mit begaster CO₂-Tyrode mit konstanter Flussrate (5 bis 8 ml/min) perfundiert. Dies führte zu einem systemischen Druck von etwa 40-70 mmHg (Abb. 10), welcher leicht hypoton, dennoch im

physiologischen Bereich war. Für den Blutdruck der Maus wird ein Bereich von 70-100 mmHg angegeben (Bonsmann, 1934). Die Basaldrücke der Knockoutmäuse und ihrer zugehörigen Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant. Die Schwankungen im Basaldruck zwischen den einzelnen Mauslinien lassen sich durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Pumpen erklären: mit der 1. Pumpe wurde ein Basaldruck von etwa 50-70 mmHg eingestellt, mit der 2. Pumpe wurde die Durchflussrate auf 5ml/min gestellt und ein Basaldruck zwischen 40 und 50 mmHg erhalten. Die unterschiedlichen Basaldrücke hatten allerdings keinen Einfluss auf die Effekte der α 1-adrenergen Stimulation.

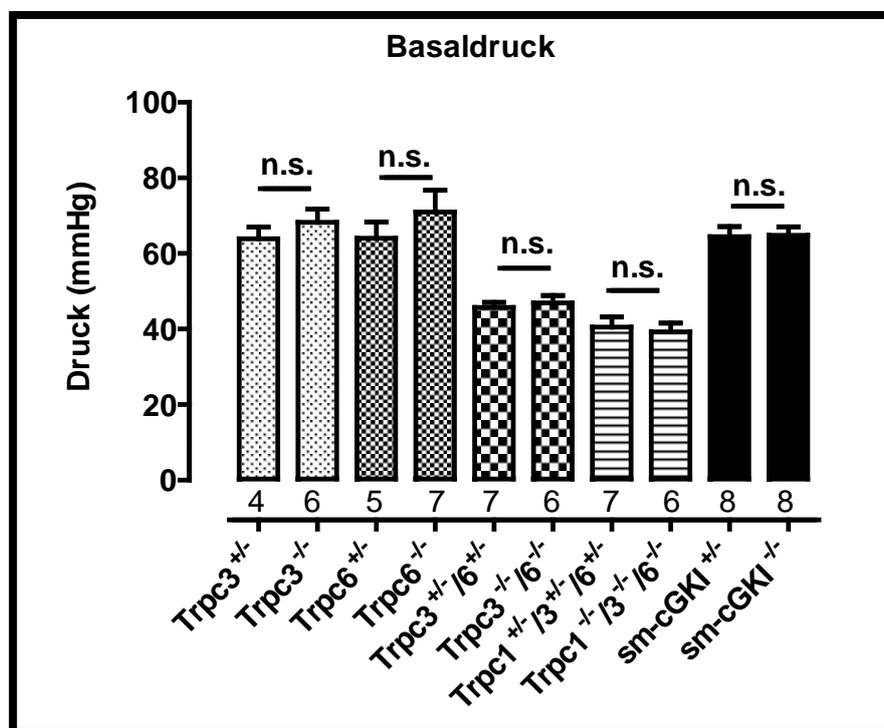


Abbildung 10: Systemischer Druck der einzelnen Mauslinien bei der Hinterbein-Perfusion.

Basaldruck in den Hinterbeinen der verschiedenen Mauslinien. Die Zahlen repräsentieren die Anzahl der Versuche (= Anzahl verwendeter Versuchstiere). Die Säulen stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. Die Daten wurden mittels Student's t-Test ausgewertet. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den heterozygoten Kontrolltieren und ihren jeweiligen homozygoten KOs. n.s., nicht signifikant

Nach Erreichen eines stabilen Basaldrucks wurde der Versuch gestartet. Die vasoaktiven Pharmaka (Tab. 2) - Carbachol (CCh; 10 μ M), Phenylephrin (PE; 10 μ M), N_{ω} -Nitro-L-Arginin Methyl Ester Hydrochlorid (L-NAME; 100 μ M), 8-Bromoguanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (8-Br-cGMP) (300 μ M) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (100 μ M) - wurden in CO_2 -Tyrode gelöst und durch

entsprechenden Wechsel der verschiedenen Pufferlösungen nacheinander und jeweils nach Einstellung eines stabilen Tonus verabreicht. Die daraus resultierenden Druckänderungen wurden mittels Computer visualisiert.

Als muskarinerger Agonist (van Zwieten *et al.*, 1995) führt Carbachol, bei intaktem Endothel des Gefäßsystems, über die Aktivierung der NO-Kaskade zur Relaxation (Furchgott, 1984; Furchgott *et al.*, 1980).

Das Gefäßendothel ist empfindlich gegenüber mechanischer Belastung. So konnte Ralevic *et al.* (1989) zeigen, dass kleinste Luftblasen im Perfusionsmedium zu einer Zerstörung des Endothels führen. Deshalb wurden bei der Durchführung der Versuche Luftblasen im Schlauchsystem vermieden. Zusätzlich wurde der Effekt von CCh in drei Experimenten im WT untersucht (Abb. 11). CCh (10 μ M) reduzierte den PE-Tonus um $33,7 \pm 10,2$ %. Mit diesem Experiment wurde sichergestellt, dass das Endothel während der Hinterbein-Perfusion nicht beschädigt wird.

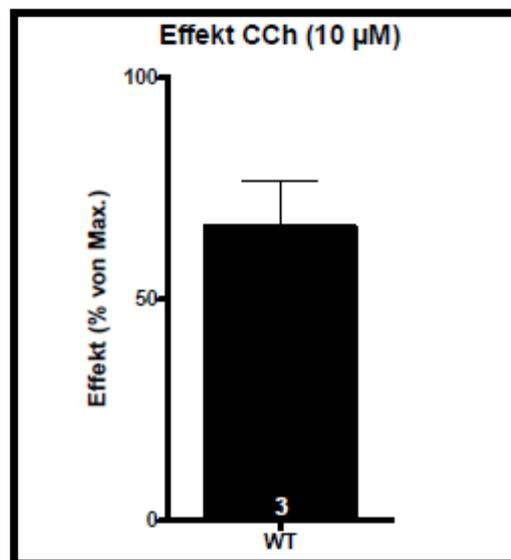


Abbildung 11: Relaxation des PE-Tonus durch CCh im WT-Hinterbein.

Effekt von Carbachol - Statistik. Die Säule stellt den Mittelwert \pm SEM dar. Die Zahl gibt die Anzahl an Mäusen wieder. Carbachol (10 μ M) führte zu einer Reduktion des PE-Tonus (10 μ M) von $33,7 \pm 10,2$ %.

Phenylephrin zählt zu den α 1-adrenergen Agonisten (Langer *et al.*, 1984) und führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur der Gefäße und somit zu einem erhöhten peripheren Widerstand (Hein *et al.*, 2007). Zur Ermittlung der optimalen Applikationsdosis wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für PE (Abb. 12 A) im WT-Hinterbein-Gefäßsystem erstellt. Dabei wurden steigende Konzentrationen an

PE (0,3 μM - 100 μM) kumulativ appliziert. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes wurde die nächsthöhere Konzentration verabreicht. Aus diesem Versuch ergab sich ein EC_{50} -Wert von 4,5 μM . Für die folgenden Versuche wurde PE mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Dies entspricht etwa 75 % der maximalen Kontraktionskraft von PE. Moosmang et al. (2003) verwendeten für die Hinterbein-Perfusion 1 mM PE, was für die Versuche dieser Arbeit zu hoch war.

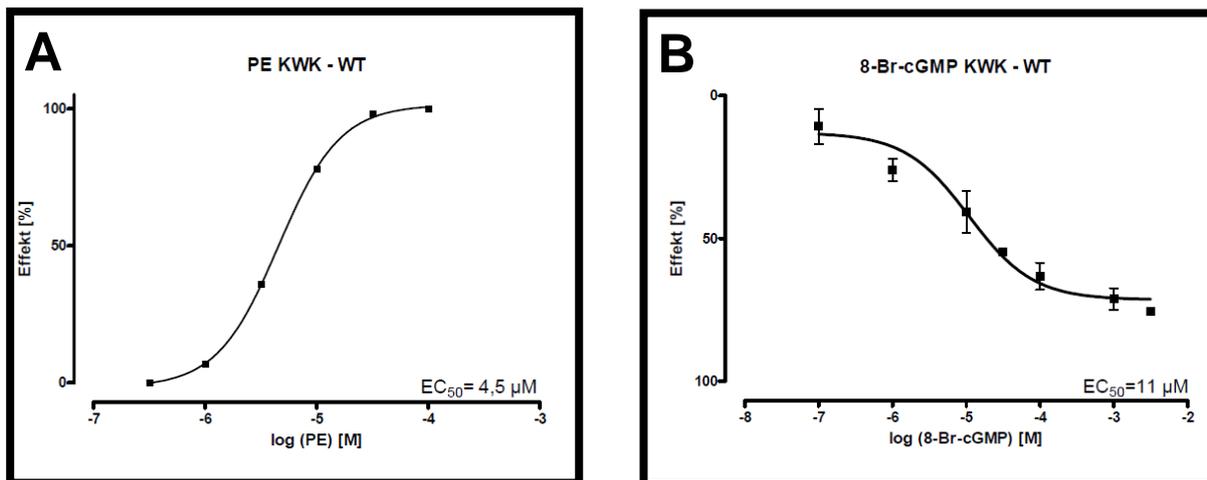


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von PE und 8-Br-cGMP auf den systemischen Druck im Hinterbeinmodell der WT-Maus.

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin (PE). Punkte repräsentieren Messwerte aus einer Messung. Die Punkte wurden mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Der EC_{50} -Wert lag bei einer Konzentration von 4,5 μM .

B) Kumulative Applikation verschiedener 8-Br-cGMP Konzentrationen (0,1 μM - 3 mM) bei gleichzeitiger Gabe von PE (10 μM). Punkte repräsentieren Messwerte aus 1-5 Messungen. Die Punkte wurden mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Der EC_{50} -Wert lag bei einer Konzentration von 11 μM .

Bei L-NAME handelt es sich um ein L-Arginin-Derivat, welches die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) hemmt und somit den vaskulären Tonus erhöht (Rees *et al.*, 1990).

Das verwendete 8-Br-cGMP ist ein cGMP-Analogon, welches durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt. (s. Einleitung 1.4). Dabei weist das Derivat drei Vorteile auf: 8-Br-cGMP 1.) ist membrangängig, 2.) ist schlecht abbaubar durch Phosphodiesterasen und 3.) eignet sich besser als Stickstoffmonoxid (NO) zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase, da NO auch cGMP-unabhängig wirken kann (Hanafy *et al.*, 2001). Auch für 8-Br-cGMP wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (s. Abb. 12 B) im

WT-Hinterbein erstellt. 8-Br-cGMP reduzierte den PE-vermittelten Druckanstieg konzentrationsabhängig. Es ergab sich ein EC₅₀-Wert von 11 µM. Für die folgenden Versuche wurde mit einer submaximalen Konzentration an 8-Br-cGMP von 300 µM gearbeitet. Bei dieser Konzentration ist keine Kreuz-Aktivierung der PKA zu erwarten (Worner *et al.*, 2007).

Zur vollständigen Relaxation wurde IBMX appliziert. Dabei handelt es sich um einen Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor. Diese Hemmung führt unter anderem zur Akkumulation von cAMP und cGMP in den glatten Gefäßmuskelzellen (Pan *et al.*, 1994; Souness *et al.*, 1992) und zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) (Standen *et al.*, 1998), welche an der Vasodilatation beteiligt ist (Ko *et al.*, 2008).

Carbachol-Stammlösung (-20 °C)	
Carbachol	100 mM
in bidest. H ₂ O gelöst	
Phenylephrin-Stammlösung (-20 °C)	
Phenylephrin	100 mM
in bidest. H ₂ O gelöst	
L-NAME-Stammlösung (-20 °C)	
L-NAME	100 mM
in bidest. H ₂ O gelöst	
8-Br-cGMP-Stammlösung (-20 °C)	
8-Br-cGMP	100 mM
in bidest. H ₂ O gelöst	
IBMX-Stammlösung (-20 °C)	
IBMX	100 mM
in DMSO gelöst	

Tabelle 2: Stammlösungen der vasoaktiven Pharmaka.

2.6.1.2 Auswertung der Hinterbein-Perfusion

Für die Auswertung der Druckänderungen wurde *Microsoft Office EXCEL 2003* verwendet. Die Balkendiagramme und Graphiken wurden mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 5.0* erstellt. Zur Bestimmung des PE-induzierten Druckanstiegs in den Hinterbeinen wurde die Amplitude zwischen dem maximalen Druckwert nach Stimulation und dem Wert des Ausgangsdruck verwendet (Abb. 13 A). Zur Bestimmung des Effektes von 8-Br-cGMP wurde nachfolgende Formel verwendet:

$$\frac{((\text{Wert (100 \% Kontraktion)} - \text{Wert (0 \% Kontraktion)}) - \text{Wert (Effekt 8-Br-cGMP)}) \times 100\%}{\text{Wert (100 \% Kontraktion)} - \text{Wert (0 \% Kontraktion)}}$$

Da sich oft durch Ödembildung der Druck nicht auf den Ausgangswert vor der PE-Stimulation absenken ließ - die in das umliegende Gewebe einlaufende Pufferlösung drückt auf das Gefäßsystem (BDI, 2013) - wurde für die Auswertung der Wert „0 % Kontraktion“ (= Nullbezugspunkt; Relaxationsminimum nach IBMX-Stimulation) an das Ende der Messung gesetzt (Abb. 13 B, roter Pfeil rechts). Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass der Versuch nicht länger als 60 min dauerte, da die Ödembildung zeitabhängig ist (Bomzon *et al.*, 1985). Innerhalb kürzerer Zeitintervalle (<10 min) war der Effekt von PE auf den Druckwert vollständig reversibel (Abb. 13 A).

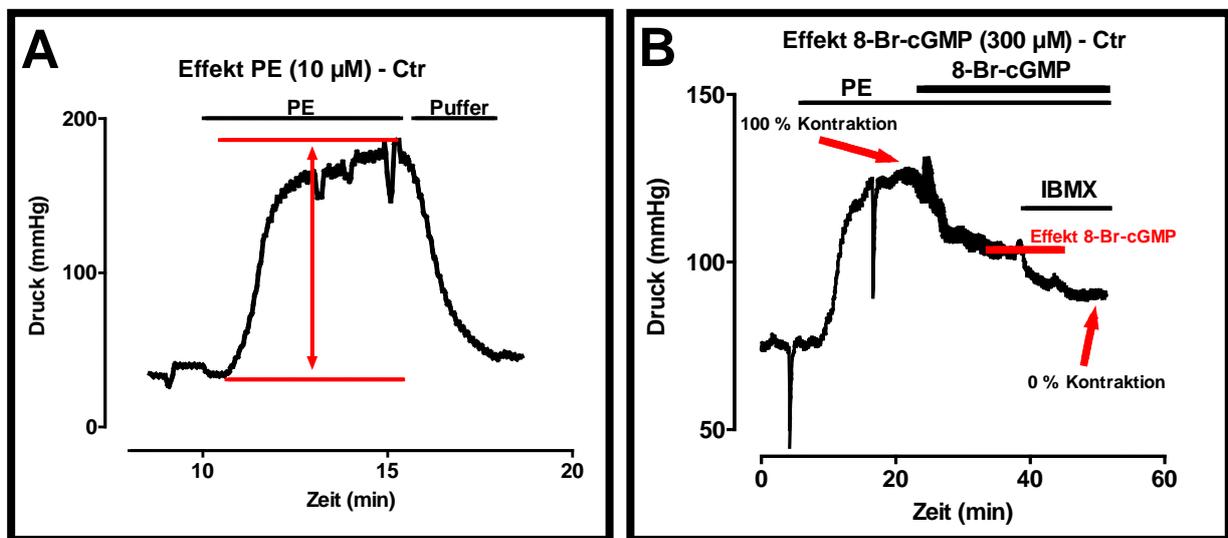


Abbildung 13: Graphische Auswertung der Hinterbein-Perfusion.

A) Originalaufzeichnung Effekt PE in Kontrolltier - Der Effekt von PE wurde als Differenz aus den Werten des Maximaldrucks und des Ausgangsdrucks dargestellt.

B) Originalaufzeichnung Effekt 8-Br-cGMP in Kontrolltier - Der Effekt von 8-Br-cGMP wurde durch Festlegung der Werte „100 % Kontraktion“ und „0 % Kontraktion“ (=Nullbezugspunkt) aus oben angeführten Quotienten bestimmt (=verbleibender Druck vom Maximaldruck).

2.6.2 Kraftmessung am glatten Muskel (*Aorta thoracalis*)

Eine weitere Möglichkeit, zur Untersuchung der vaskulären Kontraktilität, ist die isometrische Kraftmessung an Aortenmuskelpräparaten. Diese wird im Folgenden näher erläutert.

2.6.2.1 Versuchsapparatur und Durchführung

Für die isometrische Kraftmessung unter physiologischen Bedingungen wurden folgende Geräte benötigt: Myograph mit Organbädern (Abb. 14 A), eine Carbogen-Begasungsanlage, eine Pumpe und ein Computer. Über ein Schlauchsystem wurde die in den konstant beheizten Organbädern (37 °C) vorgelegte CO₂-Tyrode (5 ml; Tab. 1) begast, um einen stabilen pH-Wert von 7,00 zu gewährleisten. Außerdem wurden die Organbäder mit Deckeln versehen, um eine Verdunstung der Pufferlösung so gering wie möglich zu halten. Zur digitalen Erfassung der Messdaten wurde die Software *Myodaq 2.01* verwendet.

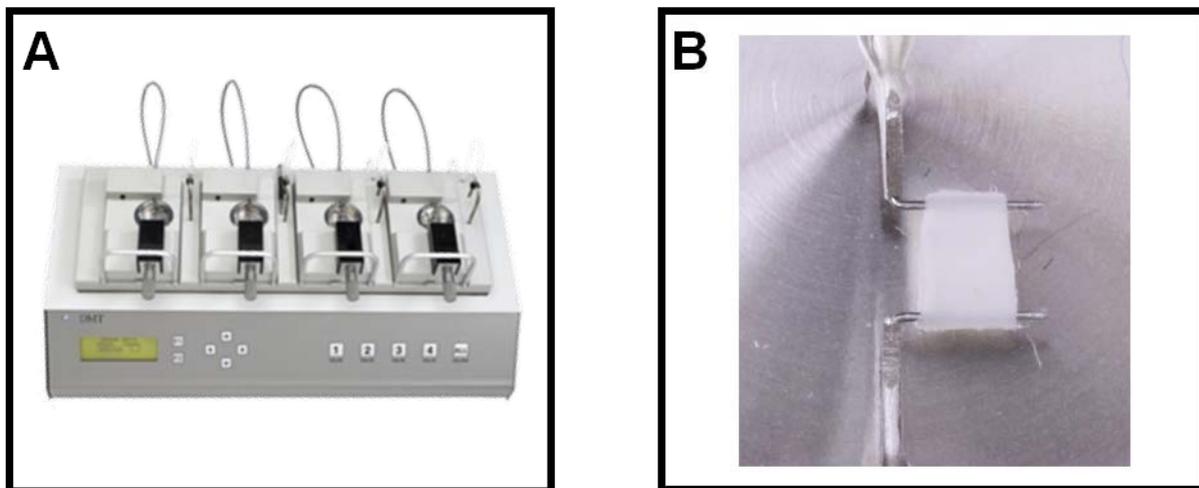


Abbildung 14: Apparativer Aufbau für die Kraftmessung am glatten Gefäßmuskel unter physiologischen Bedingungen.

A) Darstellung des Myograph601-Kraftmessers mit vier Organbädern. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

B) Vergrößerte Darstellung eines konstant beheizten (37 °C) Organbades mit vorgedehntem Aortenring. Einer der Haken ist fixiert, der andere dient als Kraftaufnehmer. Als Verdunstungsschutz wurde jedes Organbad mit einem Deckel abgedeckt. (Quelle: www.dmt.dk)

Die, wie unter 2.5 beschrieben, freipräparierten und gesäuberten thorakalen Aorten der unterschiedlichen Mauslinien wurden in ein bis vier Segmente zerschnitten. Diese wurden in die vorbereiteten Organbäder überführt, vorsichtig über zwei Haken gezogen (Abb. 14 B) und vermessen. Einer der Haken war fixiert, der andere diente als Kraftaufnehmer. Es ist darauf zu achten, dass das Endothel beim Einspannen nicht beschädigt wird. Anschließend wurden die vier einzelnen Organbäder mit dem System verbunden und die Aortenringe konnten sich für 10 min an die Bedingungen adaptieren. Vor jeder Messung war eine Vordehnung der Aortenringe zur Kalibrierung dieser notwendig. Die Vordehnung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Kraftentwicklung der Muskelpräparate nach α 1-adrenerger Stimulation (Mulvany, 1988). Hierzu wurde zunächst einmalig eine Kraft-Dehnungskurve erstellt. Dabei wurden die eingespannten Präparate mehrmals abwechselnd um 0,85 mN/mm vorgedehnt, bei Erreichen des basalen Tonus mit 3 μ M PE stimuliert und nach Einstellung einer konstanten Kontraktion sechsmal mit CO₂-Tyrode gespült. Der Vorgang wurde beendet, sobald die maximale Kraftentwicklung durch PE erreicht war. Daraus ergab sich für die Vordehnung ein Wert von 3,33 mN pro mm Aortenlänge, mit welcher die eingesetzten Aortenringe, entsprechend ihrer Länge, vor Versuchsbeginn vorgedehnt wurden, um eine für die maximale Kontraktion optimale Vorspannung zu erhalten. Anschließend wurden die Präparate für 45 min äquibriert. Nach Einstellung eines stabilen Basalniveaus wurde mit den Kontraktionsstudien begonnen.

Zur Ermittlung der optimalen Applikationsdosen wurden Konzentrations-Wirkungskurven für PE und Carbachol (kumulative Applikation) erstellt. Die EC₅₀-Werte von PE im WT (EC₅₀=0,19 μ M) und Trpc6-KO (EC₅₀=0,20 μ M) unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 15 A). Der EC₅₀-Wert von Carbachol im WT betrug 1,1 μ M (Abb. 15 B).

Für die folgenden Versuche wurde PE mit einer Konzentration von 3 μ M (80 % der maximalen Kontraktionskraft) und CCh mit einer submaximalen Konzentration von 10 bzw. 30 μ M eingesetzt (2.6.2 bzw. 2.8.3).

Für 8-Br-cGMP wurde die Konzentration so gewählt, dass es nicht zur Kreuzaktivierung der PKA kam (300 μ M) (Worner *et al.*, 2007).

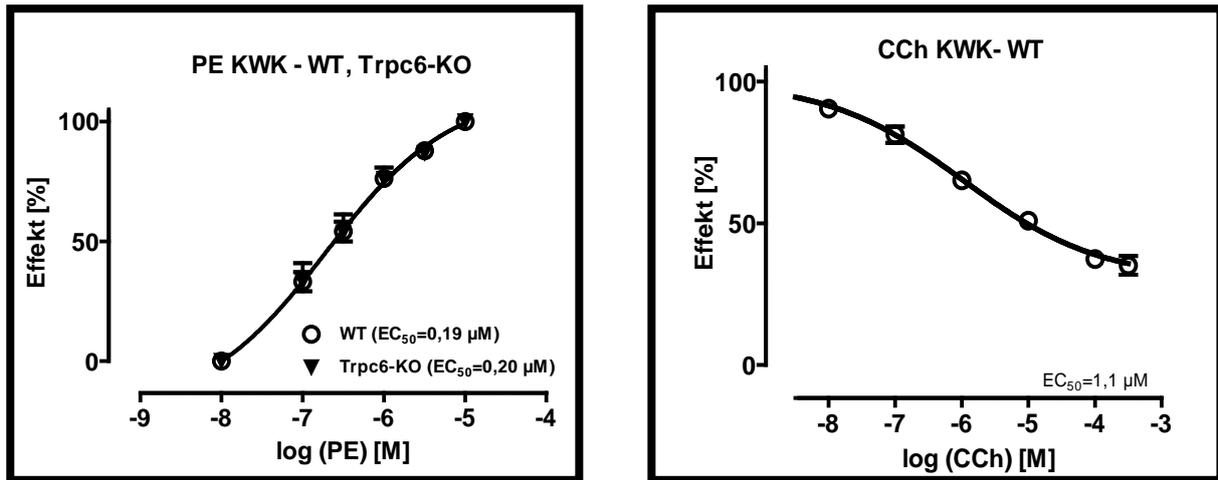


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von PE in Aortenringen von WT und Trpc6-KO-Mäusen bzw. von CCh in Aortenringen von WT-Mäusen.

A) Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Phenylephrin (PE) im WT und Trpc6-KO. Punkte repräsentieren Messwerte aus je zwei Messungen (je ein Versuchstier). Die Punkte wurden mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Der EC₅₀-Wert lag im WT bei einer Konzentration von 0,19 µM, im Trpc6-KO bei einer Konzentration von 0,20 µM. Die EC₅₀-Werte unterschieden sich nicht signifikant.

B) Kumulative Applikation verschiedener Carbachol (CCh) Konzentrationen (10 nM – 300 µM) bei gleichzeitiger Gabe von PE (3 µM). Punkte repräsentieren Messwerte aus 4-46 Messungen (1-12 Versuchstiere). Die Punkte wurden mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Der EC₅₀-Wert lag bei einer Konzentration von 1,1 µM.

Um zu überprüfen, ob das Endothel beim Einspannen beschädigt worden ist, wurde der Effekt von Carbachol untersucht (Abb. 16). CCh (10 μ M) reduzierte den PE-Tonus um $37,05 \pm 2,74$ %. Mit diesem Experiment wurde bestätigt, dass das Endothel beim Einspannen der Aorta nicht beschädigt wurde.

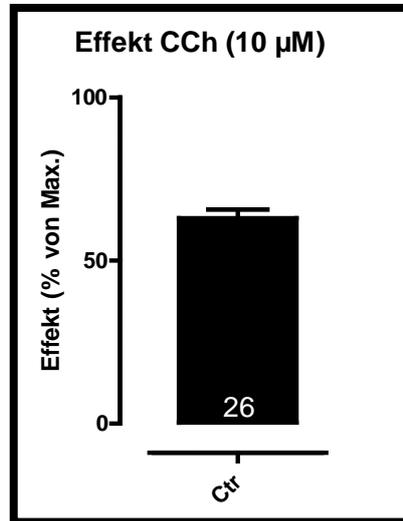


Abbildung 16: Relaxation des PE-Tonus (3 μ M) durch CCh in der Aorta von Kontrolltieren.

Effekt von Carbachol - Statistik. Die Säule stellt den Mittelwert \pm SEM dar. Die Zahl gibt die Anzahl an Experimenten (7 Versuchstiere) wieder. Carbachol (10 μ M) führte zu einer Reduktion des PE-Tonus von $37,05 \pm 2,74$ %.

Es folgten die eigentlichen Experimente. Hierbei wurden die Aortenringe nacheinander mit Phenylephrin (3 μ M), L-NAME (100 μ M), 8-Br-cGMP (300 μ M) und IBMX (100 μ M) (s. 2.6.1.1), jeweils nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes, stimuliert. Die daraus resultierenden Kraftänderungen wurden mittels Computer visualisiert.

2.6.2.2 Auswertung der Kraftmessung an Aortenringen

Für die Auswertung der Kraftänderungen wurde *Microsoft Office EXCEL 2003* und die Software *Origin 6.1* verwendet. Die Balkendiagramme und Graphiken wurden mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 5.0* erstellt. Die Auswertung erfolgte analog zur Auswertung der Druckänderungen im Gefäßsystem der Hinterbeine. Das Maximum der erzeugten Kontraktion nach PE oder PE+L-NAME Stimulation wurde 100 %, das Relaxationsminimum nach IBMX-Stimulation als 0 % (Nullbezugspunkt) gesetzt. Der Effekt von PE oder PE+L-NAME wurde als Amplitude aus

Kontraktionsmaximum und Relaxationsminimum ausgedrückt. Für die Bestimmung des Effekts von 8-Br-cGMP ist die Formel unter 2.6.1.3 verwendet worden. Graphisch dargestellt wurde die verbliebene PE-induzierte Spannung der Maximalspannung.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung genomischer DNS aus Mausgewebe

Zur Genotypisierung der Mausexemplare ist die Isolation genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS) notwendig. Hierzu wurde 7-9 Tage nach der Geburt eine Gewebebiopsie (Schwanzspitze) der zu genotypisierenden Nachkommen durchgeführt.

Die gewonnenen Gewebeproben wurden in einem Gemisch aus autoklaviertem, doppelt-destilliertem Wasser, Detergens-haltigem Puffer (5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer) und Proteinase K (50 mg/ml) im Verhältnis 79:20:1 über Nacht bei 58 °C verdaut. Mit Hilfe des Detergens-haltigen Puffers wurde die Zellmembran solubilisiert. Dies ist notwendig, da ein Aufschluss durch Pipettieren oder Zentrifugation zum Auftreten von Scherkräften führt, welche die großen genomischen DNS-Moleküle zerstören. Des Weiteren werden die Proteine denaturiert und durch die zugegebene Proteinase K abgebaut. Diese wurde am folgenden Tag durch 15 minütiges Kochen bei 95 °C inaktiviert. Für die folgende Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1 µl des Verdau verwendet.

2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNS aus Mausgewebe

Um eine Kontamination mit den weit verbreiteten und außerordentlich stabilen RNasen, die zum Abbau der Ribonukleinsäure (RNS) führen, zu vermeiden, sollten einige Vorsichtsmaßnahmen vor Beginn und während der Arbeit berücksichtigt werden. Zu diesen zählt, ein mit Ethanol (80 %) gereinigter Arbeitsplatz, die Verwendung von gestopften Pipettenspitzen und gebackenen (250 °C) Glasgefäßen und eine strikte Trennung aller Gebrauchslösungen, die für die RNS-Präparation benötigt werden, von den übrigen Lösungen im Labor. Überdies hinaus wurde ausschließlich Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O) verwendet. DEPC hemmt

durch kovalente Bindung an primäre und sekundäre Amine u.a. RNasen (Mülhardt, 2003).

DEPC-H₂O (Raumtemperatur)

Diethylpyrocarbonat	1 ml
bidest. H ₂ O	ad 1000ml
über Nacht rühren, gebackenes Gefäß (250 °C), autoklavieren	

Tabelle 3: Herstellung von Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O).

Für die Gesamt-RNS-Isolation wurden pro Versuch 12-15 isolierte und freipräparierte Aorten von WT-Mäusen (s. 2.5) in ein 14 ml Rundbodenröhrchen überführt, mit 0,9 ml PeqGOLD RNAPure (Trizol) versetzt und homogenisiert (Micra D-8). Anschließend wurde das Homogenisat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 0,2 ml Chloroform zugegeben und mit dem Vortex gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Probe für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erhalten. Die RNS sammelte sich in der oberen, farblosen, wässrigen Phase, während DNS und Protein in der Inter- oder Phenolphase zurückblieben. Die RNS-haltige Phase wurde abgetrennt, mit 350 µl Isopropanol versetzt und die RNS über Nacht bei 4 °C präzipitiert. Am folgenden Tag wurde die ausgefallene RNS bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das verbleibende Pellet mit 800 µl 75% Ethanol (EtOH)-DEPC-H₂O gewaschen. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt, wobei die Zeit auf 5 min reduziert und nach der dritten Zentrifugation das Pellet bei Raumtemperatur für 5 min getrocknet wurde. Anschließend wurde das RNS-Pellet in einem adäquaten Volumen an DEPC-H₂O für 10 min bei 56 °C und 500 rpm gelöst, ehe die RNS-Lösung bei -20 °C gelagert wurde.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung der RNS

Zur Konzentrationsbestimmung der wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde das Nanodrop-Verfahren angewandt. Hierbei wird die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, angegeben in µg/µl, gemessen. Je Messung wurden 2 µl Probe eingesetzt. Zusätzlich maß das Gerät das Verhältnis der Absorptionen von RNS zu Protein ($OD_{260/280}$), welches Aufschluss über die Reinheit der Probe gibt. Das Verhältnis sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, was auf eine geringe Proteinverunreinigung hinweist.

2.7.4 DNS-Verdau

Bei der unter 2.7.2 beschriebenen Methode wird theoretisch nur RNS isoliert, da durch das enthaltene Phenol der pH-Wert sinkt und sich kleine DNS-Fragmente im sauren Phenol lösen. Die größeren Fragmente finden sich nach Zentrifugation in der Interphase wieder (Mülhardt, 2003). Um dennoch sicherzustellen, dass die Proben DNS frei sind, wurde zusätzlich ein DNS-Verdau durchgeführt.

RNS in DEPC-H ₂ O	47 µl
10x Reaktionspuffer ohne dNTPs	6 µl
DNase (RNase-frei; 10 u/µl)	6 µl

Tabelle 4: Ansatz für DNS-Verdau.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]
KCl	74,56	500
Tris, pH 8,0	121,14	100
MgCl ₂	203,30	15

ad. 5 ml bidest. H₂O

Tabelle 5: Ansatz für 10x Reaktionspuffer-Puffer ohne dNTPs.

Für den Verdau wurde das PCR-Reaktionsgefäß mit dem DNase-Ansatz in einen Thermocycler gestellt und folgendes Programm gestartet:

30 min 37 °C
5 min 80 °C
4 °C

Bei 37 °C findet der DNS-Verdau, bei 80 °C die Inaktivierung der DNase statt. Anschließend wurde die RNS auf eine Konzentration von 0,25 µg/µl - 0,4 µg/µl mit 1x Reaktionspuffer ohne Desoxyribonukleosidtriphosphate (1xRT-Puffer ohne dNTPs) eingestellt und bei -20 °C gelagert.

2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist es möglich, bestimmte DNS-Sequenzen *in vitro* gezielt zu vervielfältigen (Saiki *et al.*, 1988). Das Verfahren lässt sich grundsätzlich in drei Schritte untergliedern: 1.) Denaturierung, 2.) Annealing und 3.) Elongation. Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNS bei 95 °C aufgeschmolzen. An die entstandenen DNS-Einzelstränge lagern sich spezifische Oligonukleotid-Primer an (Annealing). Die Primer werden so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNS-Fragment von einem Ende her auf dem nicht-kodierenden, vom anderen Ende her auf dem kodierenden DNS-Strang flankieren. Dabei wird die Annealing-Temperatur so gewählt, dass sie etwa 5 °C niedriger als die Schmelztemperatur der Primer (55-65 °C) ist. Beim dritten Schritt der PCR, der Elongation, synthetisiert die DNS-Polymerase ausgehend von dem kurzen, doppelsträngigen Primer-DNS-Hybrid den fehlenden komplementären DNS-Strang in 5'→3'-Richtung. Elongationstemperatur und -zeit hängen von der verwendeten Polymerase (meist 72 °C) und der Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragments ab. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Abfolge (Denaturierung, Annealing und Elongation) entstehen im Idealfall bei x Zyklen pro Ausgangsfragment 2^{x-1} Amplifikate, da rein rechnerisch in jedem Zyklus eine Verdoppelung des Amplifikats stattfindet.

2.7.5.1 Amplifikation genomischer DNS (Genotypisierung)

Zur genomischen Charakterisierung der Mausnachkommen wurde, jeder Mauslinie entsprechend, eine PCR mit dem Ansatz aus Tabelle 6 durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang. Tabelle 8 zeigt das PCR-Protokoll. Die Temperaturen und Zeiten hängen von den Amplifikaten und den dazugehörigen Primern ab. Nach Zusammenpipettierung des PCR-Reaktionsansatzes wurde das PCR-Reaktionsgefäß in den Thermocycler gestellt und das jeweilige Programm gestartet.

bidest. H ₂ O (autoklaviert)	ad. 25 µl
Primer forward (10 µM)	0,3 µl
Primer reverse (10 µM)	0,3 µl
5x Reaction Green Buffer	7,0 µl
GoTaq [®] Polymerase	0,3 µl
DNS (2.7.1)	1 µl

Tabelle 6: PCR-Reaktionsansatz zur Genotypisierung.

A		B	
5x Reaction Green Buffer (-20 °C)		dNTP Mix (-20 °C)	
5x Green GoTaq [®] Flexi Buffer	500 µl	bidest. H ₂ O (autoklaviert)	600 µl
MgCl ₂ (25 mM)	150 µl	dNTP (je 100mM)	je 100 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	50 µl		

Tabelle 7: Ansatz für (A) 5x Reaction Green buffer und (B) dNTP Mix.

94 °C	5 min.	
94 °C	10-30 sek.	} 35 x
55-65 °C	20-45 sek.	
72 °C	30-45 sek.	
72 °C	5 min.	

Tabelle 8: PCR-Protokoll in Abhängigkeit der zu untersuchenden Amplifikate und der dazugehörigen Primer.

Eine anschließende Zugabe des 6x DNS-Ladepuffers (Tab. 11) zu den Proben war nicht erforderlich, da bereits Farbmarder (s. 2.7.5.3) im 5x Reaction Green Buffer enthalten waren.

2.7.5.2 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) lässt sich die Transkription eines bestimmten Gens spezifisch in bestimmten Geweben oder Zellen nachweisen. Da einzelsträngige RNS für eine Amplifikation mittels PCR nicht geeignet ist, muss diese zunächst in komplementäre DNS (cDNS), ein zur RNS komplementärer DNS-Einzelstrang, umgeschrieben werden. Dieser Schritt wird durch die Reverse Transkriptase katalysiert und deshalb als Reverse Transkription bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sensiscript and Omniscript Reverse

Transkriptasen (zusammen mit HotStarTaq DNS Polymerase: QIAGEN Enzym Mix) aus dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit verwendet. Diese besitzen ein Temperaturoptimum von 50 °C. Anwendung findet die RT mit anschließender PCR (s. 2.7.5) (RT-PCR) unter anderem bei der semiquantitativen Bestimmung einer spezifischen RNS-Sequenz. Bei dieser Art der Bestimmung ist es notwendig, dass bei jedem Zyklus ein interner Standard, ein sogenanntes Haushalts-Gen, koamplifiziert wird. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches in Theorie keinerlei Regulation unterliegt und somit in jedem Gewebe oder in jeder Zelle zu jeder Zeit in gleicher Menge exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als interner Standard verwendet (Mülhardt, 2003).

Die cDNS-Synthese und die Amplifikation (mittels HotStarTaq DNS Polymerase) wurden in einem Schritt durchgeführt. Dazu wurde nach dem Protokoll des QIAGEN OneStep RT-PCR Kits verfahren. In Tabelle 9 ist der Reaktionsansatz für die RT-PCR dargestellt, in Tabelle 10 das RT-PCR Protokoll. Die Sequenzen der jeweiligen Primer (Trpc3, Trpc6, HPRT (= interner Standard), PECAM-1 (= spezifischer Endothelzell-Marker) (Kondo *et al.*, 2007) und α -SMA (=spezifischer Glattmuskelzell-Marker) (Sousa *et al.*, 2007) finden sich im Anhang wieder. Nach Zusammenpipettierung aller Komponenten wurde die RT-PCR (Endpunktbestimmung) gestartet.

RNase-freies H ₂ O	ad. 50 μ l
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10 μ l
dNTP Mix (je 10 mM)	2 μ l
Primer forward	final 0,6 μ M
Primer reverse	final 0,6 μ M
QIAGEN Enzym Mix	2 μ l
RNS (2.7.3+2.7.4)	final 1 μ g

Tabelle 9: Reaktionsansatz RT-PCR nach QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.

50 °C (Reverse Transkription)	30 min.	
95 °C (Aktivierung der DNS Polymerase)	15 min.	
94 °C (Denaturierung)	30 sek.	} 35 x
55 °C (Annealing)	30 sek.	
72 °C (Elongation)	1 min.	
72 °C (finale Extension)	10 min.	

Tabelle 10: RT-PCR-Protokoll nach QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.

Anschließend wurden die Proben mit 6x DNS-Ladepuffer (1:6; Tab. 11) versetzt und mittels Gelelektrophorese analysiert.

Ficoll Typ 400	18 g
10x TBE	60 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	24 ml
Bromphenolblau (50 mg/ml)	3 ml
Xylencyanol FF (50 mg/ml)	3 ml
H ₂ O ad.	100 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung 6x DNS-Ladepuffer.

2.7.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der PCR-Produkte, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates negativ geladen und bewegen sich im elektrischen Feld Richtung Anode. Dabei werden die einzelnen DNS-Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichtes und ihrer Konformation aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel sinkt mit zunehmender Masse. Zur Verfolgung des Elektrophoreseverlaufs mit bloßem Auge dienen Farbmarker wie Bromphenolblau und Xylencyanol FF. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNS-Fragmente, verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser interkaliert mit Nukleinsäuren und verändert dabei sein Anregungsspektrum. Dadurch lassen sich die PCR-Produkte als diskrete Banden im UV-Licht sichtbar machen. Als Referenz wurde neben den Proben ein DNS-Standard (1 kb Leiter; Tab. 12 B) aufgetragen.

Da alle PCR-Produkte kleiner als 1000 kb waren, wurden ausschließlich 2 % Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose mit 1x Tris-Borat-EDTA (TBE; Tab. 12 A) in der Mikrowelle bei 1000 W aufgeköcht, auf ca. 50 °C abgekühlt, mit 0,8 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und Luftblasen-frei in einen Gelschlitten mit eingesetzten Gelkämmen gegossen. Nach Festwerden des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TBE überschichtet. Anschließend wurden die Käme entfernt, der DNS-Standard und die Proben in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 200 V angelegt. Daraufhin erfolgte die Auswertung des Gels mittels Geldetektor.

A		B	
10x Tris-Borat-EDTA (TBE)		DNS-Standard (-20 °C)	
Tris-HCl	540 g	1 kb Plus DNA Ladder	280 µl
Borsäure	275 g	H ₂ O bidest.	3800 µl
EDTA	37 g	6x DNS-Ladepuffer	800 µl
H ₂ O (bidest.)	ad. 5l		

Tabelle 12: Zusammensetzung (A) 10x Tris-Borat-EDTA (TBE, Raumtemperatur) und (B) DNS-Standard (1 kb Leiter).

2.7.5.4 Auswertung der Agarosegele

Die Auswertung der Gele, sowohl die der Genotypisierung, als auch die der RT-PCR, erfolgte digital. Dazu wurde das entsprechende Gel auf die UV-Lampe des Geldetektors gelegt und fotografiert.

Für die semiquantitative Bestimmung der RT-PCR-Produkte wurde die Software *EZQuant-Gel* verwendet. Mit Hilfe dieser Software ließen sich die Intensitäten der einzelnen Banden ermitteln. Dazu wurden die Banden markiert und manuell ausgefüllt. Da die Gele zum Teil unterschiedlich lange belichtet wurden, und somit die Helligkeit der Hintergründe variierte, wurde zusätzlich für jedes Gel ein Hintergrund definiert, dessen Wert automatisch durch die Software vom Wert der Banden abgezogen wurde. Für die statistische Auswertung wurde jeweils der Quotient aus dem Bandenwert des Zielgens und dem des internen Standards gebildet.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung endothelialer und glattmuskulärer Zellen aus muriner *Aorta thoracalis*

Sowohl für die immunocytochemischen Experimente (ICC), als auch für die Calcium-Messungen (Fura-2) wurden frisch isolierte Endothelzellen (EC) und glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der thorakalen Aorta von Kontroll-, *Trpc3-KO*-, *Trpc6-KO*- und *sm-cGKI-KO*-Mäusen isoliert. Für die ICC wurden zusätzlich Zellen aus *cGKI-KO*-Mäusen gewonnen. Für die Isolation der ECs wurde das Protokoll von Kobayashi et al. (2005) in abgewandelter Form verwendet. Die gespülten,

gesäuberten und in Kulturmedium (DMEM) gelagerten Aorten (3 Aorten pro Experiment) wurden auf der einen Seite unter dem Lichtmikroskop mit 5/0 Seide verschlossen und von der anderen Seite mit Kollagenase Typ II-Lösung (2 mg/ml in serumfreiem Medium) gefüllt, ehe auch diese Seite zugebunden wurde. Anschließend wurden die Aorten in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 42 min bei 37 °C und 250 rpm im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Aorten geöffnet und die ECs mit 5 ml 20%FBS-DMEM herausgespült (Spritze mit Kanüle) und in einer Glaspetrischale gesammelt. Die restliche Aorta wurde vorübergehend in vorgewärmter nominell Ca^{2+} -freier Tyrode (Tab. 13) bei 37 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm in einem gläsernen Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgekippt und das klare Zellpellet in 2 ml (ICC) bzw. 0,8 ml (Fura-2) 20%FBS-DMEM resuspendiert. Für die ICC wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen auf zwei Collagen-I-beschichtete Petrischalen (35 mm), für FURA-2 auf zwei bis drei Glasplättchen in speziellen Messkammern unter der Sterilbank ausgebracht. Diese Messkammern sind so konstruiert, dass einerseits Plättchen eingespannt werden können, andererseits können sie in das Mikroskop eingesetzt werden. Die Zellen wurden für 2,5 h im Brutschrank bei 37 °C und 5,0 % CO_2 inkubiert.

Zur Isolierung der Glattmuskelzellen wurden die Aorten in kleine Stücke zerschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Lösung A (Tab. 14) gegeben und für 42,5 min bei 34 °C und 500 rpm im Heizblock verdaut. Anschließend wurde mittels Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und Lösung B (Tab. 15) zugegeben. Für die Calcium-Messungen wurden den Lösungen A und B 0,1 mM CaCl_2 hinzugefügt. Es folgten drei Inkubationsschritte, einmal 9 min bei 34 °C und 500 rpm und zweimal 9 min bei 34 °C und 1000 rpm. Zwischen den Schritten wurden die Proben mit einer Pipette resuspendiert. Daraufhin wurden die Proben erneut abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Gewebereste mit 360 μl nominell Ca^{2+} -freier Tyrode und 40 μl BSA (10 mg/ml) gemischt und für 10 min auf Eis gelagert. Unter der Sterilbank wurde der Überstand (mit VSMCs) für die ICC auf zwei Gelatine-beschichtete Petrischalen (100 mm) aufgeteilt, für die Calcium-Messung in drei Löcher einer 12-Lochplatte mit Deckgläschen ausgebracht. Daraufhin wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 für 50 min inkubiert. Anschließend wurde die Ausbeute unter einem Lichtmikroskop bewertet.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	60
L-Glutaminsäure	147,13	85
KCl	74,56	5,6
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,30	1
HEPES	238,31	10
pH 7,4 (NaOH)		
Glucose	180,16	10

Tabelle 13: Zusammensetzung nominell Ca²⁺-freier Tyrode (VSMC-Präparation).

Substanz	Volumen [µl]
nominell Ca ²⁺ -freie Tyrode	350
Albumin Fraktion V (BSA) (10 mg/ml)	50
Collagenase Typ II (20 mg/ml)	17,5
Dithiothreitol (DTT) (10 mg/ml)	50

Tabelle 14: Lösung A zur Isolation von VSMCs.

Substanz	Volumen [µl]
nominell Ca ²⁺ -freie Tyrode	300
Albumin Fraktion V (BSA) (10 mg/ml)	50
Collagenase Typ II (20 mg/ml)	75
Trypsininhibitor (10 mg/ml)	50

Tabelle 15: Lösung B zur Isolation von VSMCs.

2.8.2 Immunocytochemische Untersuchung

Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper lassen sich spezifisch bestimmte Proteine in einzelnen Zellen detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der cGKI, sowie die Expression der Trpc-Kanäle 3 und 6 in frisch isolierten Endothel- und Glattmuskelzellen der thorakalen Aorta von WT-, Kontroll-, cGKI-KO-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen untersucht. Dazu wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Zunächst wurde mit Antikörpern für Endothelzell- bzw. Glattmuskelzell-spezifische Marker gefärbt. Darauf folgte die Färbung des gewünschten Zielproteins oder des jeweils anderen Markers als Kontrolle. Eine Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper befindet sich im Anhang (Tab. 20+21).

2.8.2.1 Durchführung des Versuches

Die unter 2.8.1 gewonnenen Zellen mussten zunächst nach Inkubation im Brutschrank fixiert werden. Dazu wurden beide Zelltypen vorsichtig einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Tab. 16) gewaschen und für 10 min mit Paraformaldehydlösung (PFA; 4 %; Tab. 17) inkubiert. PFA führt zu einer reversiblen Vernetzung der Proteine. Danach wurde das PFA abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Um den Antigenzugang zu verbessern, wurden die Zellen mit einem Detergens-haltigen Puffer (blocking buffer; 1 % BSA, 0,1 % Triton X, 1 % FBS in PBS) für 30 min bei RT auf dem Schüttler permeabilisiert. Anschließend wurde der erste primäre Antikörper (anti-PECAM-1/CD31: Endothelzellmarker (2,5 µg/ml, Ratte), anti- α -SMA: Glattmuskelzellmarker (0,5 µg/ml, Kaninchen oder 1/100, Maus)) in blocking buffer verdünnt, auf die Zellen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Masse [g]
NaCl	58,44	40
KCl	74,56	1
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	177,99	7,2
KH ₂ PO ₄	136,09	1,2
pH 7,40 (NaOH oder HCl)		
dest. H ₂ O ad. 4,5 l -> autoklavieren		

Tabelle 16: Zusammensetzung phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).

4 % Paraformaldehydlösung (4 ° C)

Paraformaldehyd	8 g
PBS	200 ml
lösen im Wasserbad bei 60 °C	

Tabelle 17: Zusammensetzung Paraformaldehydlösung (4 %).

Am folgenden Tag wurden die Antikörper abgenommen und die Zellen wurden 3x 10 min mit Waschpuffer (0,1 % BSA, 0,1 % Triton X in PBS) gewaschen. Daraufhin wurde der erste sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 488, 1/300, anti-Ratte; Alexa Fluor 594, 1/300, anti-Kaninchen; Cy2-gekoppelt, 1/500, anti-Maus) in blocking buffer verdünnt, auf die Zellen gegeben und diese im Dunkeln für 1 h bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde abgenommen und es wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Für die Kollokalisationsfärbungen des Zielproteins, wurden

die oben beschriebenen Schritte mit den entsprechenden primären (anti-cGKI, 1/500, Kaninchen; anti-Trpc3, 1/200, Kaninchen; anti-Trpc6, 1/200, Kaninchen; anti-PECAM-1/CD31, 2,5 µg/ml, Ratte; anti-α-SMA, 0,5 µg/ml, Kaninchen) und sekundären Antikörpern (Cy3-gekoppelt, 1/500, anti-Kaninchen; Alexa Fluor 488, 1/300, anti-Ratte; Alexa Fluor 594, 1/300, anti-Kaninchen) nach einstündiger Inkubation mit blocking buffer wiederholt. Es wurde immer darauf geachtet, dass die sekundären Antikörper nicht durch Lichteinstrahlung ausbleichen. Um die Zellen nach der Doppelfärbung zusätzlich vor dem Ausbleichen zu schützen wurden diese mit dem Einbettmedium Large Volume Vision Mount und einem Glasplättchen Luftblasen-frei eingebettet. Das Glasplättchen war nötig, da der Kunststoff der Petrischalen kaum UV-Licht durchlässt. Die eingebetteten Zellen wurden über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Analyse der Doppelfärbungen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scan Mikroskops (LSM510). Zur Anregung der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden ein Krypton-Argon Laser (Cy2, Alexa Fluor 488; Wellenlänge 488 nm) bzw. ein Helium-Neon Laser (Cy3, Alexa Fluor 594; Wellenlänge 543) verwendet. Die Bilder wurden mit einem 20x Objektiv und verschiedenen Zoomfaktoren aufgenommen. Es wurde bei allen Versuchen stets darauf geachtet, dass die Einstellungen der Lochblende (pinhole) und die Empfindlichkeit des Restlichtverstärkers konstant waren.

2.8.2.2 Auswertung des Versuches

Zur Auswertung und Nachbetrachtung der Zellaufnahmen wurde die Software *Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121* verwendet. Auch der Größenmaßstab ließ sich damit einblenden.

2.8.3 Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 lassen sich Calcium-Änderungen in einzelnen Zellen verfolgen (Moore *et al.*, 1990). Für die Messungen wurden frisch isolierte ECs und VSMCs der thorakalen Aorta von Kontroll-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen verwendet. Im Folgenden soll der Farbstoff kurz vorgestellt werden, ehe der apparative Aufbau und die Durchführung beschrieben werden.

2.8.3.1 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 bildet mit Calcium-Kationen Chelatkomplexe im Verhältnis 1:1. Dadurch wird das Maximum der Fluoreszenzintensität zu einer anderen Anregungswellenlänge verschoben. Somit lassen sich Messungen der Fluoreszenzintensität bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen durchführen (Moore *et al.*, 1990). Die Emission erfolgt stets bei 510 nm.

Durch die Bindung von Calcium kommt es zu einer Änderung des elektronischen Energieniveaus und somit zu einem veränderten Absorptionsverhalten. Nach Gryniewicz *et al.* (1985) liegt der isobetische Punkt bei 357 nm. Wird der Farbstoff bei dieser Wellenlänge angeregt, bleibt trotz Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ die Fluoreszenzintensität konstant. Anregung mit einer kürzeren Wellenlänge führt bei zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Verstärkung der Intensität bei 510 nm, während diese bei längeren Anregungswellenlängen mit zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ abnimmt (Abb. 17).

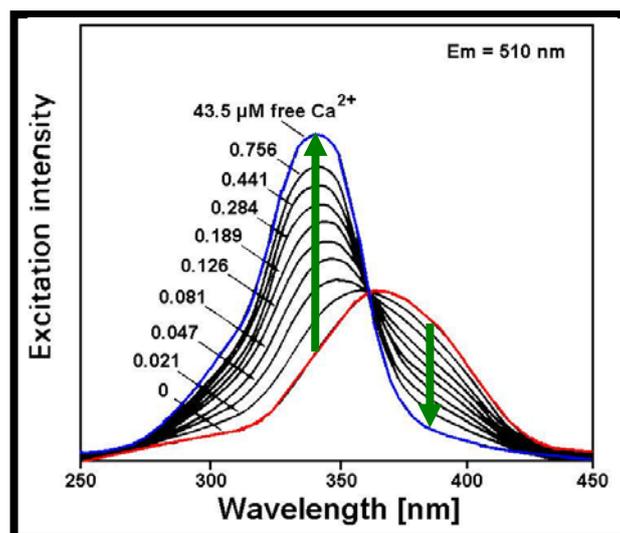


Abbildung 17: Prinzip der intrazellulären Calcium-Messung.

Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm in Abhängigkeit von verschiedenen Calcium-Konzentrationen und Anregungswellenlängen (modifiziert nach http://www-user.tu-chemnitz.de/~awill/diplom/Bilder/abb3_3.gif, aufgerufen am 18.04.2013).

Zur Bestimmung der Konzentration wird das Verhältnis der Intensitäten F_{350} und F_{380} , welche durch Anregung mit den Wellenlängen 350 nm und 380 nm bei 510 nm emittiert werden, gebildet. Dieser Quotient ($R = F_{350}/F_{380}$) ist proportional zur $[Ca^{2+}]_i$ und unabhängig von Zelldicke und Farbstoffkonzentration (Gryniewicz *et al.*, 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM

(membrangängiges Derivat) beladen. Die Kopplung von Acetoxymethylester (AM) an den Farbstoff erleichtert die Diffusion in die Zelle. Durch Abspaltung der Estergruppe durch intrazelluläre Esterasen entsteht ein aktiver, membranimpermeabler Farbstoff (Moore *et al.*, 1990).

2.8.3.2 Versuchsapparatur

Abbildung 18 zeigt den apparativen Aufbau der Anlage zur Bestimmung von intrazellulären Calcium-Konzentrationen in frisch isolierten ECs und VSMCs. Die Anlage besteht aus einem Monochromator mit integrierter Lichtquelle, einem Leistungs- und Steuerungsgerät, einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop, einer gekühlten, hochauflösenden MCCD Kamera und einem Computer. Mit Hilfe der Kamera werden die Fluoreszenzsignale detektiert. Sowohl die Steuerung, als auch die Messungen erfolgten mit der Software *TILLvision v4.5.50*.

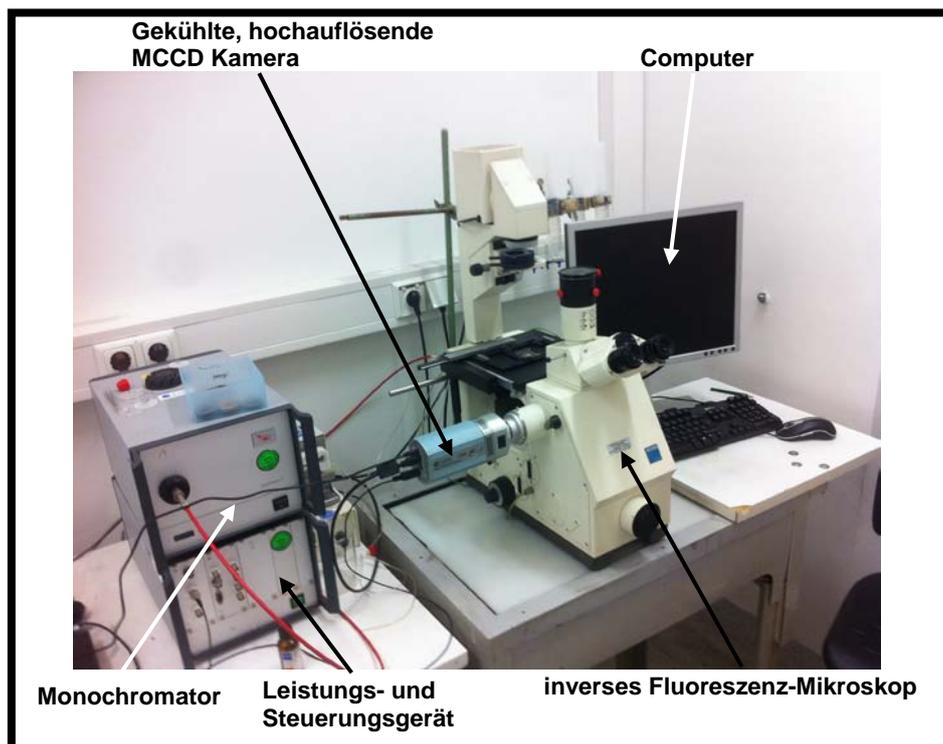


Abbildung 18: Apparativer Aufbau der Anlage zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$.

Gezeigt ist der apparative Aufbau der Messanlage im Überblick. Beschreibung siehe Text.

2.8.3.3 Durchführung des Versuches

Da der Farbstoff sehr lichtempfindlich ist, wurde stets im Dunkeln gearbeitet. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, dass die Endothelzellen nicht adhären waren. Deshalb wurde bei den folgenden Schritten äußerst vorsichtig vorgegangen.

Die Zellen wurden jeweils mit 5 μM Fura-2-AM in den Messkammern bzw. in der 12-Lochplatte für 1 h im Dunkeln beladen. Anschließend wurden diese 3x 7 min mit Ca^{2+} -haltiger HEPES-Tyrode (Tab. 19) steigender Konzentration (0,5 mM, 1,0 mM, 1,8 mM Ca^{2+}) gewaschen. Für die Messungen an den VSMCs wurden die Glasplättchen mit den Zellen ebenfalls in spezielle Messkammern eingespannt und mit HEPES-Tyrode (1,8 mM Ca^{2+}) überschichtet. Nach dem Transfer der Messkammern unter das Mikroskop, konnte mit den Versuchen begonnen werden. Zunächst war es notwendig ein Messprotokoll zu erstellen, welches stets vor Versuchsbeginn geladen wurde. Entscheidend hierbei waren die Anregungswellenlängen, Belichtungsdauer und Anzahl an Wiederholungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen 1x pro Sekunde für 30 ms mit den Anregungswellenlängen 350 nm und 380 nm belichtet. Diese Schritte wurden 240x wiederholt.

Um mit den Messungen beginnen zu können, wurden geeignete Zellen als sogenannte „Regions of interest“ (ROI) ausgewählt. Dadurch konnten die Fluoreszenzintensitäten mehrerer Zellen pro Bildausschnitt ermittelt werden.

Nach Erreichen eines konstanten Verhältnisses der Intensitäten erfolgte die Applikation der Pharmaka während der Messung über eine Pipette. Aufgrund der mangelnden Adhäsion, vor allem der ECs, musste auf die Verwendung einer Superfusion verzichtet werden. Daher wurden die Pharmaka nacheinander ohne Auswaschen verabreicht. Appliziert wurden PE (VSMC, 30 μM), CCh (EC, 30 μM), 8-Br-cGMP (300 μM) und 4-Br-A23187 (Erdahl *et al.*, 1994) (10 μM). Bei 4-Br-A23187 handelt es sich um ein nicht-fluoreszierendes Derivat des Calcium Ionophors A-23187. Ionophore sind in der Lage Ionen durch eine Membran zu transportieren. Durch die Schlusszugabe von 4-Br-A23187 wurde sichergestellt, dass die untersuchten Zellen gleich stark beladen waren und somit in die Auswertung aufgenommen wurden. Die Messung der VSMCs erfolgte durchgehend, die der ECs nicht. Nach jeder Applikation wurden Zellen aus verschiedenen Bildausschnitten

gemessen. Dies war aufgrund der bereits angesprochenen mangelnden Adhäsion notwendig. Die Messdaten wurden auf der Festplatte des Computers gespeichert.

A	Fura-2 (AM)-Stammlösung (-20 °C)
	Fura-2 (AM) 1 mM
	in DMSO gelöst
B	4-Br-A23187-Stammlösung (-20 °C)
	4-Br-A23187 1 mM
	in DMSO gelöst

Tabelle 18: Stammlösung des (A) Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 (AM) und (B) Calcium Ionophors 4-Br-A23187.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	137
KCl	74,56	5,4
CaCl ₂	147,02	1,8, 1,5, 1,0, 0,5
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,30	1
HEPES	238,31	10
Glucose	180,16	5,6
pH 7,40 (NaOH)		

Tabelle 19: Zusammensetzung HEPES-Tyrode für Calcium-Bestimmung.

2.8.3.4 Auswertung des Versuches

Die auf der Festplatte des Computers abgespeicherten Messdaten wurden mit Hilfe von *Microsoft Office Excel 2003* und *GraphPad Prism 5.0* analysiert. Für die statistische Auswertung wurden die Absolutwerte verwendet. Es wurden ECs mit einem Ausgangsverhältnis (F_{350}/F_{380}) von 0,30-0,45 und VSMCs mit einem von 0,30-0,60 zugelassen. Das Ausgangsverhältnis entsprach in etwa einer Ruhe-Ca²⁺-Konzentration von 100-200 nM (Eichkurve, Abb. 19). Zellen mit niedrigeren Werten wurden als nicht vollständig mit Fura beladen (tote Zellen), Zellen mit höheren Werten als „überbeladen“ angesehen und daher nicht für die Experimente berücksichtigt.

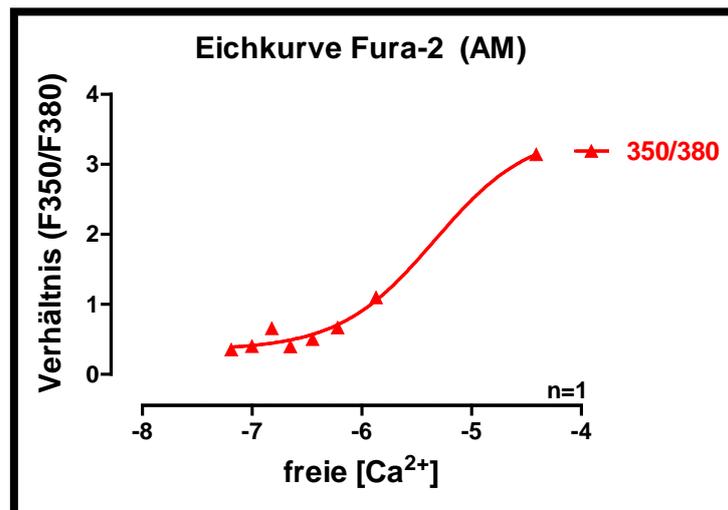


Abbildung 19: Eichkurve Fura-2 (AM) aus dem Verhältnis F350/F380

Eichkurve für Fura-2 (AM) nach Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit von *life technologies*. Punkte repräsentieren Messwerte aus einer Messung. Die Punkte wurden mit einer sigmoidalen Kurve beschrieben. Die verwendeten Ausgangsverhältnisse der untersuchten Zellen entsprachen in etwa einer Ruhe-Ca²⁺-Konzentration von 100-200 nM.

2.9 Statistische Methoden

In dieser Arbeit sind alle Ergebnisse als Originalaufzeichnungen, -aufnahmen oder als Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der Daten wurde der one way ANOVA (Bonferroni Test) Test bzw. der Student's t-Test für ungepaarte/gepaarte Daten verwendet. Hierbei steht ein Sternchen (*) für einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten. p gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an, wobei $p < 0,05$ signifikant (*), $p < 0,01$ sehr signifikant (**) und $p < 0,001$ extrem signifikant (***) bedeutet. Die Zahlen in den Säulen/Abbildungen stehen für die Anzahl der untersuchten Tiere bzw. der durchgeführten Experimente bzw. der untersuchten Zellen je Genotyp. Für die Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Signifikanzen, sowie für die Erstellung der Abbildungen wurde die Software *GraphPad Prism 5.0* verwendet.

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen dem cGMP/cGKI-Signalweg und Trpc-Kanälen, speziell Trpc1, Trpc3 und Trpc6, in glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen, wurden in der vorliegenden Arbeit physiologische (Hinterbein-Perfusion, Kraftmessung an intakten Aorten), molekularbiologische (RT-PCR) und zellbiologische (Immunocytochemie, Calcium-Messung) Methoden angewendet.

3.1 Effekte vasoaktiver Pharmaka auf die Kontraktilität der *Aorta thoracalis* und des Gefäßsystems der Hinterbeine verschiedener Mausmodelle

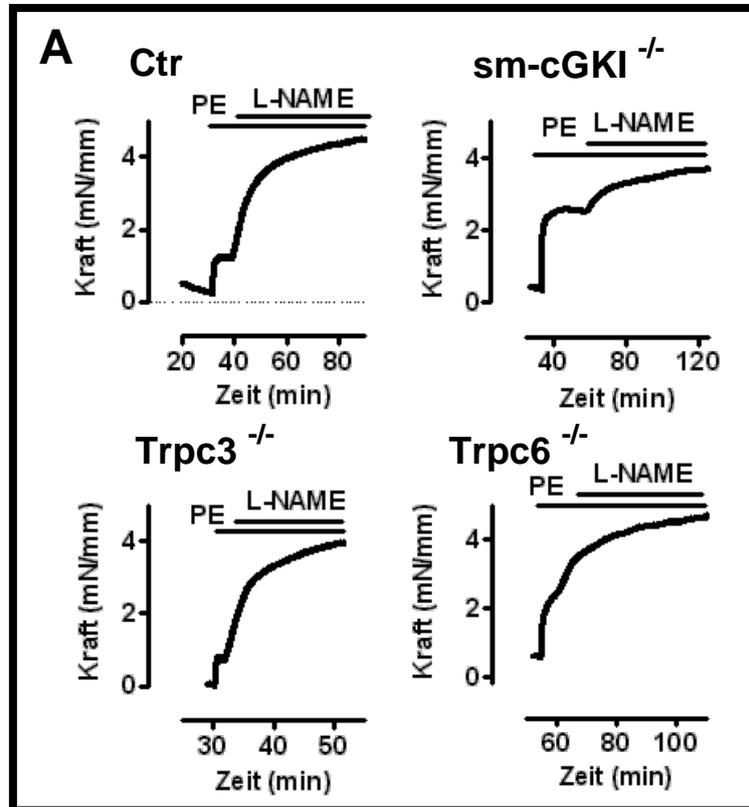
In der Gefäßmuskulatur sollen Trpc1- (Schmidt *et al.*, 2010), Trpc3- und Trpc6-Kanäle (Abramowitz *et al.*, 2009) eine bedeutsame Rolle einnehmen. Vor allem der Trpc6-Kanal und seine Regulation des glattnuskulären Tonus (Dietrich *et al.*, 2010; Voets *et al.*, 2009) stehen dabei im Focus.

Mit Hilfe von Kraftmessungen an Aortenringen bzw. des Hinterbein-Perfusionsmodells, welches das gesamte Gefäßsystem der Hinterbeine und somit die Widerstandsgefäße berücksichtigt, wurde der Effekt vasoaktiver Pharmaka auf die vaskuläre Kontraktilität intakter thorakaler Aorten bzw. des Gefäßsystems der Hinterbeine untersucht. Hierbei wurden folgende Mausmodelle verwendet: Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO- und Trpc1/3/6-KO-Mäuse.

3.1.1 Effekt von PE+L-NAME auf die Kontraktilität der *Aorta thoracalis*

Die Aortenringe der unterschiedlichen Mauslinien wurden mit dem α 1-adrenergen Agonisten Phenylephrin (3 μ M) und dem NO-Synthase (NOS)-Inhibitor L-NAME (100 μ M) stimuliert. Durch Verwendung des Inhibitors wurde die endotheliale NO-Produktion, welche zur Vasodilatation führt (Furchgott *et al.*, 1980; Moncada *et al.*, 2006), verhindert. Die Stimulation mit PE und L-NAME führte zu einer Kontraktion in den Aortenringen aller verwendeten Mauslinien, die Größe dieser Kontraktionen war statistisch nicht unterschiedlich. (Abb. 20 A+B)

Somit scheint eine α 1-adrenerg-induzierte Kontraktion der thorakalen Aorta, in Anwesenheit eines NOS-Inhibitors, unabhängig von Trpc1-, Trpc3- und Trpc6-Kanälen abzulaufen.



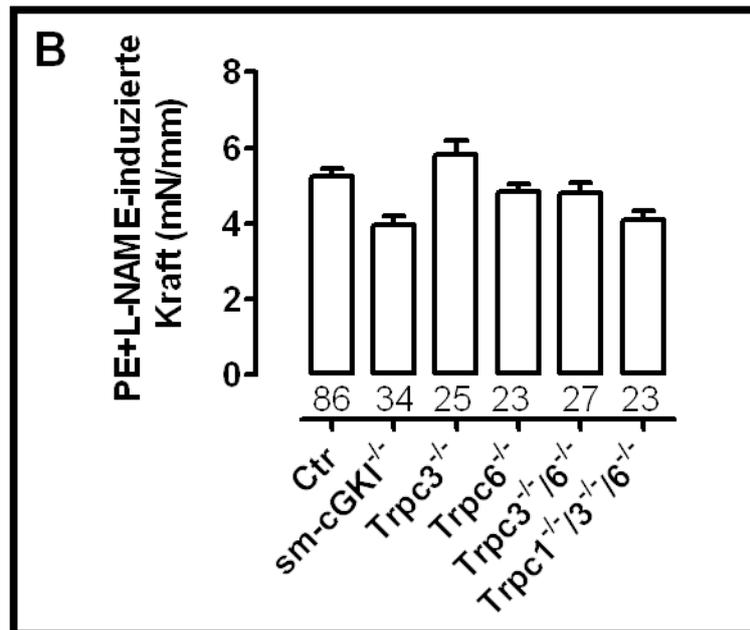


Abbildung 20: PE-induzierte Kraft in murinen Aorten in Anwesenheit von L-NAME.

A) Originalaufzeichnungen des PE+L-NAME-induzierten Kraftanstieges in Aortenringen von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Die Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (3 μ M) und L-NAME (100 μ M) an.

B) Statistik der PE+L-NAME-induzierten Kraft in den Aorten der untersuchten Mauslinien. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl an Versuchen an (Anzahl Versuchstiere: Anzahl Versuche / 4). Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied im Kraftanstieg zwischen den verschiedenen Mausmodellen.

3.1.2 Effekt von Phenylephrin auf den systemischen Druck

Die Stimulation des Gefäßsystems der Hinterbeine mit PE (10 μ M) zeigt in allen Mauslinien einen vergleichbar großen Druckanstieg (Abb. 21 A+B).

Eine zusätzliche Stimulation mit L-NAME führt im WT zu keinem weiteren signifikanten Druckanstieg (Abb. 22 A+B). Dies deutet daraufhin, dass bei α 1-adrenerger Stimulation der Hinterbeingefäße die NO-Produktion unter diesen Bedingungen nicht signifikant zur Relaxation der Gefäße beiträgt.

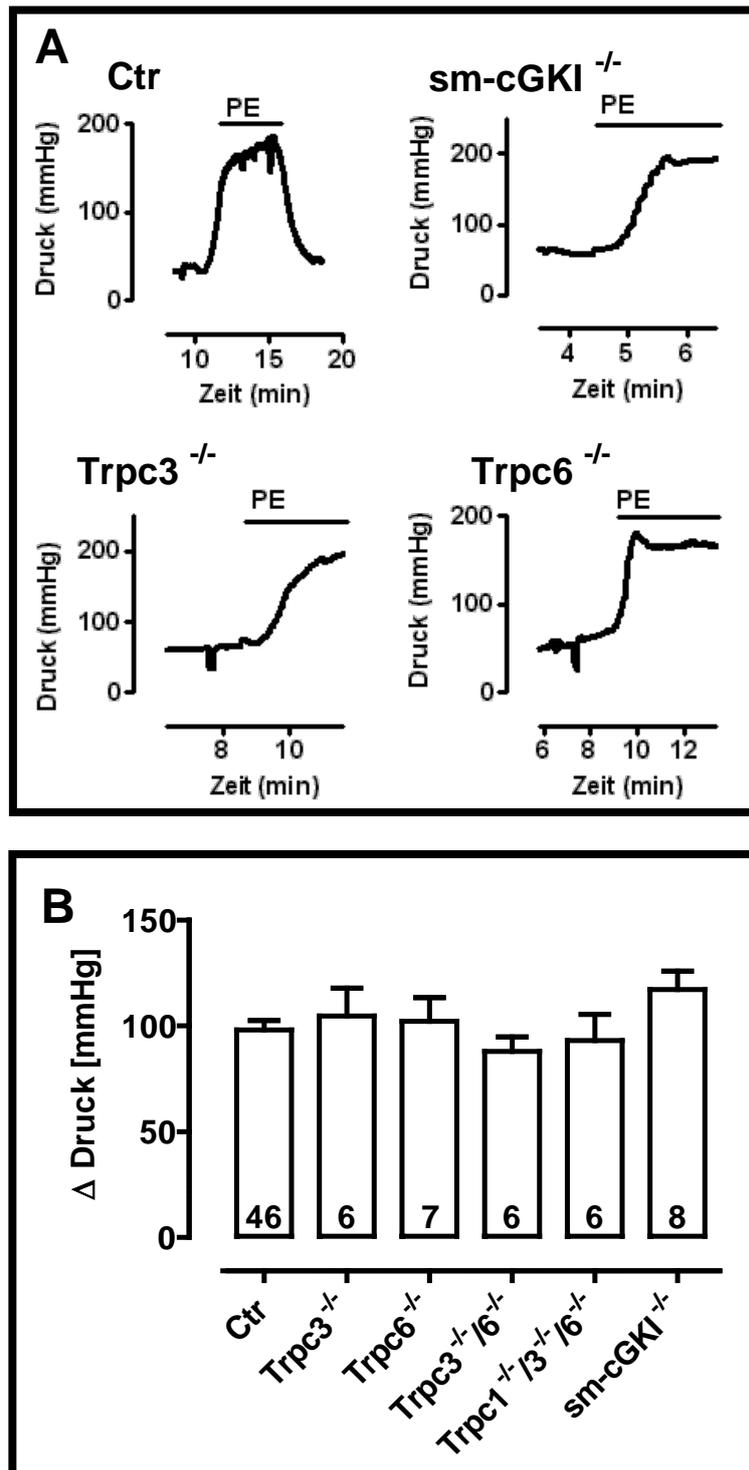


Abbildung 21: PE-induzierter Druckanstieg im Gefäßsystem muriner Hinterbeine.

A) Originalaufzeichnungen des PE-vermittelten Druckanstieges im Hinterbein-Gefäßsystem von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Die Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (10 μM) an.

B) Statistik des PE-vermittelten Druckanstieges im Gefäßsystem der Hinterbeine der verschiedenen Mauslinien. Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± SEM, Ziffern geben die Anzahl an Versuchstieren wieder. Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied im Druckanstieg zwischen den unterschiedlichen Mauslinien.

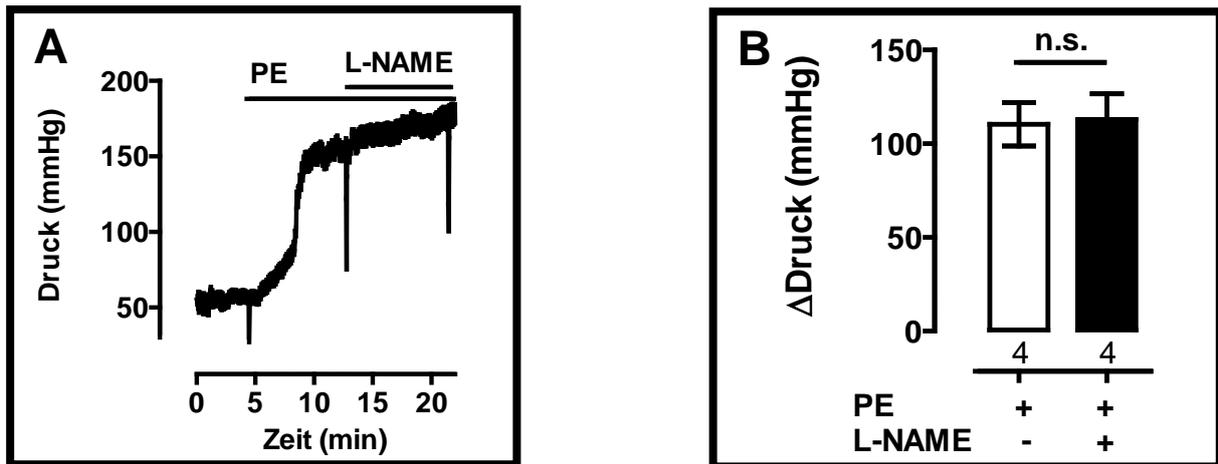


Abbildung 22: Effekt von L-NAME auf den PE-induzierten Druckanstieg im murinen Hinterbein.

A) Originalaufzeichnung des PE+L-NAME-vermittelten Druckanstiegs im Hinterbein-Gefäßsystem von WT-Mäusen. Die Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (10 μ M) und L-NAME (100 μ M) an.

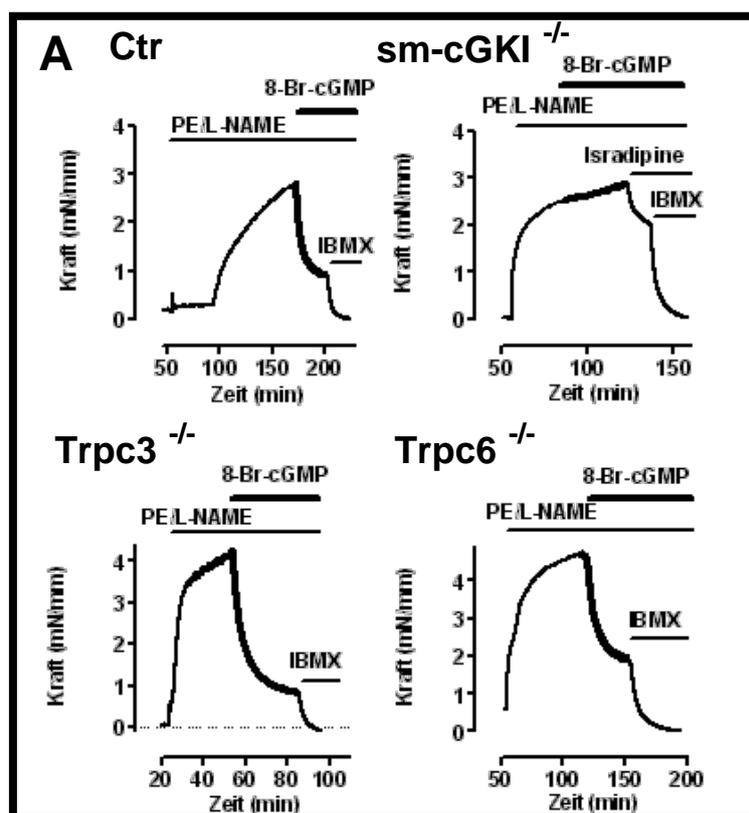
B) Statistik des PE-vermittelten Druckanstieges im Gefäßsystem der Hinterbeine von WT-Mäusen in An- bzw. Abwesenheit von L-NAME. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl an Versuchstieren wieder. Die Daten wurden mittels Student's t-Test (gepaart) analysiert. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied im Druckanstieg mit oder ohne L-NAME. n.s., nicht signifikant.

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass, bei inhibierter NO-Produktion, Trpc1-, Trpc3- und Trpc6-Kanäle nicht an der α 1-adrenerg-vermittelten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sind.

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass offenbar ein funktioneller Zusammenhang zwischen Trpc-Kanälen, insbesondere Trpc1, Trpc3 und Trpc6, und dem NO/cGMP/cGKI Signalweg besteht (Chen *et al.*, 2009; Kwan *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2008). Diese Hypothese wurde mittels Kraftmessung an Aortenringen und Hinterbein-Perfusion an den oben erwähnten Mausmodellen untersucht. Zur Aktivierung der cGKI wurde 8-Br-cGMP verwendet.

3.1.3 Effekt von 8-Br-cGMP auf die PE+L-NAME-induzierte Kontraktion der *A. thoracalis*

Die Aortenringe wurden mit PE (3 μ M) und L-NAME (100 μ M) kontrahiert und anschließend mit dem Membran-permeablen cGMP-Analog, 8-Br-cGMP (300 μ M), relaxiert. 8-Br-cGMP verringert die Kontraktionskraft in allen Mausmodellen im gleichen Ausmaß, ausgenommen in den sm-cGKI-KO-Mäusen (Abb. 23 A+B).



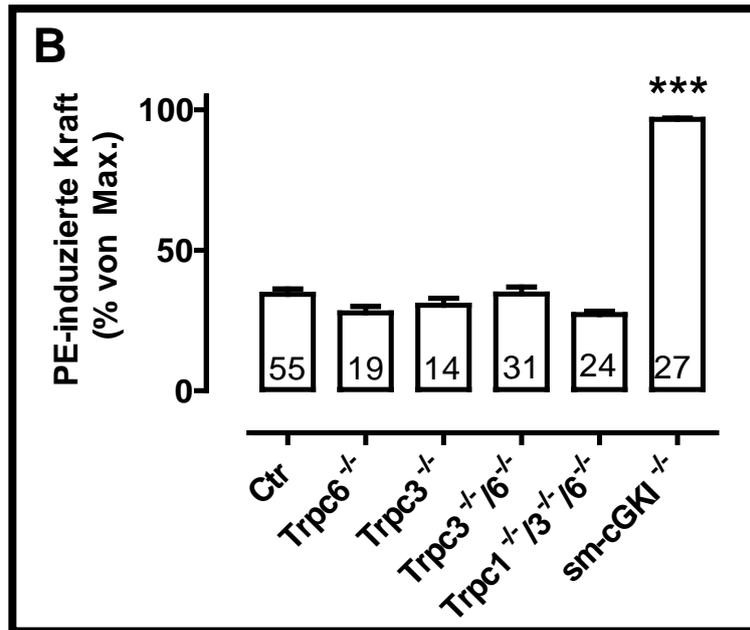


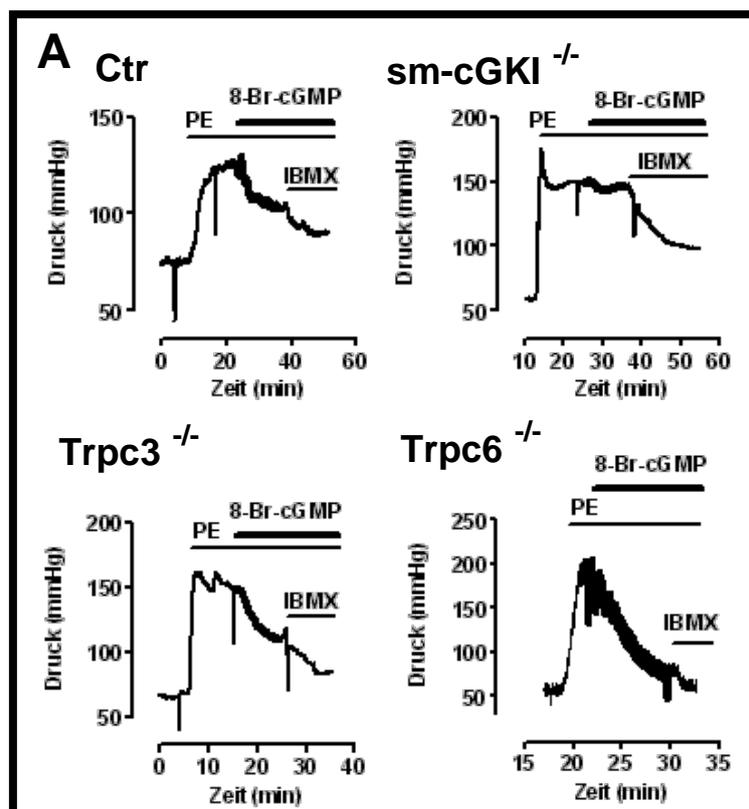
Abbildung 23: Reduktion des PE-induzierten Kraftanstiegs durch 8-Br-cGMP in murinen Aorten.

A) Originalaufzeichnungen der 8-Br-cGMP-vermittelten Relaxation nach PE-induziertem Kraftanstieg in Aortenringen von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Die Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (3 μ M), L-NAME (100 μ M), 8-Br-cGMP (300 μ M), Isradipin (1 μ M) und IBMX (100 μ M) an.

B) Statistik des relaxierenden Effektes von 8-Br-cGMP auf den PE-induzierten Kraftanstieg in den Aortenringen der unterschiedlichen Mauslinien. Dargestellt ist die PE-induzierte Kraft nach 8-Br-cGMP-Stimulation in % der maximalen Kontraktilität. Die Stimulation mit IBMX zur vollständigen Relaxation definiert den Nullwert. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl an Experimenten an (Anzahl Versuchstiere: Anzahl Experimente / 4). Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. 8-Br-cGMP relaxiert die Aorten der verschiedenen Mausmodelle im selben Ausmaß, ausgenommen die der sm-cGKI-KO-Mäusen. ***, $p < 0,001$.

3.1.4 Effekt von 8-Br-cGMP auf den PE-vermittelten systemischen Druckanstieg

Das Gefäßsystem der Hinterbeine wurde mit PE (10 μ M) kontrahiert. Die Relaxation der glatten Muskulatur wurde mit 8-Br-cGMP (300 μ M) induziert. Ähnlich wie bei den Aortenringen, reduziert 8-Br-cGMP den PE-vermittelten Druckanstieg in allen Mausmodellen in gleichem Ausmaß, jedoch nicht in den sm-cGKI-KO-Mäusen (Abb. 24 A+B).



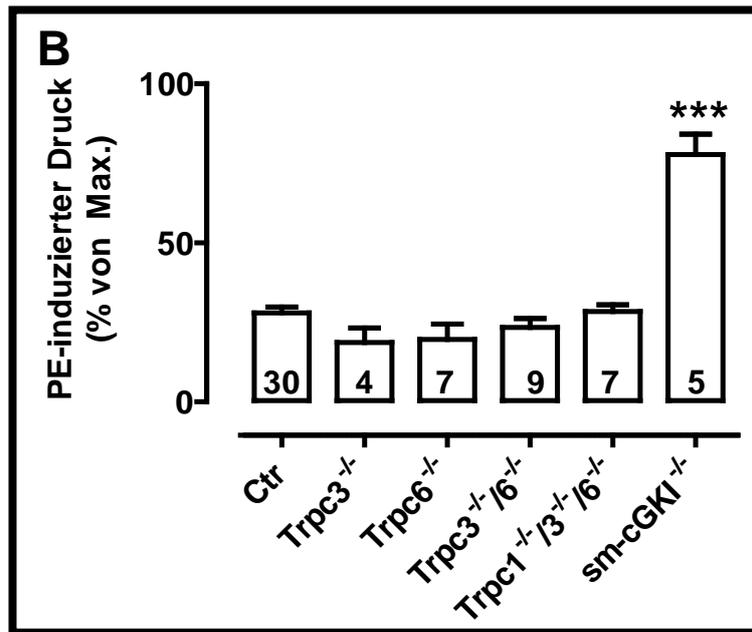


Abbildung 24: Reduktion des PE-induzierten Druckanstieges durch 8-Br-cGMP im murinen Hinterbein.

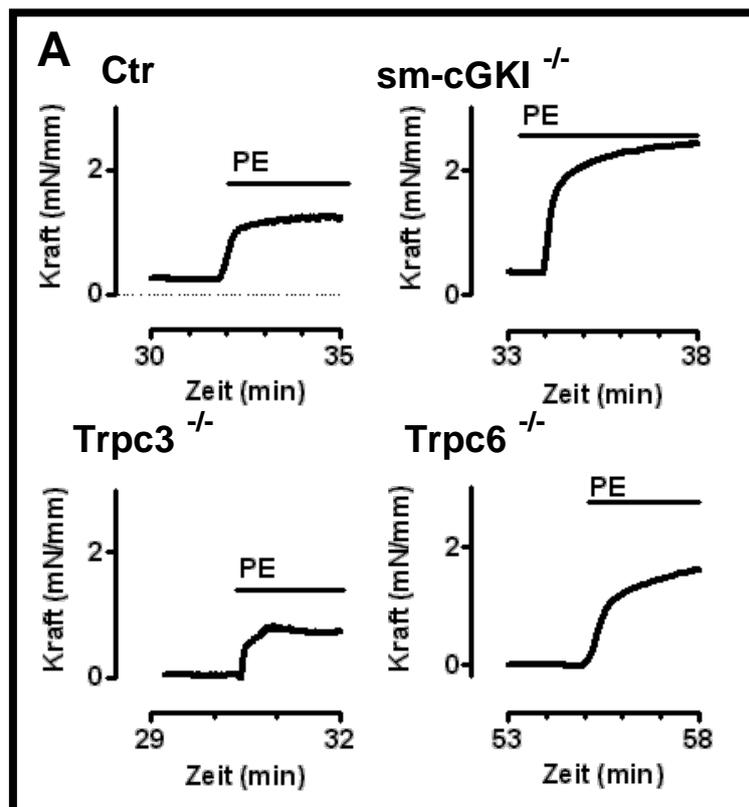
A) Originalaufzeichnungen der 8-Br-cGMP-vermittelten Relaxation nach PE-induziertem Druckanstieg im Hinterbein-Gefäßsystem von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Die Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (10 μ M), 8-Br-cGMP (300 μ M), IBMX (100 μ M) an.

B) Statistik des relaxierenden Effektes von 8-Br-cGMP auf den PE-induzierten Druckanstieg in den Hinterbeinen der unterschiedlichen Mauslinien. Dargestellt ist der PE-induzierte Druck nach 8-Br-cGMP-Stimulation in % des maximalen Drucks. Die Stimulation mit IBMX zur vollständigen Relaxation definiert den Nullwert. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl an Versuchstieren an. Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. 8-Br-cGMP relaxiert das Gefäßsystem der Hinterbeine der verschiedenen Mausmodelle im selben Ausmaß, ausgenommen den sm-cGKI-KO-Mäusen. ***, $p < 0,001$.

Diese Beobachtungen zeigen, dass (1.) die cGKI für die 8-Br-cGMP-vermittelte Relaxation von Gefäßen (Aorta, Gefäße des Hinterbeins) essentiell ist und (2.) der Effekt von 8-Br-cGMP unabhängig von Trpc-Kanälen, speziell Trpc1, Trpc3 und Trpc6, ist.

3.1.5 Effekt von Phenylephrin auf die Kontraktilität der *A. thoracalis*

Zusätzlich wurde der Effekt von PE auf die Kontraktion intakter Aortenringe, ohne Blockierung der eNOS durch L-NAME, untersucht. Durch die Abwesenheit von L-NAME bleibt ein relaxierender Tonus aufrechterhalten (Furchgott *et al.*, 1980). Die PE-induzierte Kontraktionskraft (3 μ M) in Aortenringen von Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen unterscheidet sich nicht signifikant, während die von sm-cGKI-KO-Mäusen signifikant erhöht ist (Abb. 25 A+B). Interessanterweise erhöht PE auch die Kontraktilität der Aortenringe von Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO- und Trpc1/3/6-KO-Mäusen signifikant (Abb. 25 B). Dieser Befund steht im Widerspruch zur Hypothese von Dietrich *et al.* (2005b), wonach die erhöhte Kontraktilität in der Aorta von Trpc6-KO-Mäusen auf eine erhöhte Expression von Trpc3 zurückzuführen ist. Führt man eine gepaarte Analyse durch, indem man jeweils die Kontraktionskraft von PE und PE+L-NAME einer Aorta ins Verhältnis setzt, erhält man dieselben signifikant unterschiedlichen Resultate (Abb. 26).



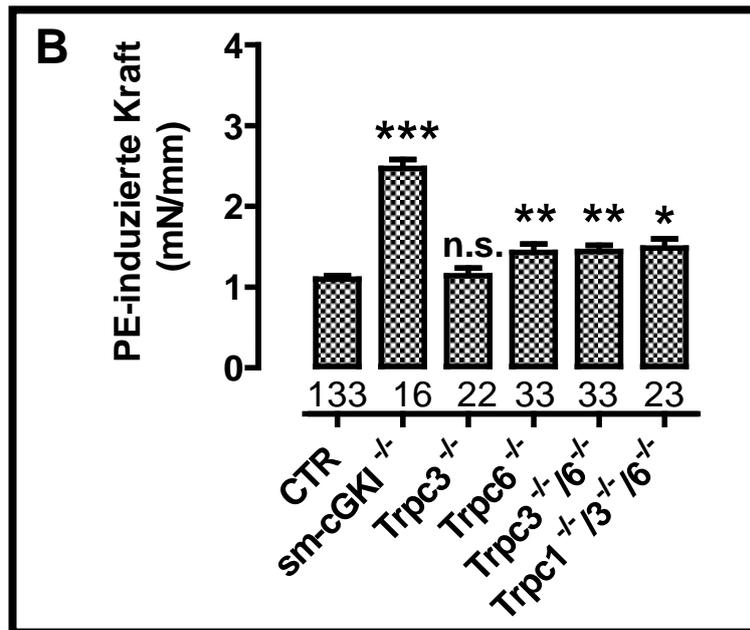


Abbildung 25: PE-induzierte Kraft in intakten murinen Aorten.

A) Originalaufzeichnungen des PE-induzierten Kraftanstiegs in Aortenringen von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Die Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (3 μ M) an. Die Spuren stammen aus Abbildung 20 A ohne L-NAME-Stimulation.

B) Statistik der PE-induzierten Kontraktion in unbeschädigten Aorten der untersuchten Mauslinien. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl der Versuche an (Anzahl Versuchstiere: Anzahl Versuche / 4). Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. Sm-cGKI-KO-, Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO- und Trpc1/3/6-KO-Mäuse zeigen eine signifikant erhöhte Kontraktionskraft nach PE Stimulation im Vergleich zur Kontrolle, Trpc3-KO-Mäuse nicht. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant.

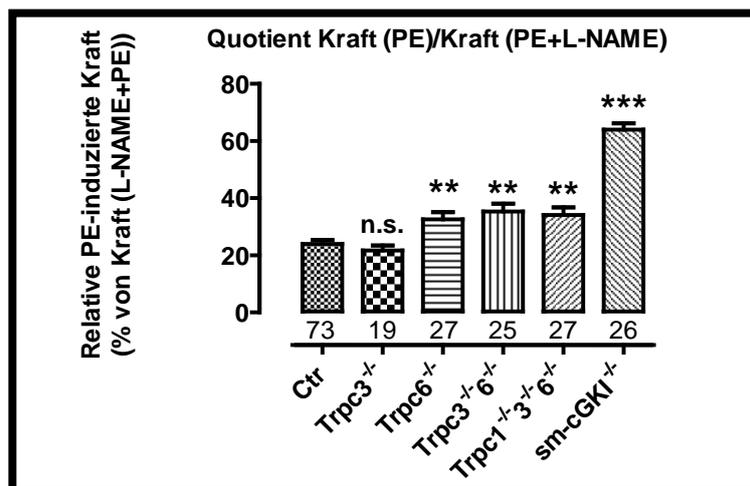


Abbildung 26: Relative PE-induzierte Kraft in intakten murinen Aorten.

Die Bildung des Quotienten aus PE-induzierter (3 μ M) Kraft und PE+L-NAME (100 μ M) induzierter Kraft für jede untersuchte Mauslinie, liefert dieselben signifikanten Resultate wie in Abbildung 24. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl der Versuche an (Anzahl Versuchstiere: Anzahl Versuche / 4). Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. n.s., nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$.

Zusammenfassend lassen sich die bisherigen Resultate wie folgt interpretieren: (1.) in der intakten Aorta gibt es einen relaxierenden Faktor, der von der glattmuskulären cGKI abhängig ist und (2.) die cGKI und Trpc-Kanäle (Trpc1, Trpc3 und Trpc6) sind im glatten Gefäßmuskel nicht funktionell gekoppelt.

3.1.6 Effekt von Carbachol auf die PE-vermittelte Kontraktion der *A. thoracalis*

Die unterschiedliche Kontraktionskraft nach PE-Stimulation der Aortenringe der verschiedenen Mauslinien deutet auf eine unterschiedlich starke endotheliale NO-Produktion, unter der Beteiligung des Trpc6-Kanals, hin. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde der Effekt von CCh auf die PE-induzierte (3 μ M) Kontraktion von Aortenringen aus Ctr-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO- und Trpc3/6-KO-Mäusen untersucht. CCh, als muskarinerges Agonist, führt in Endothelzellen über die Produktion von NO zur Relaxation (Furchgott *et al.*, 1980). Abbildung 27 zeigt deutlich, dass CCh die PE-vermittelte Kontraktion in Trpc6-KO- und Trpc3/6-KO-Mäusen weniger relaxiert als in Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass endotheliale Trpc6-Kanäle teilweise an der CCh-induzierten Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt sind.

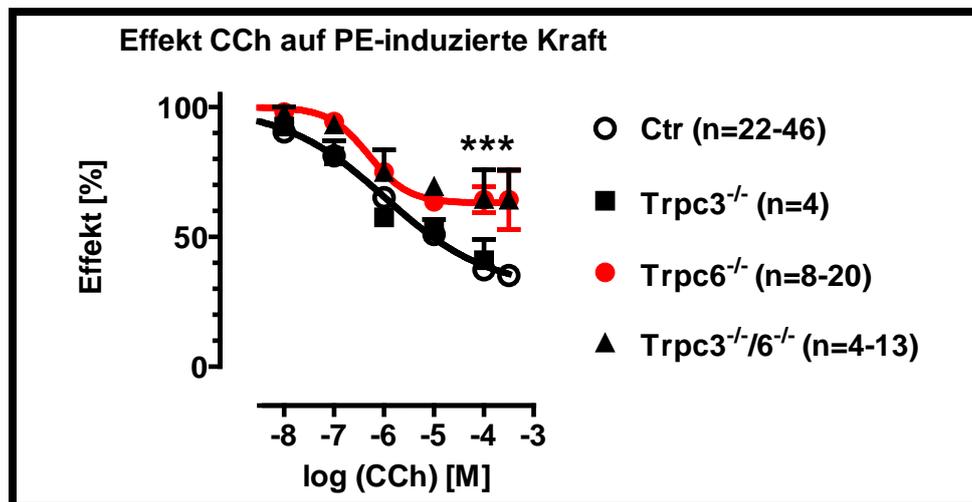


Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von CCh in Aortenringen unterschiedlicher Mauslinien.

Kumulative Applikation steigender CCh-Konzentrationen bei gleichzeitiger Gabe von PE (3 μ M). Verwendet wurden Aortenringe aus Ctr-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO- und Trpc3/6-KO-Mäusen. Punkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. Ziffern geben die Anzahl an Versuchen an (Anzahl Versuchstiere: Anzahl Versuche / 4). Die Punkte wurden mit sigmoidalen Kurven beschrieben. Datenpunkte der Kontrollen und Trpc6-KOs bei 100 μ M wurden mittels Student's t-Test analysiert. ***, $p < 0,001$.

3.2 Immunocytochemische Analyse der Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6

Abbildungen 25+27 zeigen, dass für eine vollständige Vasodilatation cGKI und Trpc6 notwendig sind. Um dies weiter aufzuklären, wurden immunocytochemische Experimente durchgeführt. Hierbei wurde die Expression von cGKI, Trpc3- und Trpc6-Kanälen in frisch isolierten Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen von Ctr-, cGKI-KO-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen mit Hilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern untersucht. Eine Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper befindet sich im Anhang.

3.2.1 Expression zellspezifischer Marker

Zur Identifizierung frisch isolierter glatter Muskelzellen und Endothelzellen wurden zellspezifische Marker verwendet. Bei dem EC-Marker handelte es sich um CD31, bei dem VSMC-Marker um α -Aktin. Abbildung 28 zeigt frisch isolierte EC (A) und VSMC (B) aus der Aorta von WT-Mäusen. Die Zellen wurden sowohl mit anti-CD31, als auch mit anti- α -Aktin inkubiert, um die Spezifität der Marker zu bestätigen (Doppel-Färbung). Die VSMC zeigt ein deutliches Signal (rot) für α -Aktin, keines für CD31 (grün) (Abb. 28 B). Bei den EC verhält es sich genau andersherum (Abb. 28 A). Aus der Beobachtung, dass es keine Doppelmarkierungen in den untersuchten Zelltypen gab, wurde gefolgert, dass die verwendeten Zellmarker jeweils selektiv VSMC und EC markieren. Dieses Ergebnis wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

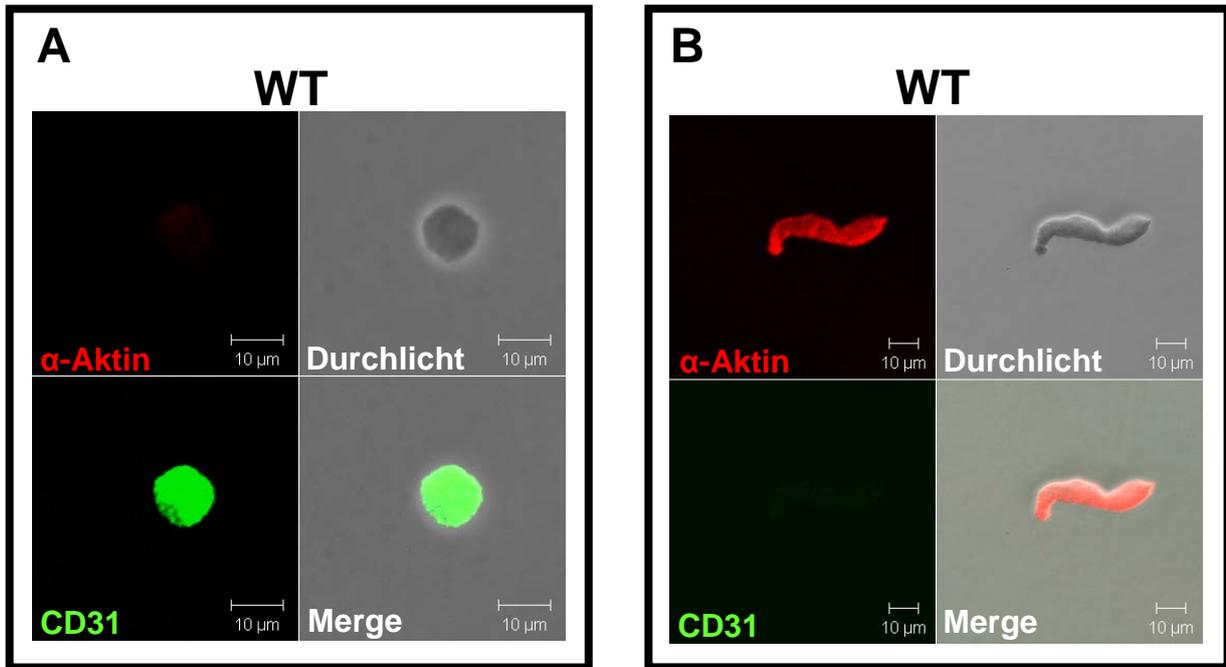


Abbildung 28: Analyse der Spezifität des Endothelzell- und Glattmuskelzell-Markers mittels Immunocytochemie.

A) Immunocytochemische Färbung einer frisch isolierten Endothelzelle aus der Aorta einer WT-Maus mit einem VSMC-Marker-spezifischen Antikörper (anti- α -Aktin) und einem EC-Marker-spezifischen Antikörper (anti-CD31) (Doppel-Färbung). Deutliches Signal für CD31 (grün), kein Signal für α -Aktin (=Endothelzell-spezifisch). Ergebnis wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

B) Immunocytochemische Färbung einer frisch isolierten Glattmuskelzelle aus der Aorta einer WT-Maus mit einem VSMC-Marker-spezifischen Antikörper (anti- α -Aktin) und einem EC-Marker-spezifischen Antikörper (anti-CD31) (Doppel-Färbung). Deutliches Signal für α -Aktin (rot), kein Signal für CD31 (=Glattmuskelzell-spezifisch). Ergebnis wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

3.2.2 Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten Endothelzellen der *A. thoracalis*

Für die Analyse der Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten EC wurden Ctr-, cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäuse verwendet. Dabei wurden Doppel-Färbungen mit dem EC-Marker-Antikörper (CD31; grün) und dem jeweiligen Zielprotein-Antikörper (rot) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch drei unabhängige Experimente bestätigt. Abbildung 29 zeigt deutliche Signale (rot) für die Expression von cGKI (A), Trpc3 (C) und Trpc6 (E) in den Endothelzellen (CD31-positiv) der Kontrolltiere. Endothelzellen aus den jeweiligen Knockoutmäusen zeigen keine Signale für das entsprechende Zielprotein (Abb. 29 B+D+F). Dies bestätigte die Spezifität der verwendeten Antikörper.

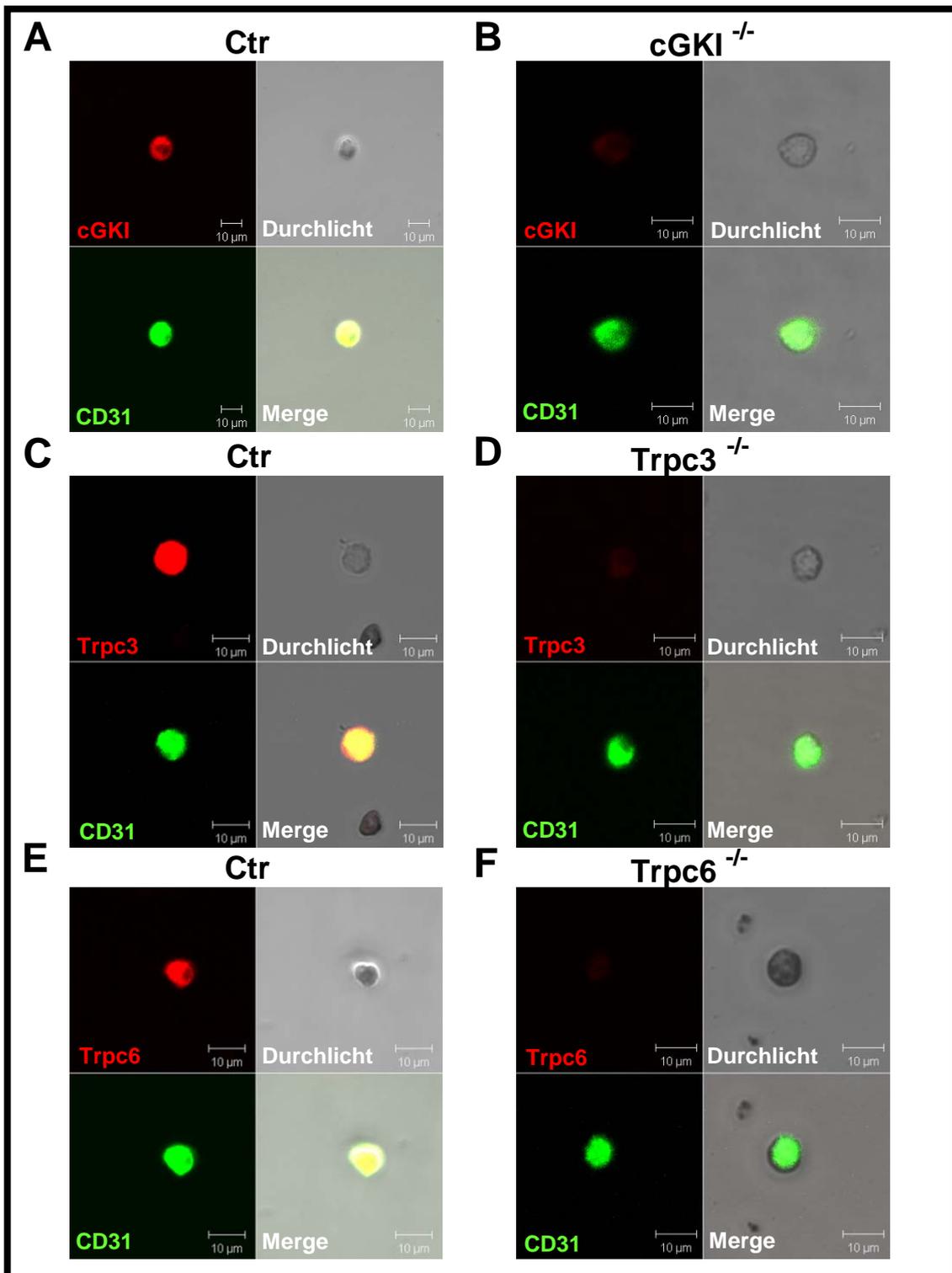


Abbildung 29: Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in Endothelzellen muriner Aorten.

A+B) Immunocytochemische Färbung isolierter EC aus je drei Ctr- und cGKI-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen CD31 und cGKI.

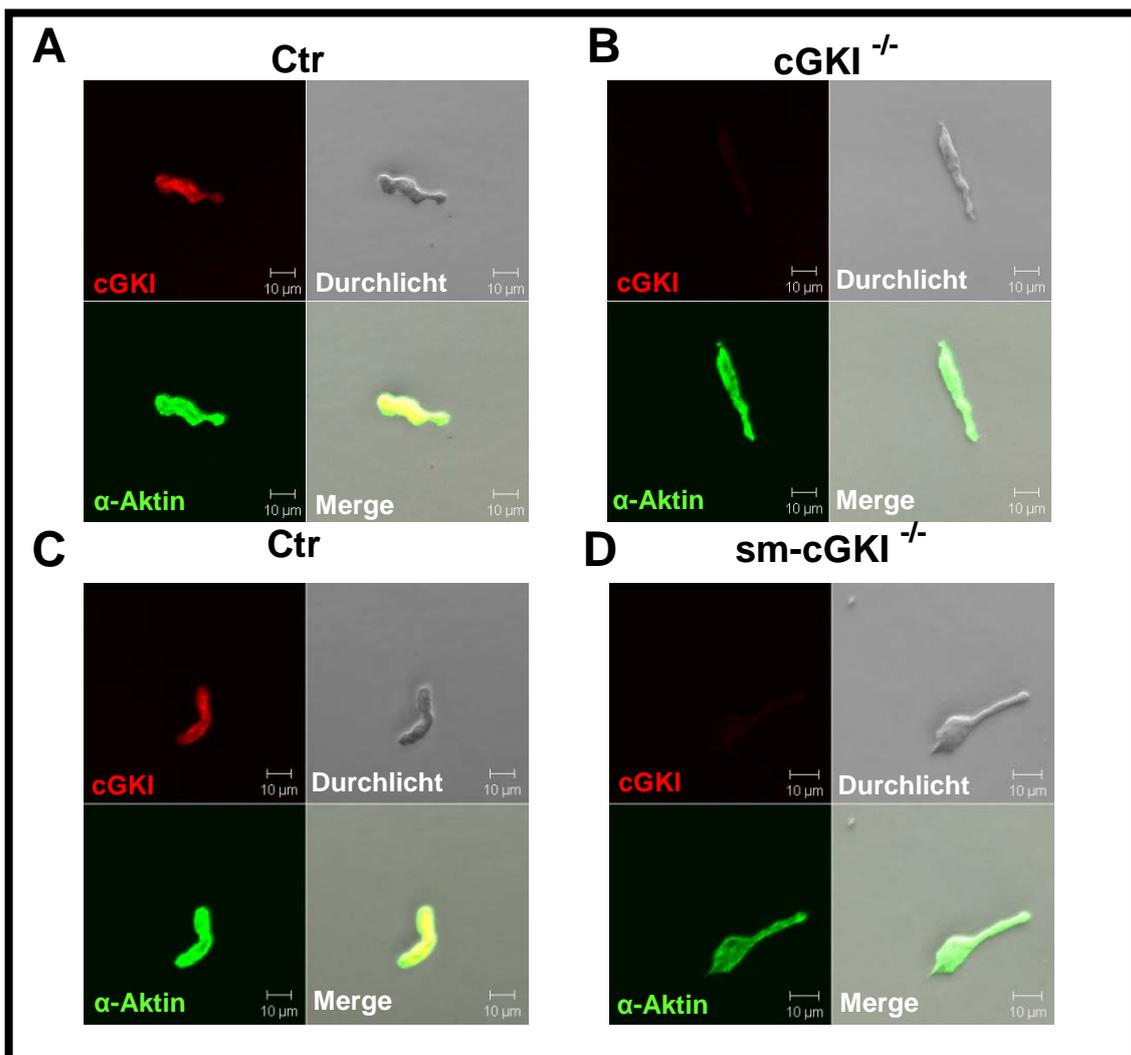
C+D) Immunocytochemische Färbung isolierter EC aus je drei Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen CD31 und Trpc3.

E+F) Immunocytochemische Färbung isolierter EC aus je drei Ctr- und Trpc6-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen CD31 und Trpc6.

Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

3.2.3 Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten glatten Muskelzellen der *A. thoracalis*

Für die Analyse der Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten VSMC wurden Ctr-, cGKI-KO-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäuse verwendet. Dabei wurden Doppel-Färbungen mit dem VSMC-Marker-Antikörper (α -Aktin; grün) und dem jeweiligen Zielprotein-Antikörper (rot) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch dreimalige Wiederholung der Experimente bestätigt. Abbildung 30 zeigt deutliche Signale (rot) für die Expression von cGKI (A+C) und Trpc3 (E) in den glatten Muskelzellen der Kontrolltiere, jedoch kein Signal für die Expression von Trpc6 (G). Glattmuskelzellen aus den jeweiligen Knockoutmäusen zeigen keine Signale für das jeweilige Zielprotein (Abb. 30 B+D+F+H), wodurch die Spezifität der verwendeten Antikörper bestätigt wurde.



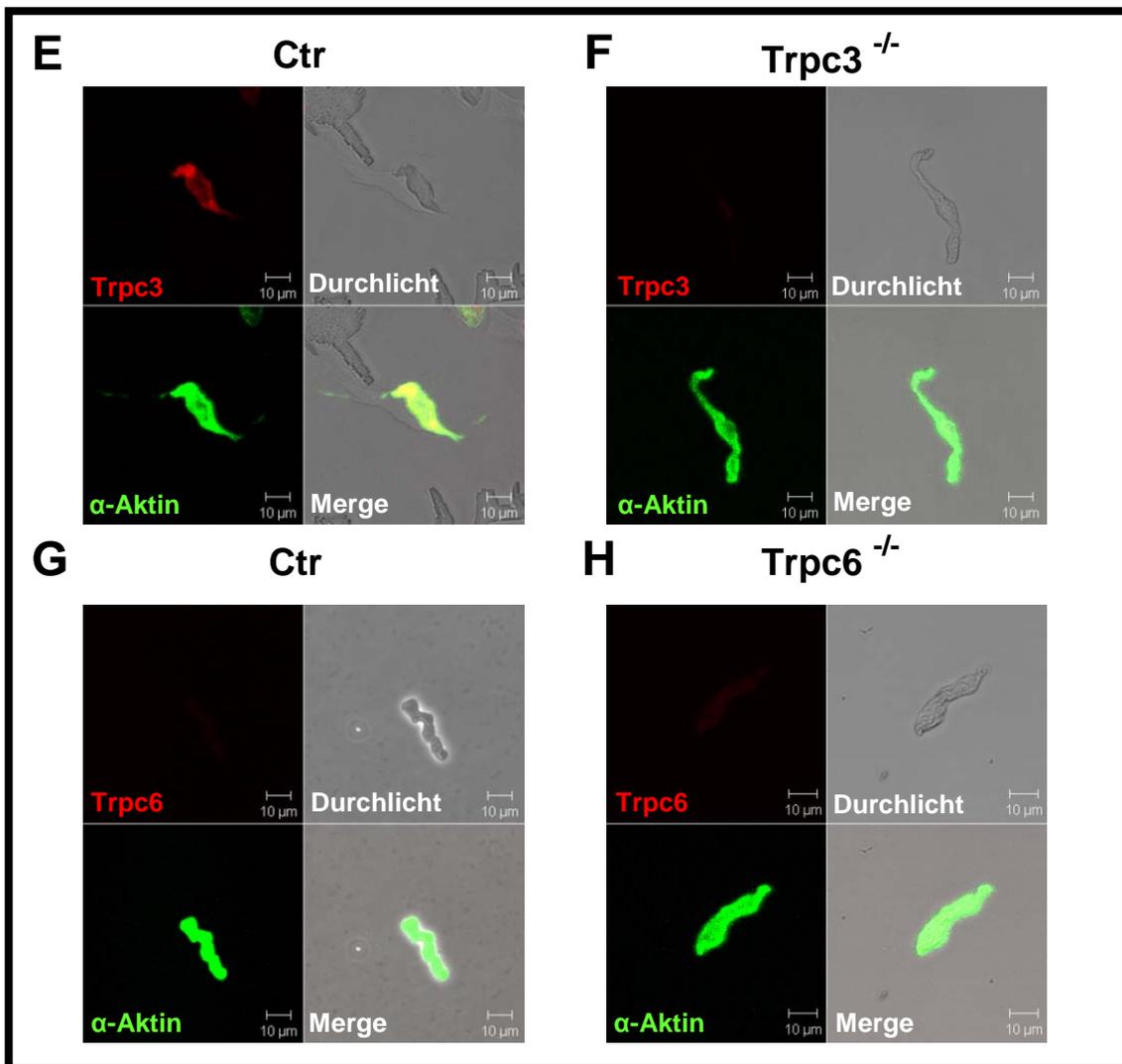


Abbildung 30: Expression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in glatten Gefäßmuskelzellen muriner Aorten.

A+B) Immunocytochemische Färbung isolierter VSMC aus je drei Ctr- und cGKI-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen α -Aktin und cGKI.

C+D) Immunocytochemische Färbung isolierter VSMC aus je drei Ctr- und sm-cGKI-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen α -Aktin und cGKI.

E+F) Immunocytochemische Färbung isolierter VSMC aus je drei Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen α -Aktin und Trpc3.

G+H) Immunocytochemische Färbung isolierter VSMC aus je drei Ctr- und Trpc6-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen α -Aktin und Trpc6.

Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

Diese Beobachtungen zeigen, dass der Trpc3-Kanal sowohl in frisch isolierten Endothelzellen, als auch in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, wohingegen der Trpc6-Kanal nur in frisch isolierten Endothelzellen exprimiert wird.

3.3 RT-PCR Analyse der Gesamt-RNS intakter und Endothel-befreiter Aorten von WT-Mäusen

Um das Ergebnis aus der immunocytochemischen Untersuchung zu bestätigen, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode um die RNS bestimmter Gene nachzuweisen. Hierbei wurde Gesamt-RNS aus intakten und Endothel-befreiten WT-Aorten isoliert. Es wurden spezifische Primer gegen Trpc3, Trpc6, HPRT (Standard), PECAM-1/CD31 (Endothelzell-Marker) und α -Aktin (Glattmuskelzell-Marker) eingesetzt. Das α -Aktin-Amplifikat ist sowohl in den intakten, als auch in den Endothel-befreiten Aorten zu sehen, während das PECAM-1-Amplifikat nur in den intakten Aorten detektierbar ist (Abb. 31 A). Dies lässt darauf schließen, dass das Endothel vollständig entfernt wurde. Trpc3 lässt sich in intakten und in Endothel-befreiten Aorten detektieren, Trpc6 ausschließlich in intakten Aorten (Abb. 31 A+B). HPRT zeigt in beiden Fällen ein deutliches Signal (Abb. 31 A). Diese Ergebnisse wurden mit drei voneinander unabhängigen Experimenten belegt.

Somit werden die Beobachtungen aus den immunocytochemischen Untersuchungen - Trpc3 wird in beiden Zelltypen, Trpc6 nur in Endothelzellen exprimiert - bestätigt.

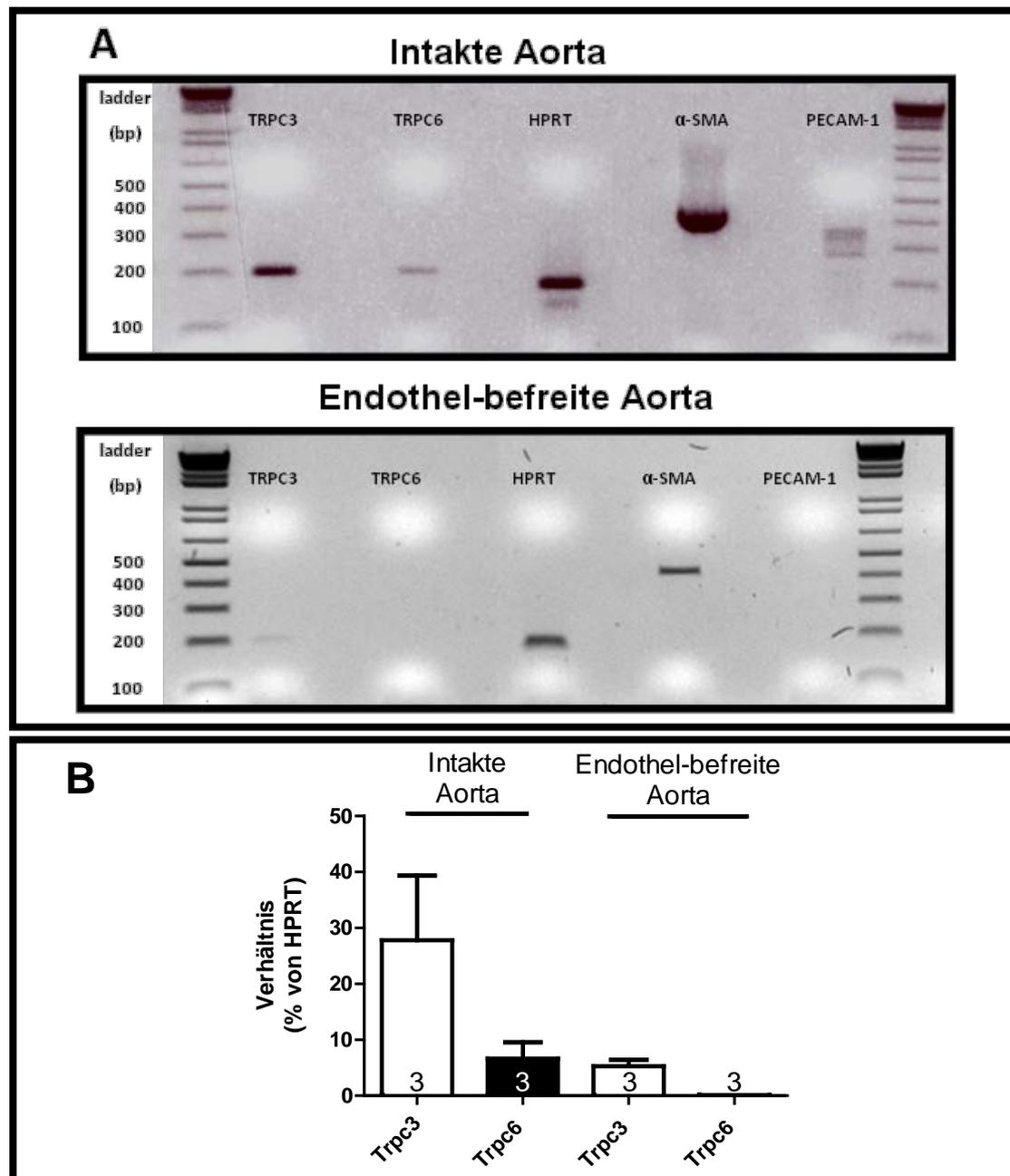


Abbildung 31: Analyse der Gesamt-RNS aus intakten und Endothel-befreiten WT-Aorten mittels RT-PCR.

A) Analyse der PCR-Produkte aus intakter bzw. Endothel-befreiter WT-Aorta mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für die PCR wurden Primer-Paare gegen HPRT (Standard), α -SMA (Glattmuskel-Marker), PECAM-1 (Endothelzell-Marker), *Trpc3* und *Trpc6* eingesetzt. Die Sequenzen befinden sich im Anhang. In der intakten Aorta sind Signale für α -SMA und PECAM-1 zu sehen, während in der Endothel-befreiten Aorta das PECAM-1-Signal fehlt. Dies bestätigt die vollständige Entfernung des Endothels. Die intakte Aorta zeigt außerdem Signale für *Trpc3* und *Trpc6*. In der Endothel-befreiten Aorta ist lediglich *Trpc3* nachweisbar. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

B) Semiquantitative Bestimmung. Die Werte berechnen sich als Verhältnis aus den Signalen von *Trpc3* bzw. *Trpc6* und HPRT. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl der Versuche (je Versuch 12-15 Versuchstiere) an.

3.4 Intrazelluläre Calcium-Messung $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit vasoaktiven Pharmaka

VSMC und EC zeigen nach Stimulierung mit Hormonen einen Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$, der im Falle der VSMC zur Kontraktion führt und im Falle der EC die eNOS und somit die NO-Produktion (Dudzinski *et al.*, 2006) aktiviert. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Trpc6-Kanal an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen und somit an der NO-Synthese beteiligt ist. Zur Stützung dieser Hypothese wurden Änderungen in intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ in frisch isolierten Endothel- und Glattmuskelzellen nach Stimulation mit vasoaktiven Stoffen (CCh, PE) untersucht. Zusätzlich wurde erneut eine mögliche funktionelle Kopplung zwischen Trpc6-Kanälen und dem cGMP/cGKI-Signalweg analysiert. Dabei wurde der Effekt von 8-Br-cGMP auf Agonisten-induzierte Änderungen der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. EC und VSMC wurden aus den Aorten von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen isoliert.

3.4.1 Calcium-Messung in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der *A. thoracalis*

Die Stimulation frisch isolierter VSMC mit PE (30 μ M) erhöht signifikant die intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ in allen untersuchten Mausmodellen (Abb. 32 A+B). Die unmittelbar folgende Applikation von 8-Br-cGMP (300 μ M) - zur Aktivierung der cGKI - führt zu einer vergleichbaren Reduktion der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ in den drei Mauslinien (Abb. 32 A+B).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass sowohl Trpc3, als auch Trpc6 keinen Einfluss auf den α 1-adrenerg-vermittelten intrazellulären Calcium-Anstieg in VSMC haben und diese beiden Kanäle auch nicht durch die cGKI reguliert werden.

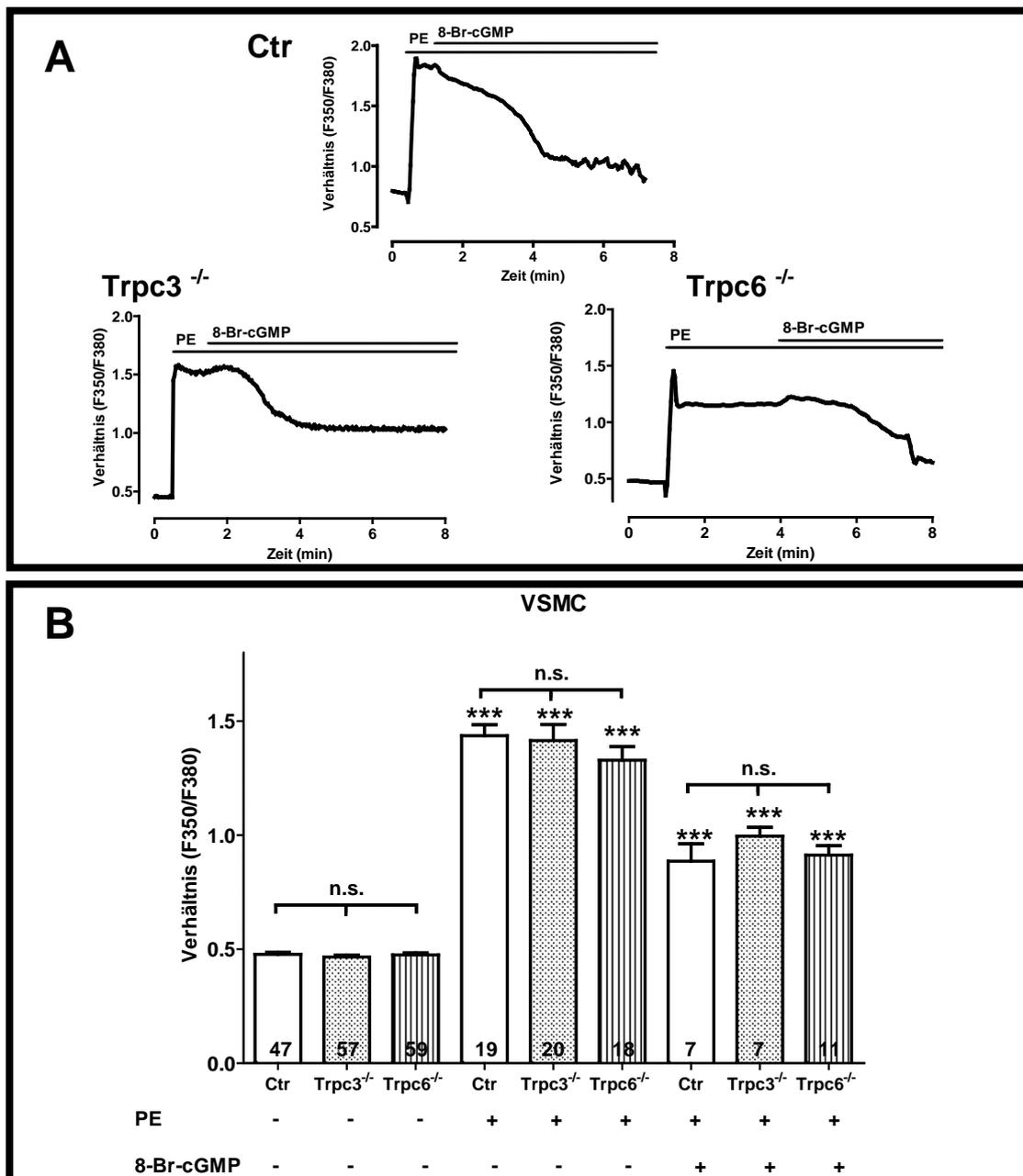


Abbildung 32: Intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Gefäßmuskelzellen muriner Aorten.

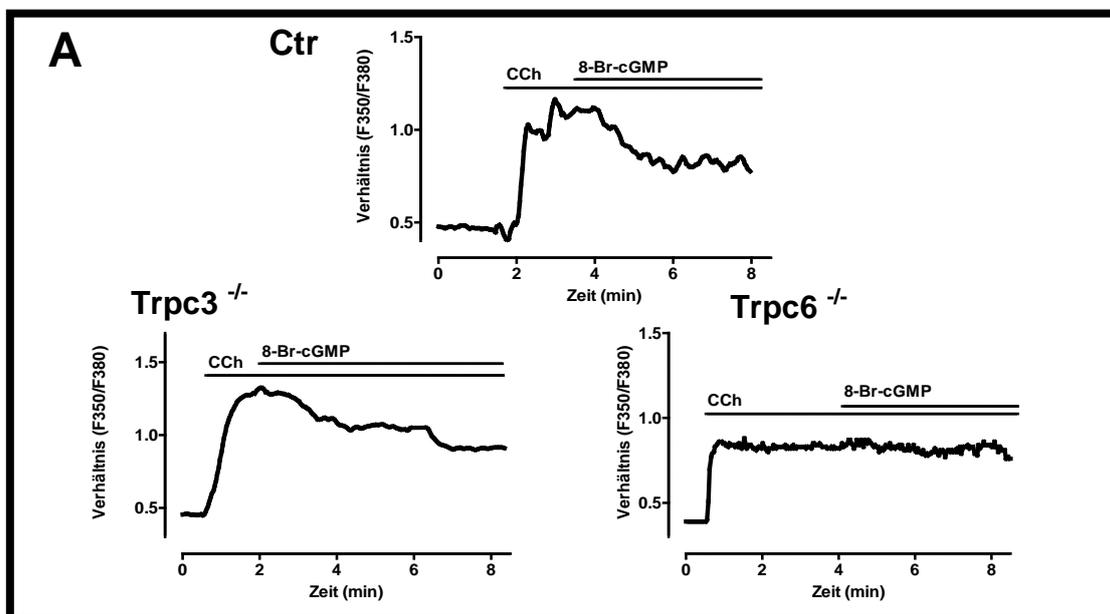
A) Originalaufzeichnungen der Messungen intrazellulärer $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Muskelzellen der Aorta von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von PE (30 μ M) und 8-Br-cGMP (300 μ M) an.

B) Statistik - Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensität (bei 510 nm; F350/F380) bei wechselnden Anregungswellenlängen (350 nm und 380 nm). Gemessen wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Gefäßmuskelzellen von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von PE bzw. von PE und 8-Br-cGMP. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl an untersuchten Zellen an. Die Zellen stammen aus 18-27 Mäusen. Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert. PE führt in Glattmuskelzellen aller Mausmodelle zu einem vergleichbaren, signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, 8-Br-cGMP reduziert diesen in allen Mauslinien im selben Ausmaß signifikant. ***, $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant.

3.4.2 Calcium-Messung in frisch isolierten Endothelzellen der *A. thoracalis*

Die Stimulation endothelialer Zellen von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen mit dem muskarinergen Agonist CCh (30 μ M) führt zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, jedoch ist die $[\text{Ca}^{2+}]$ in den Zellen des Trpc6-KOs, im Vergleich zu den Kontrollen und Trpc3-KOs, signifikant geringer (Abb. 33 A+B).

Nach unmittelbar folgender Aktivierung der cGKI durch 8-Br-cGMP (300 μ M) sinkt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration signifikant in Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen, jedoch nicht in den Zellen der Trpc6-KO-Mäuse (Abb. 33 A+B).



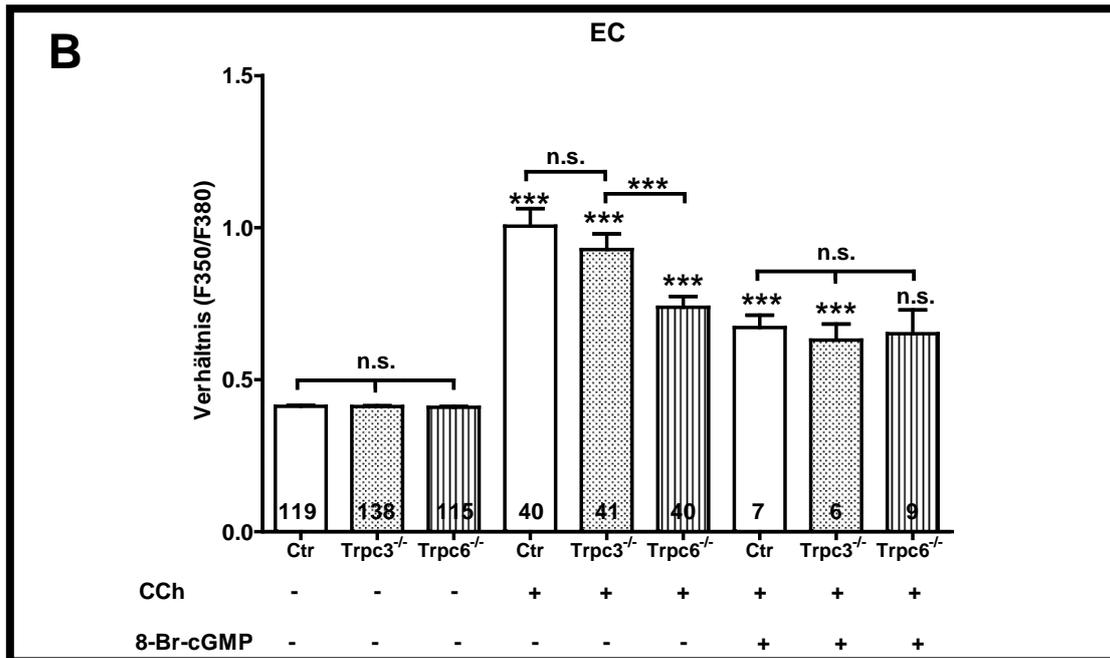


Abbildung 33: Intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen muriner Aorten.

A) Originalaufzeichnungen der Messungen intrazellulärer $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen der Aorta von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen. Balken geben Zugabezeitpunkt und -dauer von CCh (30 μ M) und 8-Br-cGMP (300 μ M) an.

B) Statistik - Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensität (bei 510 nm; F350/F380) bei wechselnden Anregungswellenlängen (350 nm und 380 nm). Gemessen wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von CCh bzw. von CCh und 8-Br-cGMP. Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, Ziffern geben die Anzahl an untersuchten Zellen an. Die Zellen stammen aus 18-24 Mäusen. Die Daten wurden mittels one way ANOVA (Bonferroni Test) analysiert.

CCh führt in Endothelzellen aller Mausmodelle zu einem signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, jedoch ist die $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen des Trpc6-KOs im Vergleich zu den Kontrollen und Trpc3-KOs signifikant geringer. Die unmittelbar folgende Stimulation mit 8-Br-cGMP führt zu einer signifikanten Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen von Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen, jedoch nicht in den Zellen der Trpc6-KO-Mäuse. ***, $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant.

Diese Ergebnisse schlagen vor, dass für einen vollständigen, CCh-induzierten, intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg der Trpc6-Kanal in Endothelzellen der thorakalen Aorta exprimiert sein muss und, aufgrund des fehlenden Effektes von 8-Br-cGMP in EC von Trpc6-KO-Mäusen, ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen dem cGMP/cGKI Signalweg und Trpc6-Kanälen in Endothelzellen der thorakalen Aorta besteht.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Trpc-Kanäle 1,3 und 6 keine Rolle sowohl bei der α 1-adrenerg-induzierten Kontraktion, als auch bei der cGKI-vermittelten Relaxation im glatten Muskel der Aorta und der Gefäße der Hinterbeine der Maus haben. Überraschenderweise lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Trpc6-Kanal an dem Agonisten-vermittelten Ca^{2+} -Anstieg in EC und somit an der endothelialen NO-Produktion beteiligt sein kann.

4.1 Effekte von PE, L-NAME und CCh auf die Kontraktilität der *Aorta thoracalis* und des Gefäßsystems der Hinterbeine in den verschiedenen Mausmodellen

Bei der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur sollen Trpc-Kanäle sowohl den Rezeptor-aktivierten, als auch den Speicher-induzierten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE, SOCE; Abb. 3) vermitteln (Gonzalez-Cobos *et al.*, 2010) und somit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen, welche für die Kontraktion bzw. für die Wiederauffüllung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher notwendig ist (Earley *et al.*, 2010). Besonders Trpc1, Trpc3 und Trpc6 sind an Rezeptor-aktivierten Ca^{2+} -Einströmen in Glattmuskelzellen der Mesenterialarterie (Saleh *et al.*, 2006), der Gehirnschlagader (Reading *et al.*, 2005) oder der Pfortader (Inoue *et al.*, 2001) beteiligt. In diesen *in vitro*- und Zellkulturstudien wurden Anti-Sense- bzw. Antikörper-Techniken eingesetzt, um Trpc-Kanäle auszuschalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Aortenringe bzw. das Gefäßsystem der Hinterbeine von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO, Trpc3/Trpc6-KO- und Trpc1/Trpc3/Trpc6-KO-Mäusen für Kontraktionsstudien verwendet, um den Einfluss der Trpc-Kanäle auf die Kontraktion zu untersuchen.

Die Stimulation der Aortenringe mit dem α 1-adrenergen Agonisten PE und dem NOS-Inhibitor L-NAME bzw. des Gefäßsystems der Hinterbeine mit PE zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Mauslinien. Schmidt *et al.* (2010) zeigten dies ebenfalls für die PE-induzierte Kontraktion von Aortenringen aus Trpc1-KO-Mäusen. Eine erhöhte Kontraktilität in Trpc6-KO-Mäusen nach PE-Stimulation konnte unter diesen Bedingungen nicht bestätigt werden (Dietrich *et al.*, 2005b).

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass, in Abwesenheit einer NO-vermittelten Relaxation, Trpc1-, Trpc3- und Trpc6-Kanäle nicht an der α 1-adrenerg-vermittelten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sind.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Studien, in denen die Beteiligung von Trpc-Kanälen an der α 1-adrenergen Kontraktion der glatten Muskulatur gezeigt wurde (Watanabe *et al.*, 2008). Für diesen Widerspruch kommen folgende Erklärungsmöglichkeiten in Betracht: (1.) Einer der ausgeschalteten Trpc-Kanäle wird durch Überexpression eines anderen Trp-Kanals im glatten Muskel funktionell ersetzt. In der Trpc1-KO-Maus konnte jedoch keine Hochregulierung von Trpc2-7 gezeigt werden (Dietrich *et al.*, 2007). (2.) In der vorliegenden Arbeit wurde der α 1-adrenerge Agonist PE zur Kontraktion der glatten Muskulatur verwendet und nicht etwa Ang II, für welches auch eine Beteiligung von Trpc1 und Trpc6 an der Kontraktion beschrieben wurde (Saleh *et al.*, 2006). (3.) In dieser Arbeit wurden *in vivo* Experimente und *in vitro* Experimente mit Muskelzellen aus der Aorta der entsprechenden Knockout-Mauslinien und nicht etwa mit Muskelzellen aus der Mesenterialarterie (Saleh *et al.*, 2006), der Gehirnschlagader (Reading *et al.*, 2005) oder der Pfortader (Inoue *et al.*, 2001) durchgeführt. (4.) Es wurden gentechnisch-veränderte Mauslinien, in denen das Gen des jeweiligen Proteins gezielt ausgeschaltet wurde, verwendet. Dies hat den Vorteil, dass das Gen erst gar nicht transkribiert und anschließend translatiert werden kann. Beim Einsatz von Antikörpern kann es zu unspezifischen oder unvollständigen Bindungen kommen. Der Einsatz von siRNA birgt die Gefahr, dass das Experiment länger dauert, da die siRNA erst an ihren Wirkort gelangen und dort aktiv werden muss. Während dieser Zeit können kultivierte VSMC ihren Phänotyp ändern (Gomez *et al.*, 2012), wobei sich auch das Expressionsmuster von Trpc-Kanälen ändern könnte.

Endothelial gebildetes NO führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und wirkt somit der Hormon-induzierten Kontraktion entgegen (Furchgott *et al.*, 1980; Moncada *et al.*, 2006). In Aortenringen von glattmuskel-spezifischen cGKI-KO-Mäusen mit intaktem Endothel und ohne Inhibierung der NO-Produktion kontrahiert PE den Muskel stärker als in der Kontrolle. Ähnliches konnte für die α -adrenerge Stimulation der Aortenringe von eNOS-KO-Mäusen gezeigt werden (Kojda *et al.*, 1999).

Interessanterweise erhöhte PE, in Abwesenheit von L-NAME, auch die Kontraktionskraft der Aortenringe von Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO- und Trpc1/3/6-KO-

Mäusen signifikant, jedoch nicht im selben Umfang wie in den sm-cGKI-KO-Mäusen. Die erhöhte Kontraktilität steht im Widerspruch zur Hypothese von Dietrich et al. (2005b), wonach die erhöhte Kontraktilität in der Aorta von Trpc6-KO-Mäusen auf eine erhöhte Expression von Trpc3 zurückzuführen ist.

Mögliche Erklärungen dafür, dass PE in Trpc6-KO-Mäusen nicht dieselbe Kontraktionskraft hervorruft wie in den sm-cGKI-KO-Mäusen, sind (1.) das Vorhandensein der glattmuskulären cGKI (Pfeifer et al., 1998) in Trpc6-KO-Mäusen und (2.) eine zusätzliche durch mechanische Dehnung der Aortenringe induzierte NO-Produktion (Balligand et al., 2009).

Um zu belegen, dass der Trpc6-Kanal an der Endothel-vermittelten Vasodilatation beteiligt ist, wurde der Effekt von CCh auf die PE-induzierte Kontraktion von Aortenringen aus Ctr-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO- und Trpc3/6-KO-Mäusen untersucht. CCh, als muskarinerg Agonist, führt in Endothelzellen über die Produktion von NO zur Relaxation (Furchgott et al., 1980). Es konnte gezeigt werden, dass CCh die PE-vermittelte Kontraktion in Trpc6-KO- und Trpc3/6-KO-Mäusen schwächer relaxiert als in Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen. Dieser Befund bestärkt die Aussage, dass endotheliale Trpc6-Kanäle teilweise an der CCh-induzierten Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt sind.

Überraschenderweise wurde nur in der Aorta, nicht aber im Gefäßsystem der Hinterbeine ein Einfluss von systemisch-generiertem NO beobachtet. Diese Beobachtung kann durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklärt werden. Im Myograph wird die Aorta vorgedehnt, um den maximalen Effekt der α 1-adrenergen Stimulation zu erfassen. Im Perfusionssystem war eine entsprechende „Vordehnung“ aufgrund eines unterschiedlichen Ruhedrucks (d.h. Ruhe-Durchfluss) nicht notwendig, da die maximale Antwort auf die α 1-adrenerge Stimulation in diesem System unabhängig vom Anfangsdruck war (Abb. 10). In Untersuchungen, in denen im Gefäßsystem der Hinterbeine der myogene Tonus registriert wurde, d.h. bei entsprechendem Perfusionsdruck von etwa 100 mmHg und ohne α 1-adrenerge Stimulation, konnte ein Einfluss von systemisch-generierten NO gezeigt werden (Brandes et al., 2000). Die Agonisten-induzierte Aktivierung der NO-Produktion (Relaxation) im Hinterbein-System und in der Aorta war dagegen in etwa gleich (Abb.

11 + 16). Diese Befunde lassen vermuten, dass im Hinterbein nach α 1-adrenerger Stimulation die spontane NO-Produktion im Vergleich zur Aorta stark vermindert ist. Die bisherigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die glattmuskuläre cGKI und Trpc6-Kanäle an der Regulation der NO-vermittelten Relaxation beteiligt sind.

4.2 Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs von Trpc-Kanälen und dem cGMP/cGKI Signalweg in glatten Gefäßmuskelzellen

Neuere Studien postulieren, dass der cGMP/cGKI Signalweg die Aktivität von Trpc-Kanälen, speziell Trpc1, Trpc3 und Trpc6, reguliert (Chen *et al.*, 2009; Kwan *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2008). Zur Bestätigung dieses Zusammenhangs wurde der Effekt von 8-Br-cGMP auf PE-stimulierte Aortenringe bzw. Gefäße der Hinterbeine von Ctr-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO-, Trpc3/Trpc6-KO- und Trpc1/Trpc3/Trpc6-KO-Mäusen untersucht.

Die Konzentration für 8-Br-cGMP wurde so gewählt, dass es nicht zur Kreuzaktivierung der Proteinkinase A (PKA) kam (Worner *et al.*, 2007). 8-Br-cGMP reduzierte die PE+L-NAME-induzierte Kontraktionskraft bzw. den PE-vermittelten Druckanstieg in allen Mausmodellen im selben Ausmaß, ausgenommen in den sm-cGKI-KO-Mäusen. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass (1.) die cGKI für die 8-Br-cGMP-vermittelte Relaxation von Gefäßen (Aorta, Hinterbeingefäße) essentiell ist (Pfeifer *et al.*, 1998) und (2.) der Effekt von 8-Br-cGMP unabhängig von Trpc-Kanälen, speziell Trpc1, Trpc3 und Trpc6, ist. Somit besteht kein funktioneller Zusammenhang zwischen Trpc-Kanälen und dem NO/cGMP/cGKI Signalweg in glatten Muskelzellen. Dieses Postulat steht im scheinbaren Widerspruch zu den oben angeführten Untersuchungen. Dieser Widerspruch könnte damit erklärt werden, dass der cGKI-Signalweg nur in einzelnen untersuchten Muskeltypen (zum Beispiel der Karotis (Chen *et al.*, 2009)) abhängig von Trpc-Kanälen ist, die aber offenbar keinen signifikanten Anteil an der Regulation des peripheren Widerstandes im Hinterbein oder des Tonus der Aorta haben.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Proteinexpression von cGKI, Trpc3 und Trpc6 in frisch isolierten Glattmuskel- und Endothelzellen aus der Aorta von cGKI-KO-, sm-cGKI-KO-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen und den jeweiligen Kontrolltieren immunocytochemisch untersucht. Abramowitz *et al.* (2009) zeigen in

ihrem Trpc-Kanal Überblicksartikel, dass Trpc3 und Trpc6 sowohl in glatten Muskelzellen, als auch in Endothelzellen exprimiert werden. Auch die cGKI kommt in beiden Zelltypen vor (Draijer *et al.*, 1995; Feil *et al.*, 2002).

Zur Identifizierung der beiden Zelltypen wurden spezifische Marker verwendet. Die VSMC wurden mit Hilfe von α -Aktin (Skalli *et al.*, 1989), die EC mit Hilfe von PECAM-1 (Muller *et al.*, 2002) ausgemacht. Interessanterweise ließ sich Trpc6 nur in Endothelzellen nachweisen, jedoch nicht in glatten Muskelzellen. Die cGKI und Trpc3 konnten in beiden Zelltypen nachgewiesen werden. Die verschiedenen Proteine ließen sich nicht in den jeweiligen KOs nachweisen, was für eine hohe Spezifität der Antikörper spricht.

Somit verdeutlicht dieses Ergebnis, dass es in glatten Muskelzellen keinen funktionellen Zusammenhang zwischen Trpc, genauer Trpc6, und der cGKI geben kann, da Trpc6 nicht in Glattmuskelzellen der Aorta exprimiert wird. Die Analyse von Gesamt-RNS aus intakten und Endothel-befreiten Aorten aus WT-Mäusen bestätigte diese Aussage. In intakten Aorten waren auf RNS-Ebene sowohl Trpc3, als auch Trpc6 detektierbar, während in Aorten, in welchen das Endothel vorsichtig mechanisch entfernt wurde, nur Trpc3 nachweisbar war.

Des Weiteren zeigten Untersuchungen der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in VSMC von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen keine Unterschiede zwischen den Mauslinien nach der Stimulation mit PE und PE+8-Br-cGMP. Die Stimulation glatter Muskelzellen mit PE führte in allen drei Mausmodellen zu vergleichbaren signifikanten Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$, welches für die Kontraktion der Muskulatur notwendig ist (Berridge *et al.*, 2000). Dies verdeutlicht erneut, dass die Trpc3- und Trpc6-Kanäle nicht an der α 1-adrenerg-vermittelten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sind. Die anschließende Stimulation mit 8-Br-cGMP führte in allen Mausmodellen zu vergleichbaren, signifikanten Reduktionen der $[Ca^{2+}]_i$. Die durch 8-Br-cGMP aktivierte cGKI führt unter anderem zur Schließung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Sausbier *et al.*, 2000) und zur Blockierung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (Schlossmann *et al.*, 2000), wodurch letztlich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt.

4.3 Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs von Trpc-Kanälen und dem cGMP/cGKI Signalweg in Endothelzellen

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass der Trpc6-Kanal an der Regulation der NO-Synthese im Gefäßendothel der Aorta beteiligt ist. Die Aktivierung des Trp-Kanals in EC durch Rezeptor-Stimulation oder Dehnung führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom. Dieses Ca^{2+} steuert als sekundäre Botenstoff die endotheliale NO-Synthase, welche die Produktion von NO katalysiert (Dudzinski *et al.*, 2006). Eine ähnliche Regulation konnte bereits für den Trpc4-Kanal gezeigt werden (Freichel *et al.*, 2001). Sowohl die Acetylcholin (ACh)-induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen, kultivierten Endothelzellen von Trpc4-KO-Mäusen, als auch die ACh-vermittelte Vasodilatation der Aortenringe von Trpc4-KO-Mäusen waren, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant reduziert. Auch der TrpV4-Kanal scheint an der Ca^{2+} -vermittelten NO-Produktion, welche letztlich zur Relaxation führt, beteiligt zu sein (Sonkusare *et al.*, 2012).

Um die Beteiligung von Trpc6-Kanälen zu bestätigen, wurden Änderungen in der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ in frisch isolierten Endothelzellen nach Stimulation mit CCh untersucht. Zusätzlich wurde erneut eine mögliche funktionelle Kopplung zwischen Trpc-Kanälen und dem cGMP/cGKI Signalweg analysiert. Dazu wurde der Effekt von 8-Br-cGMP auf Agonisten-induzierte Änderungen der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ gemessen. EC wurden aus den Aorten von Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen isoliert. Die Stimulation von Endothelzellen mit CCh führt in allen Mausmodellen zu einem signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, jedoch war der Anstieg in den Trpc6-KO-Mäusen, im Vergleich zu den Ctr und Trpc3-KOs, signifikant geringer. Dies bestätigt die Hypothese, dass der über DAG aktivierte Trpc6-Kanal (Hofmann *et al.*, 1999b) für den Calcium-Einstrom in Endothelzellen notwendig ist.

Die Stimulation der ECs mit 8-Br-cGMP führte in den Trpc6-KOs nicht zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Signals, was einen funktionellen Zusammenhang zwischen der cGKI und dem Trpc6-Kanal in Endothelzellen vermuten lässt. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass in Endothelzellen der Aorta ein mechano-sensitiver, nicht-selektiver Kationen-Kanal am Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom beteiligt ist und dieser durch die cGMP-aktivierte cGKI negativ reguliert wird, wodurch letztlich weniger das für die Relaxation notwendige NO gebildet wird (Kwan *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2000) (Abb. 34).

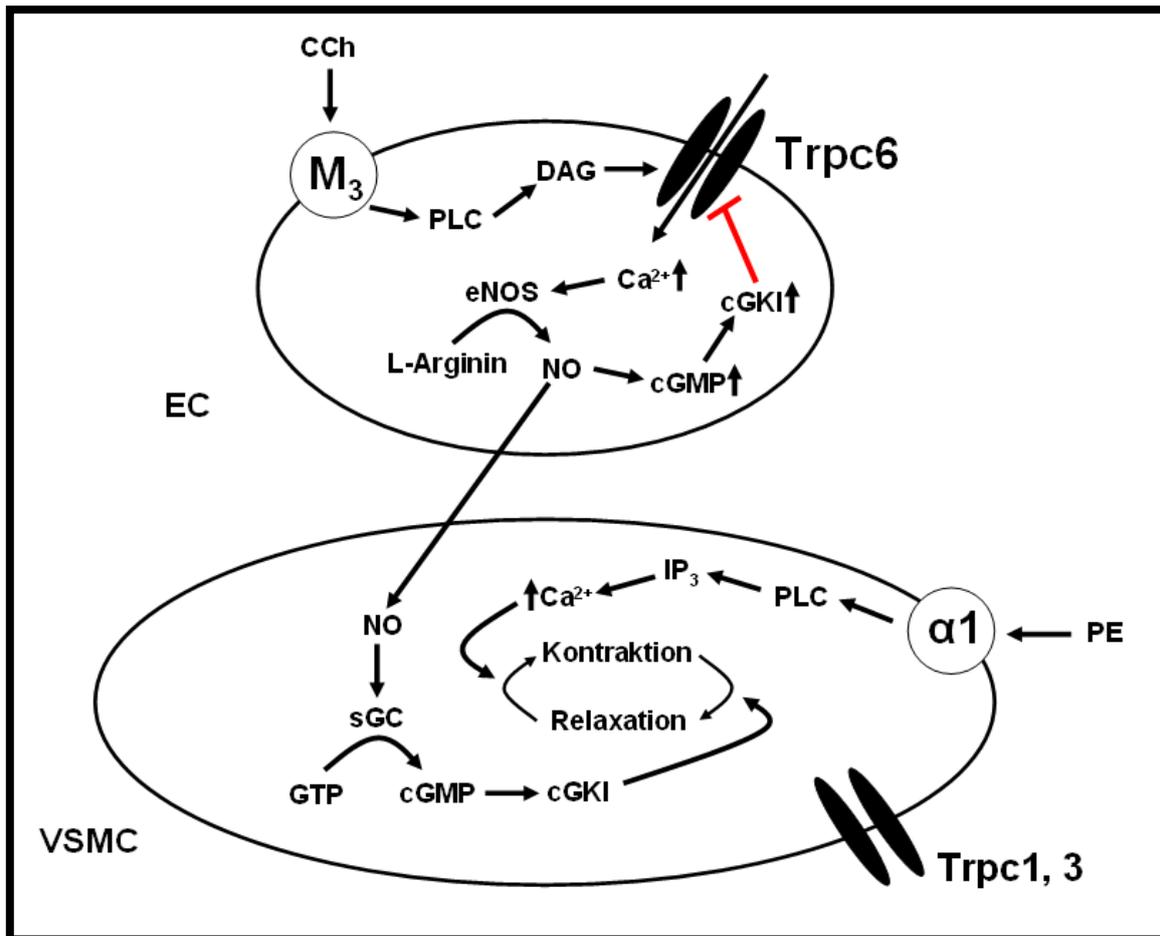


Abbildung 34: Rolle des cGMP/cGKI Signalweges und des endothelialen Trpc6-Kanals in der Regulation des vaskulären Tonus.

Die Aktivierung des muskarinergen Rezeptors durch CCh führt zur Bildung von DAG, welches endotheliale Trpc6-Kanäle aktiviert. Das einströmende Ca²⁺ aktiviert die eNOS, welche die Bildung von NO katalysiert. Dieses induziert die Produktion von cGMP sowohl in der EC, als auch in der VSMC. In der EC aktiviert cGMP die cGKI, welche hemmend auf Trpc6-Kanäle wirkt. Dadurch kommt es zu einem verminderten Ca²⁺-Einstrom, wodurch die Relaxation gehemmt wird.

In der VSMC wird ebenfalls die cGKI aktiviert, welche die Relaxation der VSMC einleitet. Dieser steht die α1-adrenerg-induzierte Kontraktion gegenüber.

Im glatten Muskel sind Trpc1-, Trpc3- und Trpc6-Kanäle nicht an der α1-adrenerg-vermittelten Kontraktion beteiligt und auch nicht mit der cGKI funktionell gekoppelt. Überdies hinaus wird der Trpc6-Kanal nicht in VSMC exprimiert (modifiziert nach Yao *et al.*, 2000).

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Trpc-Kanäle 1, 3 und 6 für die α1-adrenerge Kontraktion nicht notwendig sind und es in frisch isolierten glatten Muskelzellen keinen funktionellen Zusammenhang zwischen dem cGMP/cGKI Signalweg und Trpc-Kanälen gibt. Des Weiteren wird deutlich, dass die glattmuskuläre cGKI für die Vasodilatation essentiell ist, Trpc6-Kanäle für den für die

endotheliale NO-Produktion wichtigen intrazellulären Calcium-Anstieg - durch CCh-Stimulation induziert - notwendig sind und diese durch die endotheliale cGKI gehemmt werden. Somit ist ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen der cGKI und dem Trpc6-Kanal in Endothelzellen der Aorta durchaus denkbar.

Fortführende Untersuchungen, wie die Messung der endothelialen NO-Produktion nach muskarinergem Stimulation der EC von Trpc6-KO-Mäusen mittels NO-Meter oder Chemilumineszenz (Guo *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 2005), könnten eine direkte Beteiligung der Trpc6-Kanäle an der NO-Produktion belegen.

Ebenso könnten weitere Versuche den funktionellen Zusammenhang zwischen der cGKI und Trpc6 in ECs direkt belegen. Möglichkeiten hierbei wären die Analyse einer direkten Protein-Protein-Interaktion mittels Messung des Förster-Resonanzenergietransfers (Siegel *et al.*, 2000) oder die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus (Nashida *et al.*, 2010) von Trpc6 in EC nach cGMP-Stimulation .

5. Zusammenfassung

Der cGMP/cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) Signalweg aktiviert verschiedene Relaxationsmechanismen in der glatten Gefäßmuskulatur. Neuere Studien erweitern diese Mechanismen dahingehend, dass auch Trpc (canonical transient receptor potential)-Kanäle in der glatten Muskulatur negativ durch die cGKI reguliert werden.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden verschiedene Mausmodelle verwendet, denen zentrale Elemente dieses Signalweges fehlen. So wurde die Rolle des cGMP/cGKI Signalweges auf den vaskulären Tonus und den peripheren Gefäßwiderstand unter Verwendung von Trpc3-KO-, Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO-, Trpc1/3/6-KO- und glattmuskel-spezifischen sm-cGKI-KO-Mäusen untersucht.

Eine α 1-adrenerge Stimulation führte in NOS-gehemmten Aortenringen zu vergleichbaren Kraftanstiegen, sowie im Hinterbeinmodell zu ähnlichen Druckanstiegen in den untersuchten Mausmodellen. Die anschließende Stimulation der cGKI mit 8-Br-cGMP reduzierte sowohl den Tonus der Aorta, als auch den peripheren Druck in allen Mausmodellen im selben Ausmaß, ausgenommen in den sm-cGKI-KO-Mäusen. Die α 1-adrenerge Stimulation von isolierten VSMC führte in Ctr-, Trpc3-KO- und Trpc6-KO-Mäusen zu vergleichbaren Anstiegen der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$). 8-Br-cGMP reduzierte die $[Ca^{2+}]_i$ vergleichbar in den VSMCs dieser Mauslinien. Somit scheinen die Trpc1,3,6 Kanäle nicht an der α 1-adrenerg-induzierten Kontraktilität oder der cGMP/cGKI-vermittelten Relaxation im Gefäßmuskel beteiligt zu sein.

Die α 1-adrenerge Stimulation von intakten Aortenringe zeigte stärkere Kraftanstiege in den sm-cGKI-KO-, Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO- und Trpc1/3/6-KO-Mäusen, als in den Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen. Dies deutet daraufhin, dass in der intakten Aorta ein vasorelaxierender Tonus existiert, an dem die cGKI und der Trpc6-Kanal beteiligt sind. Der dominante vasorelaxierende Faktor in Gefäßen ist die endotheliale NO-Produktion, die hormonell oder durch Dehnung des Endothels durch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und nachfolgender Stimulation der NOS aktiviert wird. Die Stimulation von isolierten EC der untersuchten Mausmodelle mit Carbachol (CCh) erhöhte den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, jedoch war dieser Anstieg in EC von Trpc6-KOs signifikant geringer im Vergleich zur Kontrolle. 8-Br-cGMP reduzierte die $[Ca^{2+}]_i$ in den EC von Ctr- und Trpc3-KO-Mäusen, jedoch nicht in den EC von Trpc6-KO-Mäusen.

Sowohl immunocytochemische Experimente, als auch RT-PCR-Analysen zeigten, dass Trpc3 sowohl in frisch isolierten Endothel- (EC), als auch in frisch isolierten Glattmuskelzellen (VSMC) exprimiert wurde, wohingegen Trpc6 nur in EC detektiert werden konnte.

Diese Resultate zeigen, dass (1.) Trpc1-, Trpc3- und Trpc6-Kanäle nicht an der α 1-adrenerg-vermittelten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sind, (2.) in der glatten Muskulatur Trpc-Kanäle, speziell Trpc1, Trpc3 und Trpc6, mit der cGKI nicht funktionell gekoppelt sind und (3.) Trpc6-Kanäle an der cGKI-vermittelten Reduktion von Agonisten-induzierten Ca^{2+} -Signalen in EC beteiligt sind und eine Deletion dieses Kanals einen vasodilatatorischen Tonus der intakten Aorta vermindert.

6. Abstract

Signaling via cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) is the major pathway in vascular smooth muscle (VSM), by which endothelial NO regulates vascular tone. Recent evidence suggests that canonical transient receptor potential (Trpc) channels are targets of cGKI in VSM and mediate the relaxant effects of cGMP signaling.

This hypothesis was tested by investigating the role of cGMP/cGKI signaling on vascular tone and peripheral resistance using Trpc3-Knockout(KO)-, Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO-, Trpc1/3/6-KO-, and smooth muscle-specific (sm)-cGKI-KO-mice.

α -adrenergic stimulation induced similar contractions in L-NAME-treated aorta and comparably increased peripheral pressure in hind limbs from all mouse lines investigated. After α -adrenergic stimulation, 8-Br-cGMP, a cGMP analogue, diminished similarly aortic tone and peripheral pressure in control(Ctr)-, Trpc3-KO-, Trpc6-KO-, Trpc3/6-KO-, Trpc1/3/6-KO-mice but not in sm-cGKI-KO mice. In untreated aorta, α -adrenergic stimulation induced larger contractions in sm-cGKI-KO, Trpc6-KO, Trpc3/6-KO, and Trpc1/3/6-KO aorta than in those from control and Trpc3-KO-mice indicating a functional link between cGKI and TRPC6 channels. Trpc3 channels were detected by immunocytochemistry in both isolated aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) and aortic endothelial cells (EC), whereas Trpc6 channels were detected only in EC. Phenylephrine-stimulated Ca^{2+} levels were similar in VSMC from Ctr and Trpc6-KO-mice. Carbachol-stimulated Ca^{2+} levels were reduced in EC from Trpc6-KO-mice. Stimulated Ca^{2+} levels were lowered by 8-Br-cGMP in Ctr but not in Trpc6 EC.

These results suggest that cGKI and Trpc1,3,6 channels are not functionally coupled in vascular SM. Deletion of Trpc6 channels impaired endothelial cGKI signaling and the vasodilator tone in aorta.

7. Literaturverzeichnis

Abramowitz J, Birnbaumer L (2009). Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**(2): 297-328.

Balligand JL, Feron O, Dessy C (2009). eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiological reviews* **89**(2): 481-534.

Bayliss WM (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology* **28**(3): 220-231.

BDI (2013). Ödeme - Welche Erkrankungen können zu Ödemen führen? http://www.internisten-im-netz.de/de_oedeme-grunderkrankungen_127.html.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**(1): 11-21.

Biel M, Sautter A, Ludwig A, Hofmann F, Zong X (1998). Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **358**(1): 140-144.

Bomzon A, Naidu SG. (1985). Perfusion of the isolated rat hind limb - an analysis of the technique. *Journal of Pharmacological Methods* **14**(4): 285-296.

Bonsmann M (1934). Blutdruckversuche an der Maus und Ratte mittels Photozelle. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **176**(2-5): 460-467.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R (2000). An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(17): 9747-52.

Chen J, Crossland RF, Noorani MM, Marrelli SP (2009). Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **297**(1): H417-424.

Chen ZJ, Minneman KP (2005). Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta pharmacologica Sinica* **26**(11): 1281-1287.

Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001). The TRP ion channel family. *Nature reviews. Neuroscience* **2**(6): 387-396.

Cohen RA, Plane F, Najibi S, Huk I, Malinski T, Garland CJ (1997). Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(8): 4193-4198.

Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**(5216): 285–287.

Crowley SD, Tharaux PL, Audoly LP, Coffman TM (2004). Exploring type I angiotensin (AT1) receptor functions through gene targeting. *Acta physiologica Scandinavica* **181**(4): 561-570.

Daff S (2010). NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **23**(1): 1-11.

Dietrich A, Kalwa H, Gudermann T (2010). TRPC channels in vascular cell function. *Thrombosis and haemostasis* **103**(2): 262-270.

Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **455**(3): 465-477.

Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Kalwa H, Storch U, Gudermann T (2005a). Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **371**(4): 257-265.

Dietrich A, Mederos YSM, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L (2005b). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Molecular and cellular biology* **25**(16): 6980-6989.

Draijer R, Vaandrager AB, Nolte C, de Jonge HR, Walter U, van Hinsbergh VW (1995). Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circulation research* **77**(5): 897-905.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual review of pharmacology and toxicology* **46**: 235-276.

Earley S, Brayden JE (2010). Transient receptor potential channels and vascular function. *Clinical science* **119**(1): 19-36.

Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR (1994). Ca²⁺ transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophysical journal* **66**(5): 1678-1693.

- Feil R, Gappa N, Rutz M, Schlossmann J, Rose CR, Konnerth A, Brummer S, Kühbandner S, Hofmann F. (2002). Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circulation research* **90**(10): 1080-1086.
- Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circulation research* **93**(10): 907-916.
- Fleming I, Busse R (1999). NO: the Primary EDRF. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**(1): 5-14.
- Frei E, Huster M, Smital P, Schlossmann J, Hofmann F, Wegener JW (2009). Calcium-dependent and calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **297**(4): G834-9.
- Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nature cell biology* **3**(2): 121-127.
- Friebe A, Koesling D (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research* **93**(2): 96-105.
- Furchgott RF (1984). The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology* **24**: 175-197.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**(5789): 373-376.
- Geiselhoringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J (2004). Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS letters* **575**(1-3): 19-22.
- Gomez D, Owens GK (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* **95**(2): 156-64.
- Gonzalez-Cobos JC, Trebak M (2010). TRPC channels in smooth muscle cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **15**: 1023-1039.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* **260**(6): 3440-3450.
- Guo JP, Murohara T, Buerke M, Scalia R, Lefer AM (1996). Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *Journal of applied physiology* **81**(2): 774-779.
- Hamad AM, Range S, Holland E, Knox AJ (1997). Regulation of cGMP by soluble and particulate guanylyl cyclases in cultured human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology* **273**(4 Pt 1): L807-13.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **7**(4): 801-819.

Hardie RC, Minke B (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* **8**(4): 643-651.

Hart CM, Kleinhenz DJ, Dikalov SI, Boulden BM, Dudley SC, Jr. (2005). The measurement of nitric oxide production by cultured endothelial cells. *Methods in enzymology* **396**: 502-514.

Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Konnerth A (2008). TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* **59**(3): 392-398.

Hein P, Michel MC (2007). Signal transduction and regulation: are all alpha1-adrenergic receptor subtypes created equal? *Biochemical pharmacology* **73**(8): 1097-1106.

Hochdruckliga D (2008). LEITLINIEN ZUR BEHANDLUNG DER ARTERIELLEN HYPERTONIE *Leitlinien*.

Hofmann F (2005). The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **280**(1): 1-4.

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science* **113** (Pt 10): 1671-1676.

Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological reviews* **86**(1): 1-23.

Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N (1999a). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **139**: 33-87.

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999b). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**(6716): 259-263.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(11): 7461-7466.

Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE (1993). Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(17): 8103-8107.

Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated $Ca(2+)$ -permeable cation channel. *Circulation research* **88**(3): 325-332.

Keilbach A, Ruth P, Hofmann F (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *European journal of biochemistry / FEBS* **208**(2): 467-473.

Knox AJ, Tattersfield AE (1995). Airway smooth muscle relaxation. *Thorax* **50**(8): 894-901.

Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS (2008). Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi* **44**(2): 65-81.

Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T (2005). A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **12**(3): 138-142.

Koeppen M, Feil R, Siegl D, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C (2004). cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension* **44**(6): 952-955.

Koitabashi N, Aiba T, Hesketh GG, Rowell J, Zhang M, Takimoto E, Tomaselli GF, Kass DA (2010). Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**(4): 713-724.

Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG (1999). Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovascular research* **42**(1): 206-213.

Koller A, Schlossmann J, Ashman K, Uttenweiler-Joseph S, Ruth P, Hofmann F (2003). Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochemical and biophysical research communications* **300**(1): 155-160.

Kondo S, Scheef EA, Sheibani N, Sorenson CM (2007). PECAM-1 isoform-specific regulation of kidney endothelial cell migration and capillary morphogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**(6): C2070-2083.

Kwan HY, Huang Y, Yao X (2006). Protein kinase C can inhibit TRPC3 channels indirectly via stimulating protein kinase G. *Journal of cellular physiology* **207**(2): 315-321.

Kwan HY, Huang Y, Yao X (2004). Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(8): 2625-2630.

- Kwan HY, Huang Y, Yao X (2000). Store-operated calcium entry in vascular endothelial cells is inhibited by cGMP via a protein kinase G-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **275**(10): 6758-6763.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **288**(21): 2709-2716.
- Lalli MJ, Shimizu S, Sutliff RL, Kranias EG, Paul RJ (1999). $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *The American journal of physiology* **277**(3 Pt 2): H963-970.
- Langer SZ, Hicks PE (1984). Alpha-adrenoreceptor subtypes in blood vessels: physiology and pharmacology. *Journal of cardiovascular pharmacology* **6 Suppl 4**: S547-558.
- Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A, International Society of H (2008). Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* **371**(9623): 1513-1518.
- Lee MW, Severson DL (1994). Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *American Journal of Physiology* **267**(3 Pt 1): C659-78.
- Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L (2009). A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(9): 3202-6.
- Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L, Ambudkar IS (2007). Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(44): 17542-17547.
- Lloyd-Jones DM, Bloch KD (1996). The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annual review of medicine* **47**: 365-375.
- Lukowski R (2006). Control of vasculo-proliferative processes by the NO-cGMP-cGKI pathway. *Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München*.
- Lukowski R, Weinmeister P, Bernhard D, Feil S, Gotthardt M, Herz J, Massberg S, Zerneck A, Weber C, Hofmann F, Feil R (2008). Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(7): 1244-1250.
- Moncada S, Higgs EA (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*(176 Pt 1): 213-254.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular cell* **9**(2): 229-231.

Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, Fay FS (1990). Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell calcium* **11**(2-3): 157-179.

Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F, Klugbauer N (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO journal* **22**(22): 6027-6034.

Mülhardt C (2003). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag*.

Muller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Muller KM, Kirkpatrick CJ (2002). Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Experimental and molecular pathology* **72**(3): 221-229.

Mulvany M (1988). Procedures for investigation of small vessels using small vessel myograph. *Department of Pharmacology, Aarhus University, Aarhus, Denmark*.

Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H (2010). Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* **285**(17): 13244–13253.

NIH (2011). What Is Metabolic Syndrome? <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/ms/>.

Nobelprize.org (2013). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**(6174): 664-666.

Pan X, Arauz E, Krzanowski JJ, Fitzpatrick DF, Polson JB (1994). Synergistic interactions between selective pharmacological inhibitors of phosphodiesterase isozyme families PDE III and PDE IV to attenuate proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical pharmacology* **48**(4): 827-835.

Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszódi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, Hofmann F (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal* **17**(11): 3045-3051.

Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **135**: 105-149.

Ralevic V, Kristek F, Hudlicka O, Burnstock G (1989). A new protocol for removal of the endothelium from the perfused rat hind-limb preparation. *Circulation research* **64**(6): 1190-1196.

Reading SA, Earley S, Waldron BJ, Welsh DG, Brayden JE (2005). TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **288**(5): H2055-2061.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology* **101**(3): 746-752.

RKI (2012). Bluthochdruck. *Gesundheit in Deutschland aktuell 2010*: 148-150.

Ruth P (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacology & therapeutics* **82**(2-3): 355-372.

Ruth, P, Landgraf, W, Keilbach, A, May, B, Egleme, C, Hofmann, F (1991). The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *European Journal of Biochemistry* **202**(3): 1339-1344.

Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation research* **93**(4): 280-291.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.

Saleh SN, Albert AP, Peppiatt CM, Large WA (2006). Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *The Journal of physiology* **577**(Pt 2): 479-495.

Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circulation research* **87**(9): 825-830.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* **404**(6774): 197-201.

Schlossmann J, Feil R, Hofmann F (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Annals of medicine* **35**(1): 21-27.

Schmidt K, Dubrovskaja G, Nielsen G, Fesus G, Uhrenholt TR, Hansen PB, Gudermann T, Dietrich A, Gollasch M, de Wit C, Köhler R (2010). Amplification of EDHF-type vasodilatations in TRPC1-deficient mice. *British journal of pharmacology* **161**(8): 1722-1733.

Seibt R, Scheuch K (1998). Blutdruckmessung in der Arbeitsphysiologie. <http://www.dgaum.de/index.php/publikationen/leitlinien/leitlinienarbeitsmedizin/lnichtaktuell/92-blutdruck.html>.

Senadheera S, Kim Y, Grayson TH, Toemoe S, Kochukov MY, Abramowitz J, Housley GD, Bertrand RL, Chadha PS, Bertrand PP, Murphy TV, Tare M, Birnbaumer L, Marrelli SP, Sandow SL (2012). Transient receptor potential canonical type 3 channels facilitate endothelium-derived hyperpolarization-mediated resistance artery vasodilator activity. *Cardiovascular research* **95**(4): 439-447.

Siegel RM, Chan FK, Zacharias DA, Swofford R, Holmes KL, Tsien RY, Lenardo MJ (2000). Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2000**(38): p11.

Skalli O, Pelte MF, Pecllet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L (1989). Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **37**(3): 315-321.

Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, Hill-Eubanks DC, Nelson MT (2012). Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science* **336**(6081): 597-601.

Sonnenburg WK, Beavo JA (1994). Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Advances in pharmacology* **26**: 87-114.

Souness JE, Hassall GA, Parrott DP (1992). Inhibition of pig aortic smooth muscle cell DNA synthesis by selective type III and type IV cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochemical pharmacology* **44**(5): 857-866.

Sousa AM, Liu T, Guevara O, Stevens J, Fanburg BL, Gaestel M, Toksoz D, Kayyali US (2007). Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGFbeta are dependent upon MK2. *Journal of cellular biochemistry* **100**(6): 1581-1592.

Standen NB, Quayle JM (1998). K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta physiologica Scandinavica* **164**(4): 549-557.

Strauer BE (2004). Bluthochdruck: Programm gegen den schleichenden Tod <http://www.uni-duesseldorf.de/home/startseite/news-detailansicht/article/bluthochdruck-programm-gegen-den-schleichenden-tod-1.html>.

Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science* **286**(5444): 1583-1587.

Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori MX, Honda A, Inoue R (2008). Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *The Journal of physiology* **586**(Pt 17): 4209-4223.

Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature medicine* **9**(12): 1506-1512.

Thefeld W (2000). Verbreitung der Herz-Kreislauf-Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung. *Springer-Verlag* **43**(6): 415-423.

Torphy TJ (1994). Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma. *Trends in Pharmacological Sciences* **15**(10): 370-4.

Trebak (2012). Calcium signaling and vascular function. <http://www.amc.edu/ResearcherBioFiles/image/FIG-WEBSITE-D%281%29.jpg>

UCB-Pharma (2013). Die Risikofaktoren im Überblick. http://www.hochdruck-aktuell.de/public/health/health_08_01.htm.

van Zwieten PA, Doods HN (1995). Muscarinic receptors and drugs in cardiovascular medicine. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **9**(1): 159-167.

Vanhoutte PM (2004). Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **49**(6): 503-508.

Venkatachalam K, Montell C (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry* **76**: 387-417.

Voets T, Nilius B (2009). TRPCs, GPCRs and the Bayliss effect. *The EMBO journal* **28**(1): 4-5.

Wang W, Keller K, Chadee K (1994). *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* **83**(4): 601-10.

Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H (2008). TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics* **118**(3): 337-351.

Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause KH, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HH, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani HA, Dietrich A (2012). Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nature communications* **3**: 649.

Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circulation Research* **90**(3): 248-50.

WHO (2011). The top 10 causes of death. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

Worner R, Lukowski R, Hofmann F, Wegener JW (2007). cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **292**(1): H237-244.

Yao X (2007). TRPC, cGMP-dependent protein kinases and cytosolic Ca²⁺. *Handbook of experimental pharmacology*(179): 527-540.

Yao X, Kwan HY, Chan FL, Chan NW, Huang Y (2000). A protein kinase G-sensitive channel mediates flow-induced Ca²⁺ entry into vascular endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**(7): 932-938.

8. Anhang

8.1 Verwendete Primer

8.1.1 Primer für Genotypisierung

cGKI

RF 125	5' - GTC AAG TGA CCA CTA TG - 3'
RF 53	5' - CCT GGC TGT GAT TTC ACT CCA - 3'
RF 118	5' - AAA TTA TAA CTT GTC AAA TTC TTG - 3'

SM22 Cre

Cre 800	5' - GCT GCC ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG - 3'
Cre 1200	5' - GTA GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC AC - 3'

Trpc1 (Dietrich *et al.*, 2007)

C1-E8F	5' - GGC AAC CTT TGC CCT CAA AGT GGT GGC -3'
C1-I8R1	5' - AGT GAA TAT ATA TAT ATC AGA CAT AGA TTT GGG -3'
bPolyAF	5' - TCT ATG GCT TCT GAG GCG GA -3'
C1-I8R2	5' - GCA TTA TTA ATA TCT GAG TCA TTT TCT TAT TGG CAA AAT GAG G -3'

Trpc3

C3 lox R	5' - GGT GGA GGT AAC ACA CAG CTA AGC C - 3'
C3 lox F2	5' - GAA TCC ACC TGC TTA CAA CCA TGT G - 3'

Trpc6

TRPC6_01	5' - ACG AGA CTA GTG AGA CGT GCT ACT TCC -3'
TRPC6_02	5' - GGG TTT AAT GTC TGT ATC ACT AAA GCC TCC -3'
TRPC6_03	5' - CAG ATC ATC TCT GAA GGT CTT TAT GC -3'
TRPC6_04	5' - TGT GAA TGC TTC ATT CTG TTT TGC GCC -3'

8.1.2 Primer für RT-PCR

α -SMA

sma-1	5' - GCA TCC ACG AAA CCA CCT A - 3'
sma-2	5' - CAC GAG TAA CAA ATC AAA GC - 3'

PECAM-1

for	5' - TGC TCT CGA AGC CCA GTA TT - 3'
rev	5' - CGC TGA ACA CCG CGG GGT GGG AAT GGC - 3'

HPRT

QG 197	5' - GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC - 3'
QG 198	5' - CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA - 3'

Trpc3

PH 751 C3 for	5' - CAG CAT TCT CAA TCA GCC AAC ACG - 3'
PH 752 C3 rev	5' - AAG ATG GCT AAT TCC TCC GTC GC - 3'

Trpc6

PH 757 C6 for	5' - TCC AGG AAA TTG AGG ATG ATG CG - 3'
PH 757 C6 rev	5' - TTG GAA GCC TTG CTT TTG ACC C - 3'

8.2 Verwendete Antikörper

8.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Referenz	Verdünnung
CD31/PECAM-1	Ratte	BD Pharmingen (550274)	2,5 µg/ml
α-Aktin	Kaninchen	abcam (ab5694)	0,5 µg/ml
	Maus	Millipore (CBL171)	1/100
cGKI	Kaninchen	Prof. Dr. F. Hofmann (TU München)	1/500
Trpc3	Kaninchen	Prof. Dr. V. Flockerzi (Uni Saarland)	1/200
Trpc6	Kaninchen	Prof. Dr. V. Flockerzi (Uni Saarland)	1/200

Tabelle 20: Verwendete primäre Antikörper für die Immunocytochemie.

8.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-Ratte, AlexaFluor 488	Esel	Life Technologies (A21208)	1/300
Anti-Kaninchen, AlexaFluor 594	Ziege	Life Technologies (A11012)	1/300
Anti-Maus, Cy2- gekoppelt	Ziege	Dianova (115-225- 164)	1/500
Anti-Kaninchen, Cy3-gekoppelt	Ziege	Dianova (111-165- 008)	1/500

Tabelle 21: Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunocytochemie.

9. Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Lukowski R, Rybalkin SD, **Loga F**, Leiss V, Beavo JA, Hofmann F. (2010). Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(12):5646-51.

Methner C, Lukowski R, Grube K, **Loga F**, Smith RA, Murphy MP, Hofmann F, Krieg T. (2013). Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res Cardiol*. **108**(2):337.

Loga F, Domes K, Freichel M, Flockerzi V, Dietrich A, Birnbaumer L, Hofmann F, Wegener JW. (2013). The role of cGMP/cGKI signaling and TRPC channels in regulation of vascular tone. *Cardiovasc Res*. **100**(2):280-287.

Wegener JW, **Loga F**, Stegner D, Nieswandt B, Hofmann F. (2013). Phospholipase D1 is involved in α 1-adrenergic contraction of murine vascular smooth muscle. (*FASEB J.*, published online).

Abstracts

Lukowski R, **Loga F**, Brummer S, Hofmann F. (2009). cGMP-cGKI signaling in neurohormonal-induced heart hypertrophy. *50. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Loga F, Domes K, Hofmann F, Wegener JW. (2011). cGMP/cGKI signaling in vascular smooth muscle does not involve Trpc3 or Trpc6 channels. *77. Jahrestagung der DGPT (Frankfurt, Germany)*.

Wegener JW, **Loga F**, Domes K, Hofmann F. (2011). TRPC Channels and control of vascular tone. *5th International Conference on cGMP, cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Halle (Saale), Germany)*.

Loga F, Domes K, Hofmann F, Wegener JW. (2012). The role of cGMP/cGKI signaling and Trpc channels in regulation of vascular tone. *78. Jahrestagung der DGPT (Dresden, Germany)*.

Loga F, Domes K, Freichel M, Flockerzi V, Dietrich A, Birnbaumer L, Hofmann F, Wegener JW. (2012). The role of cGMP/cGKI signaling and TRPC channels in regulation of vascular tone. *1. European Calcium Channel Conference (Alpbach, Austria)*.

Loga F, Domes K, Freichel M, Flockerzi V, Dietrich A, Birnbaumer L, Hofmann F, Wegener JW. (2013). Evidence for functional coupling of cGMP/cGKI signalling and TRPC channels in endothelium but not in vascular smooth muscle. *6th International Conference on cGMP, cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Erfurt, Germany)*.

10. Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. Hofmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe Carvas923, die fachliche Unterstützung, sowie für die reibungsfreie Betreuung, auch außerhalb der Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Prof. Schemann (Lehrstuhl für Humanbiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München) für das Interesse an meiner Arbeit und die externe Betreuung dieser.

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jörg Wegener für die äußerst kompetente Betreuung, die fachliche Unterstützung und die durchgehend angenehme Zeit bedanken. Ich habe bei dir eine Menge gelernt!

Weiterer Dank gebührt auch Frau Dr. Katrin Domes, die mich stets bei allen Alltagsproblemen im Labor tatkräftig unterstützt hat.

Auch möchte ich mich bei den Herrn Professoren Freichel, Birnbaumer und Dietrich für die Versorgung mit Trpc-KO-Mäusen bedanken. Überdies hinaus auch bei Herrn Prof. Flockerzi für das Übersenden der Trpc-Oligonukleotide und -Antikörper.

Ein großes Dankeschön an Tea, Ged, Max, Lisa, Enrico, Anne, Bea, Steffi, Yvonne und Jie für die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, an Memo und Selahattin für ihren Einsatz im Tierstall und an Herrn Ertl für die technische Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem gesamten FREUNDESKREIS!!! Ihr seid einfach klasse.

Zu guter Letzt gilt mein herzlicher Dank meiner **MAMA** und meiner Schwester Tanja für ihre unendliche Unterstützung und ihren Rückhalt in allen Lebenslagen und zu jeder Zeit!! Danke, dass ihr immer für mich da seid.

11. Eidesstattliche Erklärung



Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der [Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt](#) der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Rolle des cGMP/cGKI Signalweges und der Trpc-Kanäle in der Regulation des vaskulären Tonus

in der **Fakultät für Medizin, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, in der Forschungsgruppe Carvas923**

unter der Anleitung und Betreuung durch: **Univ.-Prof. Dr. Franz Hofmann**

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt (promotionsführende Einrichtung) hat der Veröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich
einverstanden nicht einverstanden.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Loga
Titel: M. Sc.
Geb.-Datum/-Ort: 17.11.1985/München
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/1992 - 07/1996
Grundschule Neuried, Neuried

09/1996 - 07/2005
Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg
Abschluss: Abitur

Studium

10/2005 - 09/2008
Molekulare Biotechnologie, TU München
Abschluss: Bachelor

10/2008 - 09/2010
Molekulare Biotechnologie, TU München
Abschluss: Master

Hilfskraft im Labor

08/2008 - 10/2008
studentische Hilfskraft, IPT, Carvas923, TU München

06/2009 - 08/2009
wissenschaftliche Hilfskraft, IPT, Carvas923,
TU München

04/2010 - 07/2010
wissenschaftliche Hilfskraft, IPT, Carvas923,
TU München

Promotion

12/2010 - heute
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, AG
Carvas923, Prof. Dr. F. Hofmann, TU München

Thema: Die Rolle des cGMP/cGKI Signalweges und der
Trpc-Kanäle in der Regulation des vaskulären Tonus