

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München

**Die Rolle der cGKI-Isoformen bei der Calcium-Regulation
in der vaskulären glatten Muskelzelle der Maus**

Roman Nicolai Gappa

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann 2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlossmann, Universität Regensburg

Die Dissertation wurde am 20.08.2007 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 24.10.2007 angenommen.

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	3
<u>A Einleitung</u>	4
<u>A.1 Regulation der basalen $[Ca^{2+}]_i$ im glatten Muskel</u>	4
<u>A.2 Signaltransduktion und Kontraktion im glatten Muskel</u>	5
<u>A.3 Biochemische Abläufe bei der Relaxation der glatten Muskelzelle</u>	7
Allgemeine Anmerkungen zum NO/cGMP/cGK-Signalweg	8
<u>A.4 Struktur, Funktion und Verteilungsmuster der cGK-Isoenzyme</u>	9
A.4.1 Molekularstruktur der cGK-Isoformen	9
A.4.2 Funktion der cGKI bei der Relaxation der glatten Muskelzelle	10
A.4.3 Histologisches Verteilungsmuster der cGKI und cGKII	11
<u>A.5 Ziel der Arbeit</u>	12
<u>B Material und Methoden</u>	13
<u>B.1 Molekularbiologische, histochemische und biochemische Methoden</u>	13
B.1.1 Herstellung transgener Knock-out Mäuse	13
B.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
B.1.3 Immunfärbung	14
B.1.4 Western Blot	15
B.1.5 Herstellung von Plasmiden	16
B.1.6 Transfektion von VSMCs	16
<u>B.2 Kultivierung von glatten Muskelzellen aus der Mauseorta</u>	18
B.2.1 Isolierung von VSMCs	20
B.2.2 Kultivierung und Passage der VSMCs	21
<u>B.3 $[Ca^{2+}]_i$-Messungen mit Fura-2</u>	22
B.3.1 Grundlagen der Fura-2-Messung	22
B.3.2 EGFP als Marker transfizierter Zellen	23
B.3.3 Versuchsaufbau	24
B.3.4 Messablauf	27
B.3.5 Prinzipien der Ergebnisauswertung	31
<u>C Ergebnisse</u>	33
<u>C.1 Genotyp und Genotypisierung</u>	33
<u>C.2 Morphologie und immunhistochemische Typisierung kultivierter VSMCs</u>	34
C.2.1 Morphologie	34
C.2.2 Immunhistochemische und biochemische Eigenschaften	35
<u>C.3 Eigenschaften transfizierter Zellen</u>	38
C.3.1 Aufbau der Vektoren	38
C.3.2 Charakterisierung transfizierter Zellen	39
<u>C.4 Durchführung der $[Ca^{2+}]_i$-Messungen mit Fura-2</u>	41
C.4.1 Festlegung der Messbedingungen	41
C.4.2 Messergebnisse	44

<u>D</u>	<u>Diskussion</u>	47
<u>D.1</u>	<u>Genetische, morphologische und molekularbiologische Typisierung kultivierter vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs)</u>	47
<u>D.2</u>	<u>Eigenschaften transfizierter Zellen</u>	49
<u>D.3</u>	<u>Interpretation der $[Ca^{2+}]_i$-Messungen mit Fura-2</u>	49
<u>D.4</u>	<u>Wirkung von cGKIα und cGKIβ auf die Noradrenalin-stimulierte Erhöhung der freien zytoplasmatischen $[Ca^{2+}]$</u>	51
<u>E</u>	<u>Zusammenfassung</u>	55
<u>F</u>	<u>Anhang</u>	57
<u>G</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	60
<u>G.1</u>	<u>Zitierte Bücher und Veröffentlichungen</u>	60
<u>G.2</u>	<u>Eigene Veröffentlichungen</u>	633

Abkürzungsverzeichnis

8-Br-cGMP	8-Bromo-Guanosin-3',5'-monophosphat	NOS	NO-Synthase
ADP	Adenosindiphosphat	PBS	phosphate buffered saline
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
AUC	area under the curve	PDE	Phosphodiesterase
BSA	bovines Serumalbumin	pGC	partikuläre (membrangeb.) Guanylylzyklase
bp	Basenpaar	PKA	cAMP-abhängige Protein-kinase A
[Ca ²⁺] _i	freie zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration	RNS	Ribonukleinsäure
CaM	Calmodulin	rpm	Umdrehungen pro Minute
cAMP	zyklisches 3',5' Adenosin-monophosphat	RT	Raumtemperatur
cDNS	komplementäre DNS	sGC	lösliche (zytosolische) Guanylylzyklase
cGK (I,II)	cGMP-abhängige Protein-kinase (Isoformen I,II)	SRF	serumfreie Bedingungen
cGKI+/+	Wildtyp-Allele	TBE	Tris/Borat-EDTA
cGKI-/-	homozygotes Knock-out-Allel	U	Unit
cGMP	zyklisches 3',5' Guanosin-monophosphat	(V)SMC	(vaskuläre) glatte Muskelzelle
(k)Da	(Kilo-) Dalton		
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNS	Desoxyribonukleinsäure		
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat		
DTT	Dithiothreitol		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EGFP	enhanced green fluorescent protein		
eNOS	endotheliale NOS		
ER	endoplasmatisches Retikulum		
FURA-2 AM	Acetoxymethylester von FURA-2		
FCS	fetal calf serum		
GK-KI	cGK Knock-in		
GTP	Guanosin-5'-triphosphat		
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure		
IRAG	InsP ₃ R-assoziertes cGK Substrat		
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat		
InsP ₃ R	InsP ₃ -Rezeptor		
kb	Kilobasen		
MLC	Myosin Leichtkette		
MLCK	Myosin Leichtketten-Kinase		
MLCP	Myosin Leichtketten-Phosphatase		
NA	Noradrenalin		
NO	Stickstoffmonoxid		

A Einleitung

Arteriosklerose, arterieller Hypertonus bzw. ihre Folgen wie Myokardinfarkt oder cerebraler Insult gehören in den Industrienationen zu den Erkrankungen mit der höchsten Morbidität und Mortalität. Das verleiht der Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge im kardiovaskulären System ein besonderes Gewicht. Schon lange ist bekannt, dass in der kardiovaskulären Homöostase die glatte Muskulatur des Gefäßbaums und die systemische bzw. intrazelluläre Steuerung ihres Kontraktionsgrades und ihres Phänotyps eine zentrale Rolle spielt. Deshalb stehen auch die Regulationsmechanismen der Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzelle im Fokus der Forschung. Dreh- und Angelpunkt dabei ist die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Faktoren, die zu ihrer genauen Steuerung benötigt werden (Berridge, Lipp et al. 2000).

A.1 Regulation der basalen $[Ca^{2+}]_i$ im glatten Muskel

Die basale Ca-Konzentration von ca. 10^{-7} mol/l im Zytosol der glatten Muskelzelle (SMC) wird durch Ca^{2+} -ATPasen im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) und der Zellmembran sowie durch Na^+/Ca^{2+} -Antiporter im Plasmalemm aufrechterhalten. Auch L-type Ca^{2+} -Kanäle und andere Kanalproteine sollen die basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) stabilisieren (Karaki, Ozaki et al. 1997). In den letzten Jahren hat sich zudem herausgestellt, dass die Calciumkonzentration in SMCs (wie auch anderen Zelltypen) nicht nur global genau reguliert wird, sondern auch lokal in funktionalen Kompartimenten (Jaggar, Porter et al. 2000). Gemäß dieser Erkenntnisse existieren transiente subsarkolemmale Schwankungen der $[Ca^{2+}]_i$, die ohne Auswirkungen auf die Kontraktilität bleiben, von denen aber eine wichtige Funktion bei intrazellulären Signalprozessen angenommen wird.

Nach einer Stimulation wird das zytosolische Calcium u.a. durch spannungsregulierte Calciumkanäle, Rezeptor-regulierte Calciumkanäle und durch Kanäle aus intrazellulären Speichern (ER) erhöht (Berridge, Lipp et al. 2000).

A.2 Signaltransduktion und Kontraktion im glatten Muskel

Kontraktion

Die wichtigste Stellgröße, die zu einer Kontraktion der SMC (aber auch anderer Muskeltypen) führt, ist die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Das Calcium bindet in eukaryotischen Zellen mit hoher Affinität an das saure Protein Calmodulin (CaM). Der entstandene Komplex bindet und aktiviert nun die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), die ihrerseits die Myosinleichtkette (MLC) phosphoryliert. Das phosphorylierte Myosin interagiert mit Aktin und führt so zur Kontraktion (s. Abb. A-1). Bei einem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ erhält die Aktivität der Myosin-leichtkettenphosphatase (MLCP) ein relatives Übergewicht zur Aktivität der MLCK und macht die Phosphorylierung der MLC wieder rückgängig, was eine Relaxation zur Folge hat (Somlyo and Somlyo 2003). Dieser Kontraktionsprozess kann nicht nur durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, sondern auch durch eine Steigerung der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Mechanismus ausgelöst werden (Karakı, Ozaki et al. 1997; Somlyo and Somlyo 2003). Auf den Ablauf dieser Mechanismen soll nun im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

Signaltransduktion

Einige der nachfolgend beschriebenen Vorgänge bei der Signaltransduktion sind in Abb. A-1 schematisch dargestellt.

Die Stimulation mit darauf folgendem Ca^{2+} -Influx in das Zytosol oder die Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität wird im Wesentlichen über zwei Rezeptortypen vermittelt:

- **G-Protein-gekoppelter Rezeptor** (wie z.B. der α_1 -Adrenorezeptor mit dem Agonisten Noradrenalin): Sein Strukturmerkmal sind 7 helikale Transmembrandomänen und er aktiviert nach der Bindung eines Liganden z.B. das G-Protein $G_{q/11}$. Dieses wiederum aktiviert die Phospholipase $C\beta$ (PLC β), die daraufhin Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in die sekundären Botenstoffe 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP $_3$) spaltet. DAG bleibt membranständig und aktiviert die Proteinkinase C (in Abb. A-1 nicht gezeigt). InsP $_3$ diffundiert zum ER, bindet InsP $_3$ -aktivierte Calciumkanäle (InsP $_3$ R) und führt zur Ca^{2+} -Freisetzung in das Zytosol (Schlossmann, Feil et al. 2003). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen auch eine wichtige Rolle bei der unten beschriebenen Calcium-Sensibilisierung.
- **Rezeptor-regulierte Calciumkanäle**: Im Gegensatz zu den oben genannten werden bei diesen Rezeptoren Ca^{2+} -Kanäle direkt geöffnet und die $[Ca^{2+}]_i$ erhöht (ROCC= receptor-operated Ca^{2+} channel). Die genauen Mechanismen der Rezeptor-Kanal-Interaktion werden aber noch diskutiert (Gibson, McFadzean et al. 1998; Karaki, Ozaki et al. 1997).

Viele der auf eine Stimulation der VSMC (vaskuläre SMC) folgenden und unten beschriebenen Abläufe werden noch diskutiert, sollen aber trotzdem in einem Überblick zusammengefasst werden:

Das durch die o.g. Signaltransduktionsmechanismen freigesetzte InsP_3 bindet an sarkoplasmatische InsP_3 -aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (InsP_3R) und setzt so Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Dies leitet eine Kaskade der Ca^{2+} -Freisetzung mit folgender Muskelkontraktion ein, die zusammenfassend auch als der *Calcium-abhängige Signalweg* bezeichnet werden kann: Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soll nun einerseits Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle aktivieren und so zu einer Depolarisation der Zellmembran und zum Ca^{2+} -Einstrom über „voltage-operated Ca^{2+} channels“ (VOCC) (= L-type Ca^{2+} -Kanal) führen, die allerdings auch über Guanosin-5'-triphosphat (GTP)-bindende Proteine aktiviert werden können. Andererseits kann auch über Ca^{2+} -aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (SOCC= store-operated Ca^{2+} channel) die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ weiter erhöht werden (Gibson, McFadzean et al. 1998). Eine direkte Aktivierung der SOCCs durch PLC wird vermutet (Schlossmann, Feil et al. 2003). In der Literatur wird auch ein unselektiver Kationenkanal als mögliche Pforte für den Eintritt des Ca^{2+} in die Zelle beschrieben (Karaki, Ozaki et al. 1997). Die letztgenannten Kanalarten befinden sich alle im Sarkolemm.

Daneben gibt es den *Calcium-unabhängigen Signalweg*, der durch Agonisten wie z.B. Angiotensin ausgelöst wird. Dabei spielt das RhoA/Rho-Kinase System eine wichtige Rolle: Nach Aktivierung eines $G_{12/13}$ -Protein-gekoppelten Rezeptors wird durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen membrangebundenes RhoA-GDP über GEFs (guanine nucleotide exchange factors) in aktiviertes, zytosolisches RhoA-GTP überführt. Dieses aktiviert wiederum die Rho-Kinase, die schließlich MLCP phosphoryliert und damit inaktiviert (Fukata, Amano et al. 2001; Abb. A-1). So wird der Anteil der phosphorylierten MLC (s. vorhergehenden Abschnitt: Kontraktion) ohne Anhebung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöht, was auch als *Calcium-Sensitisierung* bezeichnet wird. Es wurden noch weitere Proteine beschrieben, die über das RhoA/Rho-Kinase-System oder unabhängig davon eine Sensitisierung bewirken sollen, wie das CPI-17 (C-potentiated inhibitor protein of 17kDa) oder die ZIP-like Kinase (Schlossmann, Feil et al. 2003). Details über ihre Wirkmechanismen *in vivo* sind jedoch noch nicht ausreichend erhellt worden, um ihre Bedeutung zu benennen.

Allgemeine Anmerkungen zum NO/cGMP/cGK-Signalweg

Das Signalmolekül cGMP wird von einer im Zytosol lokalisierten - löslichen - Guanylylzyklase (sGC) und einer membrangebundenen Form (pGC) aus GTP gebildet. Die pGC wird durch spezifische Peptide wie ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP („brain-type“ NP), CNP („c-type“ NP) und auch Guanylin stimuliert. ANP und BNP stammen aus dem Herzen, binden u.a. an das Isoenzym A der GC (GC-A) in der Niere und greifen dort in die Regulation von Natriuresis und Blutdruck ein. Diese und die folgenden Ausführungen sind schematisch in Abb. A-2 zusammengefasst.

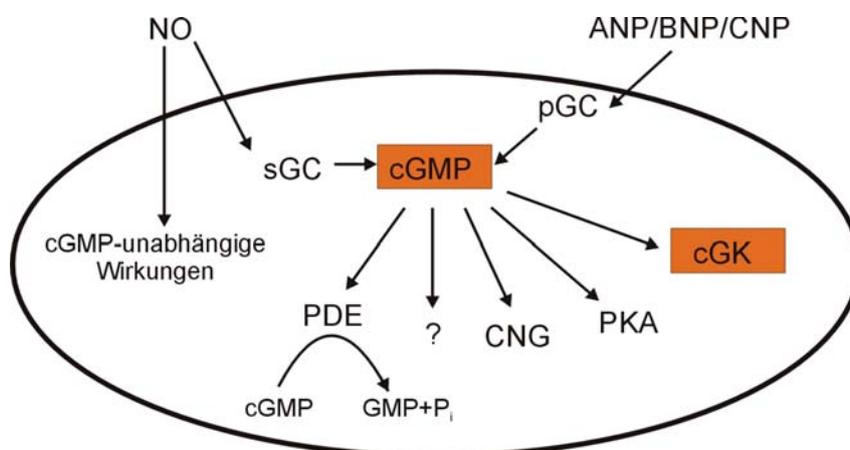


Abbildung A-2: Übersicht über die möglichen Wirkungen von cGMP in der glatten Muskelzelle. Erklärungen finden sich im Text. ?: Bisher unbekannte cGMP-Rezeptoren. Sonstige Abkürzungen im Text und Abkürzungsverzeichnis. (Nach Feil, Lohmann et al. 2003)

Die sGC kommt im glatten Muskel vor und wird durch Binden des sehr reaktiven Gases Stickstoffmonoxid (NO) an eine prosthetische Hämgruppe aktiviert. Das kurzlebige Radikal NO ($t_{1/2} = 10$ Sek.) wird aus L-Arginin durch die NO-Synthase (NOS) gebildet. Im Gefäßsystem befindet sich eine Isoform dieses Enzyms im Endothel (eNOS), aus dem NO in die glatte Muskelzelle diffundiert. Auch Antianginosa wie die verbreiteten organischen Nitrate setzen NO frei, wirken also möglicherweise über den Weg der cGMP-Bildung. Neben einer Beteiligung an der Blutdruckregulation beeinflusst NO - zusammen mit anderen Faktoren - die Thrombozytenaggregation, die Inotropie am Herzen, die Zytotoxizität von Immunzellen und moduliert die Neurotransmission. Seine Wirkung entfaltet es wahrscheinlich nicht nur über die sGC, sondern auch cGMP-unabhängig u.a. durch ADP-Ribosylierung und Nitrosylierung von Zielproteinen (Feil, Lohmann et al. 2003).

Der sekundäre Botenstoff cGMP hat drei bisher sicher identifizierte Angriffspunkte: CNGs (cyclic nucleotide-gated cation channels), cAMP- und/oder cGMP- hydrolysierende PDEs

(Phosphodiesterasen) und die verschiedenen Isoformen der cGK (cGKI α/β , cGKII). In der VSMC ist die cGKI die dominierende Isoform und hat für die Relaxation und möglicherweise für die Blutdruckregulation eine wichtige Funktion. Seit einigen Jahren wird zudem eine Bedeutung der cGKI in VSMCs unter pathologischen Bedingungen wie der Arteriosklerose oder auch der Neovaskularisation in Erwägung gezogen (Feil, Lohmann et al. 2003). Die Stellung der cGKI bei der Relaxation der VSMC soll in Abschnitt A.4.2 eingehender beschrieben werden.

A.4 Struktur, Funktion und Verteilungsmuster der cGK-Isoenzyme

In der vorliegenden Arbeit spielt die cGK - insbesondere die Isoformen der cGKI - eine zentrale Rolle. Wie in Abschnitt B.3.2 und C.3.1 ausführlich geschildert, werden zudem für die Experimente in dem unten dokumentierten Versuchsaufbau molekular modifizierte Proteinkonstrukte der cGKI-Isoformen eingesetzt. Deshalb soll zur leichteren Einordnung und Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit im Folgenden ein kurzer Überblick über die Struktur, Funktion und das histologische Verteilungsmuster der cGK gegeben werden.

A.4.1 Molekularstruktur der cGK-Isoformen

Alle cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKI, II) gehören zu der Gruppe der Serin/Threonin Kinasen. CGKI (~ 75 kDa) und cGKII (~ 85 kDa) sind auf unterschiedlichen Chromosomen und Genloci kodiert, besitzen aber einen homologen Aufbau ihrer Aminosäuresequenz, eine funktionelle Dreigliederung in der Anordnung ihrer Domänen und bilden alle in ihrer Quartärstruktur Homodimere (Pfeifer, Ruth et al. 1999). Die N-terminal lokalisierte A-Domäne (Aminosäuren 1-100) erfüllt drei Funktionen: Erstens enthält sie einen Leucin-Zipper, der die Homodimerisierung gewährleistet. Zweitens eine autoinhibitorische Pseudosubstrat-Sequenz, an die bei Abwesenheit von cGMP das katalytische Zentrum wahrscheinlich gebunden und somit inaktiv ist. Durch cGMP-Bindung an die regulatorische Domäne (R) wird eine Konformationsänderung bewirkt, die das katalytische Zentrum freigibt (s.u.). Drittens interagiert die cGK an der A-Domäne mit Enzymsubstraten und anderen zellulären Proteinen. Sie ist vermutlich für das Targeting in der Zelle verantwortlich (Hofmann, Ammendola et al. 2000). Dabei führt die Myristoylisierung dieser Domäne bei der cGKII zu einer Verankerung des Enzyms in der Plasmamembran (Pfeifer, Ruth et al. 1999). Die regulatorische (R)-Domäne jeder Untereinheit enthält zwei cGMP-Bindungsstellen mit

unterschiedlicher Affinität zu cGMP, die in kooperativer Wechselwirkung die Aktivität der cGK steuern. Schließlich befindet sich in der C-terminalen katalytischen (C)-Domäne die MgATP- und Proteinsubstrat-Bindungstasche. Sie katalysiert den γ -Phosphat Transfer von ATP auf Serin bzw. Threonin.

Die beiden Isoformen der cGKI (cGKI α und β) entstehen wahrscheinlich durch Aktivierung zweier alternativer Promotoren und Transkription zweier alternativer 5'-Exons und sind sonst baugleich. Das bedeutet, dass sich die Primärstrukturen beider Isoformen lediglich in dem Aminoterminus voneinander unterscheiden, d.h. in den ersten 89 Aminosäurepositionen bei der cGKI α bzw. den ersten 104 Aminosäurepositionen bei der cGKI β . Funktionelle Auswirkungen hat dieser Unterschied u.a. in einer insgesamt höheren Affinität der cGKI α zu cGMP im Vergleich zur cGKI β . Indirekt führt dieser Umstand enzymkinetisch zu einer niedrigeren Aktivierungskonstante (K_a) der cGKI α gegenüber der cGKI β (Pfeifer, Ruth et al. 1999 und C.3.3, Abb. C-7B). Daneben hat der Isoenzym-spezifische Aminoterminus eine wichtige Bedeutung für die Substratspezifität der beiden Isoformen der cGKI (Hofmann, Feil et al. 2006).

A.4.2 Funktion der cGKI bei der Relaxation der glatten Muskelzelle

Die unter A.2 beschriebenen Kontraktions- und Signaltransduktionsmechanismen geben schon Hinweise auf einige Stellgrößen bei der Relaxation der VSMC durch die cGKI. Auf die schon bekannten oder vermuteten Isoenzym-spezifischen Wirkungen wird unter D.4 näher eingegangen. Ein wichtiger Effekt ist wahrscheinlich die Erniedrigung bzw. Inhibition einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Das kann z.B. geschehen über eine Hemmung der $InsP_3$ -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung oder der $InsP_3$ -Produktion selbst (Schlossmann, Feil et al. 2003). Der $InsP_3R$ liegt in enger Assoziation mit dem Protein IRAG ($InsP_3R$ -assoziiertes cGKI Substrat) vor, das an der cGMP-abhängigen Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung maßgeblich beteiligt sein soll (Schlossmann, Ammendola et al. 2000). Auch eine Steigerung der Wiederaufnahme in das ER über eine Ca^{2+} -ATPase (SERCA) wird als Angriffspunkt beschrieben (Lincoln, Dey et al. 2001). Welche Bedeutung die direkte und indirekte Regulation des Ca^{2+} -Influx über das Plasmalemm hat ($VOCC$, BK_{Ca} ; s.A.2 bzw. D.4), muss noch geklärt werden (Schlossmann, Feil et al. 2003).

Ein weiterer potentieller Mechanismus ist auch die Steuerung der oben (A.2) beschriebenen Ca^{2+} -Sensibilisierung durch die cGKI (Somlyo and Somlyo 2003). Einige cGKI-regulierte Faktoren spielen dabei eine Rolle, wobei dem RhoA/Rho-Kinase System und der MLCP eine

große Bedeutung zukommen soll (Fukata, Amano et al. 2001; Schlossmann, Feil et al. 2003). Eine wohl weniger essentielle, aber doch nicht unwichtige Funktion der cGKI könnte auch die Steuerung der Zytoskelettarchitektur (z.B. über das Protein VASP) und degradierender Enzyme des NO/cGMP-Signalweges (PDE, s. A.3) sein. Es sind noch einige andere Substrate der cGKI *in vitro* identifiziert worden, deren Bedeutung *in vivo* aber erst geklärt werden muss (Hofmann, Feil et al. 2006).

Nur sekundär oder indirekt hat auch die Beeinflussung der Expression bestimmter Gene durch die cGKI mit der Kontraktilität zu tun: Es wird immer deutlicher, dass das Wachstum und die Differenzierung von SMCs (z.B. von einem fibroblastenartigen zu einem kontraktilen Phänotyp) mitunter auch durch die cGKI reguliert werden könnte (Wolfsgruber, Feil et al. 2003; Lincoln, Dey et al. 2001). Besonders bei pathologischen Prozessen (Atherosklerose, Neovaskularisation) scheint dies relevant zu sein (Feil, Feil et al. 2005; Feil, Lohmann et al. 2003).

A.4.3 Histologisches Verteilungsmuster der cGKI und cGKII

Da in der vorliegenden Arbeit die VSMCs der Mauseorta im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen, soll an dieser Stelle nur kurz auf die Verteilung der cGK-Untergruppen in den unterschiedlichen Gewebearten eingegangen werden.

cGKI findet sich in hohen Konzentrationen in glatten Muskelzellen jeglicher Art, Thrombozyten, Zerebellum, Hippocampus, Spinalganglien und in der neuromuskulären Endplatte (Pfeifer, Ruth et al. 1999). In geringerer Konzentration ist sie auch in vaskulären Endothelzellen und einigen Immunzellen nachweisbar. Eine genauere Aufklärung der histologischen Lokalisation der cGKI-Isoformen ist kürzlich gelungen (Geiselhoring, Gaisa et al. 2004; Feil, Zimmermann et al. 2005): cGKI α wird vornehmlich in Lunge, Myokard und zerebellärem Kortex exprimiert. In kontraktilen Zellen der Media der Mauseorta ist cGKI α und I β gleichermaßen deutlich vorhanden. Auch innerhalb der Tunica mucosa des Darmes zeigen cGKI α bzw. β ein deckungsgleiches immunhistochemisches Verteilungsmuster. Eine dominierende Expression von cGKI β fand sich in den meisten glattmuskulären Geweben, in Thrombozyten, im Hippocampus und Bulbus olfaktorius.

cGKII ist hauptsächlich nachweisbar im Bürstensaum des Dünndarmes und proximalen Kolons, im proximalen Tubulus der Niere, der Nebennierenrinde und in unterschiedlichen Regionen des zentralen Nervensystems sowie im Knochen (Hofmann, Feil et al. 2006).

A.5 Ziel der Arbeit

Die bisherigen Forschungen zu den $[Ca^{2+}]_i$ -Regulationsmechanismen durch die cGKI stützten sich meist auf den Einsatz „spezifischer“ Inhibitoren oder Aktivatoren der cGKI und auch anderer Enzyme bzw. Funktionsproteine (Somlyo and Somlyo 2003). Diese Inhibitoren haben aber den Nachteil einer nur eingeschränkten Spezifität und auch nicht auszuschließender Nebenwirkungen auf eine Vielzahl biochemischer bzw. physiologischer Abläufe in der Zelle. Zudem ließen sich die oft *in vitro* erhaltenen Ergebnisse nicht immer auf Zusammenhänge *in vivo* übertragen (Burkhardt, Glazova et al. 2000). Darüber hinaus ist die Bedeutung der beiden Isoformen der cGKI - cGKI α und cGKI β - bei der $[Ca^{2+}]_i$ -Regulation in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) noch nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Probleme eines rein pharmakologischen Ansatzes umgangen und durch ein genetisches Modell geklärt werden, welche Isoform der cGKI in VSMCs der Mousaorta für die Erniedrigung der $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich ist. Dazu wurden

1. VSMCs der Aorta aus cGKI-defizienten Mausmutanten (cGKI $^{-/-}$) kultiviert und charakterisiert.
2. Fusionsproteine aus EGFP (enhanced green fluorescent protein) und jeweils einer cGKI-Isoform konstruiert und funktionell charakterisiert.
3. In Form eines „Rescue“-Vorgehens jeweils eine Isoform der cGKI in die VSMCs transfiziert.
4. Die transfizierten VSMCs nach Noradrenalinstimulation Calcium-Messungen mit Hilfe der Fura-2-Methode unterzogen.

Ein Vergleich der Unterdrückung des provozierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieges in jeweils nur eine Isoform der cGKI exprimierenden VSMCs nach Inkubation mit einem cGMP-Analogen sollte schließlich die Frage nach einer möglichen Isoenzym-spezifischen Wirkung der cGKI auf die $[Ca^{2+}]_i$ klären. Zudem sollte ein Fundament für weitergehende Forschungen nach den zellulären Ansatzpunkten dieser Wirkung gelegt werden.

B Material und Methoden

B.1 Molekularbiologische, histochemische und biochemische Methoden

B.1.1 Herstellung transgener Knock-out Mäuse

Da die Herstellung transgener Knock-out Mäuse zwar nicht Inhalt dieser Arbeit ist, aber doch als Grundlage für die Experimente mit VSMCs aus diesen Mäusen angesehen werden kann, soll kurz auf die Vorgehensweise eingegangen werden.

Das Prinzip dabei ist die *ex vivo* Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) aus der Blastozyste der Maus, ihre gezielte genetische Veränderung mit Hilfe eines sog. „Targeting Vektors“, die Isolierung der erfolgreich mutierten Zellklone und anschließende Reimplantation der transgenen ES-Zellen in Mausblastozysten. Durch entsprechende Verpaarung von Mäusen, bei denen die Mutation in die Keimbahn eingegangen ist, erhält man schließlich homozygote Mausmutanten, in deren Genom die Transkription einer bestimmten Gensequenz durch die Mutation nicht mehr möglich ist (sog. Knock-out). Als „Targeting Vektor“ dient dabei ein linearisiertes Plasmid, das verschiedene Resistenzfaktoren enthält, durch Elektroporation in die Zelle eingeschleust und durch homologe Rekombination in das Genom an der gewünschten Stelle integriert wird. Durch positive und negative Selektion sowie mit Hilfe spezifischer Verfahren zur Genanalyse (z.B. Southern Blot) werden dann die erfolgreich mutierten Zellen isoliert.

Der Genotyp der Mäuse, deren VSMCs für die unten beschriebenen $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen herangezogen wurden, wird ausführlich in Abschnitt C.1 beschrieben.

B.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der enzymatischen *in vitro*-Amplifikation von definierten DNS-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Saiki, Gelfand et al. 1988). Dabei wird durch Hitze denaturierte DNS mit zwei gegenläufigen Oligonukleotid-Primern am 5' bzw. 3' Ende einer definierten Sequenz hybridisiert und anschließend mittels einer hitzestabilen DNS-Polymerase (Taq-Polymerase) die zum Einzelstrang komplementäre Basensequenz synthetisiert. Dieser Prozess wird dann zyklisch wiederholt und führt so zu einer exponentiellen Amplifikation der definierten Sequenz.

Diese Methode besitzt weitreichende Anwendungsmöglichkeiten. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation genomischer DNS aus Mausgewebe herangezogen, um die Genotypen der gezüchteten Mäuse zu bestimmen (Genotypisierung; s. C.1).

Reagenzien (mit Bezugsquellennachweis):

dNTPs	(PeqLab)	
Taq-Polymerase	(Roche, 5 U/μl)	
10x PCR Puffer:	KCl	500mM
(mit dNTPs)	Tris (pH 8,0)	100mM
	MgCl ₂	15mM
	dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 2mM)

Durchführung der PCR:

- | | | |
|-----------------------------------|---------------|--|
| Ansatz: DNS (ca. 500ng) | 2,0μl | |
| Primer A (25 pmol/μl) | 0,2μl | |
| Primer B (25 pmol/μl) | 0,2μl | |
| 10x PCR Puffer (mit dNTPs) | 2,0μl | |
| Taq-Polymerase (5 U/μl) | 0,2μl | |
| H₂O | <u>15,4μl</u> | |
| | Σ 20μl | |
- Standardbedingungen für die Amplifikation (für DNS-Fragmente bis ca. 1kb):

Initiale Denaturierung	94°C, 5min	} 35x
Denaturierung	94°C, 10sec	
Primeranlagerung	55°C, 30sec	
Polymerisation	72°C, 30sec	
Finale Polymerisation	72°C, 5min	
- Die amplifizierte DNS wird anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

B.1.3 Immunfärbung

Die Zellen werden unter den gleichen Bedingungen der [Ca²⁺]_i-Messungen (B.3.4) fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt.

Fixierung: Es werden die auf den 20mm-Plättchen in den 12-Loch Platten kultivierten Zellen (s. B.2.2) in 6-Loch Platten umgelegt und nach zweimaligem Waschen mit PBS (phosphate

buffered saline; s. B.2) mit 2ml Zellfix (s.u.) bei Raumtemperatur 15min inkubiert und dann nochmals mit PBS 2x gewaschen.

Zellfix-Lösung:	Formaldehyd	(37%)	27ml
	Glutaraldehyd	(25%)	4ml
—————			
ad 500ml PBS			
pH 7,4 (mit NaOH einstellen)			
Lagerung bei 4°C			

Immunfärbung: Die Färbung wird nach den Angaben des Herstellers für die Immunfärbung (Vectorstain, ABC Universal Kit) ausgeführt. Das Prinzip dabei ist die spezifische Detektion eines zellulären Proteins (z.B. cGKI) mittels eines gegen bestimmte Aminosäuresequenzen gerichteten Antikörpers. Der am zellulären Protein fixierte Antikörper wird nun durch einen zweiten Antikörper gegen das F_c-Ende des spezifischen Antikörpers gebunden (Detektionsantikörper). Dieser ist mit einem Enzym (z.B. alkalische Phosphatase) konjugiert, das eine bestimmte Farbreaktion katalysiert und so die Lokalisation des Zellproteins sichtbar macht. Auf diese Weise kann man sowohl die Identität als auch die Lokalisation bestimmter Proteine in der Zelle bestimmen.

B.1.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine weit verbreitete Methode zum immunologischen Nachweis definierter Proteine und soll hier nur kurz beschrieben werden:

Ein Proteingemisch oder ein aufbereitetes Zelllysat wird über ein vertikales Polyacrylamid-Gel (9%) unter denaturierenden Bedingungen in einem Spannungsfeld (160V) aufgetrennt, das an die Gelkammer angelegt wird. Dabei wandern die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in die Richtung der Anode. Nach Entfernung aus dem Spannungsfeld wird das Gel dann auf eine Membran gelegt und erneut einer Potentialdifferenz ausgesetzt. Dadurch wandern die Proteine auf die Membran (sog. Blotting) und werden nach einer Blockreaktion mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper wird durch einen weiteren Antikörper (sek. Antikörper) gegen das F_c-Fragment gebunden, der mit einem Enzym konjugiert ist. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion und macht so das gewünschte Protein spezifisch sichtbar.

In unseren Experimenten wurde mit dieser Methode u.a. die Existenz von cGKI_ bzw. I_ in Wildtyp- und Knock-out VSMCs untersucht (s. C.2.2).

B.1.5 Herstellung von Plasmiden

Plasmid-DNS oder cDNS wird mit Restriktionsendonukleasen in Fragmente geschnitten und elektrophoretisch in Agarosegelen (0,8-2,5% Agarose in 1x TBE) aufgetrennt. Die Fragmente können mit Ethidiumbromid (25µg/100ml Gel) angefärbt und bei Bedarf aus dem Gel isoliert werden („Quiaquick Gel Extraction Kit“, Qiagen). Sie werden dann mit einer T4 DNS-Ligase in dazu geeignete Plasmide integriert und zur Amplifikation durch Elektroporation in Bakterien eingeschleust. Rekombinante Bakterienklone können nach Schnellisolierung der Plasmid-DNS durch alkalische Lyse mit Hilfe einer Restriktionsanalyse identifiziert werden. Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNS (mg-Bereich) werden die Plasmide nach alkalischer Lyse durch Säulenreinigung isoliert („Nucleobond AX“ Säulen, Machery-Nagel) und ihre Integrität durch Sequenzierung überprüft.

Die Amplifikation erfolgte in dem *E. coli* Stamm XL1-blue (Stratagene) in Gegenwart von Ampicillin. Die Bakterien wurden auf Luria-Bertani-(LB-) Medium bei 37°C aerob angezogen und konnten bei Bedarf auch bei 4°C längere Zeit aufbewahrt werden.

B.1.6 Transfektion von VSMCs

Bei der Transfektion wird ein Vektor (Plasmid), der die Gensequenz für ein oder mehrere Proteine enthält, in die Zelle eingeschleust und dort in die Prozesse der zellulären Transkription und Translation integriert. Das führt bei erfolgreicher Durchführung zur Produktion funktionsfähiger Proteine. Dabei kann man zwischen einer stabilen Transfektion unterscheiden, bei der der Vektor in die chromosomale DNS integriert wird, und einer transienten Transfektion, bei der der Vektor den zellulären DNS- bzw. RNS-Abbauvorgängen unterliegt, so dass er nur einige Tage funktionsfähig ist. Auch kann man zwischen physikalischen (z.B. Elektroporation), (bio-)chemischen (z.B. Lipofektion, CaPO₄) und biologischen (z.B. Viren) Transfektionsmethoden differenzieren, wobei man je nach Paradigma, Versuchsablauf, der Resistenz der Zellen gegenüber der Belastung durch die Transfektion und der erforderlichen Transfektionsrate die geeignete Methode wählen muss. Die erfolgreiche Transfektion kann man entweder durch die Kotransfektion mit einem Markervektor oder die Integration einer Markergensequenz in das Plasmid nachweisen. Bei diesen Verfahren ist dann die transfizierte Zelle in der Lage, bestimmte Resistenzfaktoren (z.B. Neomycin-Resistenz) oder Proteine, die optisch nachgewiesen werden können (z.B. EGFP, s. B.3.2), zu exprimieren.

Grundsätzlich sind Primärkulturen aus direkt isolierten und angezuchteten Zellen wie den VSMCs wesentlich geringer empfänglich für eine Transfektion als Zelllinien. Zur Transfektion der VSMCs ist in dieser Arbeit die Lipofektion angewandt worden, da sie eine einigermaßen gute Verträglichkeit durch die Zellkulturen mit einer leichten Durchführbarkeit verbindet. Dabei wurde das Produkt LipofektAMINE™ von LIFE TECHNOLOGIES eingesetzt, dem lediglich nach dem unten beschriebenen Protokoll die Plasmid-DNS zugegeben werden muss. Mit der Lipofektion lassen sich oft auch Zellen effektiv transfizieren, die anderen Verfahren schlecht zugänglich sind.

Das Prinzip der Lipofektion besteht in der Komplexbildung polykationischer, amphiphiler Lipide mit dem polyanionischen Grundgerüst der (Vektor-)DNS und der anschließenden Pinozytose durch die Zielzellen. Als sog. Helferlipid wird der Emulsion meist noch Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) beigegeben, das die Aufnahme in die Zellen erleichtert. Die von einer monolaminären Lipidschicht umhüllte DNS gelangt allerdings nur zu einem geringen Prozentsatz in den Zellkern, ein großer Teil interagiert mit Fetten und Lipoproteinen des Zytoplasmaraumes oder bildet Komplexe mit der extrazellulären Matrix. Durch diese und wohl auch andere Wechselwirkungen lässt sich die vergleichsweise hohe Toxizität für die Zielzellen erklären. Die negativen Effekte wie auch die Effektivität der Lipofektion lassen sich aber durch das Beachten der Konfluenz in den Kulturschalen, der DNS-Konzentration, der Zusammensetzung des Kultur- und Transfektionsmediums sowie der Expositionsdauer optimieren (Sambrook 2001). Für das in der vorliegenden Arbeit angewandte Paradigma hat sich das unten aufgeführte Protokoll mit den dort angegebenen Zusätzen und Konzentrationen als wirksam herausgestellt.

Reagenzien (mit Bezugsquellennachweis):

LipofektAMINE™ (Life Technologies)	(Konzentration: 2mg/ml; Lagerung bei 4°C)
Opti-MEM ^R I (Gibco BRL Best.-Nr. 31985)	(Lagerung bei 4°C)

Durchführung der Lipofektion:

- Für die Lipofektion werden die 12-Loch Platten herangezogen, in denen schon die VSMCs auf den Messplättchen kultiviert sind (Primärkultur oder 1. Passage; s. B.2.2). Die Zellen sollten eine Konfluenz von 70-80% haben. Vor der Lipofektion werden die Zellen 2-3x mit PBS gewaschen und nach Entfernen der PBS schließlich mit 1,5ml serumfreiem Medium beschickt. Darin können sie bei den unter B.2.2 beschriebenen Kulturbedingungen bis zu 24h verbleiben, bevor sie der Lipofektion zugeführt werden.

- Ansatz (für 3 Messplättchen):

<u>MIX 1:</u>	OptiMEM ^R (5min bei RT)	100µl
	DNS	3µg mit einer 100µl-Pipette vorsichtig mischen
<u>MIX 2:</u>	OptiMEM ^R (5min bei RT)	100µl
	LipofektAMINE TM	9µl mit einer 100µl-Pipette vorsichtig mischen
- MIX 1 und MIX 2 (~200µl) in ein Eppendorf-Röhrchen pipettieren, vorsichtig mischen (nicht vortexten!) und 20min. bei RT belassen.
- Zu dem Ansatz (~200µl) 1,3ml OptiMEM^R geben und sanft mischen, dann 500µl in jedes Loch pipettieren. Das serumfreie Medium muss vor diesem Schritt aus den Kulturschalen entfernt werden.
- Nach 19-24h Inkubation bei 37°C und 6% CO₂ werden die Zellen 2-3x mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium belassen.

Wenn sich die Zellen bei der Lipofektion vom Plättchen ablösen, transparenter oder granuliert aussehen, ist das als Zeichen für den Zelltod zu werten. Solche Zellen sind dann für weitere Experimente nicht mehr zu gebrauchen. Nach der Lipofektion verbleiben die Zellen für 24-48h in serumfreiem Kulturmedium unter Standardkulturbedingungen bevor sie mit Fura-2 inkubiert und den Messungen zugeführt werden können (s. B.2.2 *Kultivierung der VSMCs* und B.3.4 *Beladen der VSMCs mit Fura-2*).

Erfolgreich transfizierte Zellen konnten bei den Experimenten durch ihre grüne Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 480nm identifiziert werden. Dies war durch die Anwesenheit von EGFP möglich, dessen Gensequenz an die Plasmide gekoppelt worden war und von einer für die Experimente ausreichend hohen Anzahl der transfizierten Zellen translatiert wurde (s. Abschnitt B.3.2, C.3.1, C.3.2).

B.2 Kultivierung von glatten Muskelzellen aus der Mauseorta

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) aus der Mauseorta wurden durch Präparation und anschließenden enzymatischen Verdau gewonnen und die so erhaltenen Zellen in Kultur genommen (Kuhbandner, Brummer et al. 2000). Die VSMCs wurden sowohl in 12-Loch Platten als auch auf 10cm-Kulturschalen adhärent wachsend kultiviert. Verwendet wurden für diesen Ansatz durchschnittlich jeweils 6 bis 10 cGKI^{+/+} bzw. cGKI^{-/-} Mäuse in einem Alter von 3-4 Wochen, die alle einen gemischten genetischen Hintergrund besaßen (SV 129 und C57BL/6; sog. litter-matched Mäuse). Bei jeder Präparation wurden nur Tiere verwertet, die in Bezug auf Alter und genetischen Hintergrund vergleichbar waren; eine Unterscheidung des

Geschlechts wurde für das vorliegende Paradigma als nicht relevant erachtet. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit 8 Aortenzellisolationen durchgeführt. Die Zellen wuchsen in VSMC-Kulturmedium und wurden in Brutschränken bei 6% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilbank ausgeführt.

Geräte und Kulturgefäße:

Binokular	Zeiss, Stemi SV6
Petrischalen	Corning, Cell Culture Dish 100mm x 20mm
12-Loch Platten	Corning, 12 Well Cell Culture Cluster Polystyrene
Glasplättchen	Assistant, Mikroskopische Deckgläser 20mm
Sterilfilter	Gelman Science (0,2µm)

Lösungen und Nährmedien (mit Bezugsquellennachweis):

PBS	NaCl	(58,44 g/mol) 135mM	4g
	KCl	(74,56 g/mol) 3mM	100mg
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	(177,99 g/mol) 8mM	710mg
	KH ₂ PO ₄	(136,09 g/mol) 2mM	120mg

ad 500ml H₂O			
pH 7,4 (mit NaOH einstellen) und autoklavieren			
bei RT lagern			
Trypsin	9 Teile PBS + 1 Teil 10x Trypsin/EDTA (GibcoBRL) Lagerung bei 4°C (max. 4 Wochen)		
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (Gibco-BRL, 10.000 U/ml) Aliquots à 5ml bei -20°C lagern		
VSMC-Medium	DMEM (GibcoBRL, Best.-Nr. 31966) 10% FCS (GibcoBRL, Best.-Nr. 10270) 100 U/ml Pen/Strep bei 4°C für max. 4 Wochen lagern		

Ca²⁺-freies Medium	HEPES	10mM	2,38g
	NaCl	160mM	3,50g
	Na-Glutamat	85mM	14,37g
	KCl	5,6mM	0,417g
	MgCl ₂	2,0mM	0,406g

ad 1l H₂O

pH 7,4 mit 10N NaOH einstellen und autoklavieren
bei 4°C lagern

Enzymlösung 1

1,0 mg/ml	BSA (Roth, Art.8076.2)
1,0 mg/ml	DTT (Roth, Art.6908.2)
0,7 mg/ml	Papain (Sigma P-4762)

frisch in Ca²⁺-freiem Medium herstellen und sterilfiltrieren
(2ml für 5-10 Aorten)

Enzymlösung 2

1 mg/ml	BSA (Roth, Art.8076.2)
1 mg/ml	Hyaluronidase (Sigma H-3506)
1 mg/ml	Collagenase (Sigma C-7926)

frisch in Ca²⁺-freiem Medium herstellen und sterilfiltrieren
(2ml für 5-10 Aorten)

B.2.1 Isolierung von VSMCs

- Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet und die gesamte Aorta in ihrem Verlauf herauspräpariert. Bei diesem Schritt und auch den folgenden sollte sowohl auf eine sterile Arbeitsweise als auch eine gewissenhafte Trennung von Instrumenten und Arbeitsplatz bei der Präparation unterschiedlicher Genotypen geachtet werden, um eine Kontamination mit dem jeweils entgegengesetzten Genotyp (cGKI ^{+/+} bzw. cGKI ^{-/-}) zu vermeiden.
- Aorten (6-10 Stück) in eine Petrischale mit PBS überführen, unter einem Binokular das Fettgewebe entfernen, in Ca²⁺-freies Medium umsetzen und für ca. 10min bei RT inkubieren.
- Mit einer Pinzette die Aortenstücke in Enzymlösung 1 (2ml) geben, mit einer Schere zerkleinern und anschließend bei 37°C inkubieren, bis eine leichte Zersetzung des Gewebes eingesetzt hat (30-40min).
- Aorten zentrifugieren (5min, 1000rpm), Überstand vorsichtig abheben und das Gewebe in Enzymlösung 2 (2ml) resuspendieren; bei 37°C inkubieren, bis der Ansatz trüb-durchsichtig ist (ca. 25min; nicht zu lange verdauen, da sonst die Zellen lysieren). Zwischendurch mit einer 2ml-Pipette suspendieren, um die Zellen auch mechanisch zu vereinzeln.
- Reaktion mit VSMC-Medium (6ml) stoppen, zentrifugieren (8min, 1000rpm), Überstand vorsichtig abheben und Zellen in VSMC-Medium (2,5ml) resuspendieren.
- Zellen in einer Neubauer-Zählkammer zählen und Vitalität durch Trypanblaufärbung bestimmen; pro Aorta sollten 2-3x 10⁵ Zellen bei einer Vitalität von >90% gewonnen werden.

B.2.2 Kultivierung und Passage der VSMCs

Kultivierung der VSMCs:

- 12-Loch Platten: Pro Loch ein mit 99,8% Ethanol abgeflammtes 20mm-Glasplättchen hineinlegen und die Zellen in einem Volumen von 1,5ml DMEM/Loch aussäen. Dabei sollte die Zellzahl zwischen 10^4 bis 60×10^3 variieren, so dass an unterschiedlichen Tagen die für die Messungen erforderliche Zelldichte erreicht wird. Die Zellen sollten nach ca. 2 Tagen mit PBS gewaschen und erneut in 1,5ml Kulturmedium aufgenommen werden.
Für die Messungen ist eine Konfluenz von 70-80% erforderlich. Diese Zelldichte wird unter den unten genannten Kulturbedingungen nach 5-8 Tagen erreicht. Danach kann die Lipofektion durchgeführt werden (s. B.1.6 *Durchführung der Lipofektion*).
- 10cm-Kulturschalen: Es werden ca. 5×10^5 Zellen in 10ml Kulturmedium aufgenommen und ausgesät. Auch dieser Ansatz sollte nach 2 Tagen mit 10ml PBS gewaschen werden. Die hier gewachsenen Zellen werden nach der 1. Passage (s. *Passage der Primärkultur*) auf 12-Loch Platten ausgesät (s.o.) oder stehen für andere Experimente zur Verfügung.
- Die Zellen werden bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Die 1. Passage sollte nach 6-9 Tagen stattfinden.

Passage der Primärkultur:

- Die Zellen der 10cm-Kulturschalen sollten bei einer Konfluenz von >90% passagiert werden. Dieser Zeitpunkt (nach 6-9 Tagen) sollte nicht zu lange überschritten werden, da sonst die Vitalität der Zellen stark abnimmt.
- Das Medium durch 2maliges Spülen mit PBS entfernen, 2-3ml frische Trypsinlösung (Trypsin/EDTA) auf die Schalen geben und bei 37°C 30-35min inkubieren. Während der Abtrypsinierung einige Male durch Auf- und Abziehen mit einer 1ml-Pipette die Zellen auch mechanisch vereinzeln und mikroskopisch die Ablösung kontrollieren.
- Das Trypsin-Zellen-Gemisch in 6ml DMEM suspendieren, um den proteolytischen Prozess zu beenden; danach bei 1000rpm 8min zentrifugieren, den Überstand vorsichtig abnehmen und in 2,5ml VSMC-Kulturmedium resuspendieren.
- Zellen in einer Neubauer-Zählkammer zählen, Vitalität mit Trypanblau bestimmen (B.2.1) und dann in der oben beschriebenen Weise (*Kultivierung der VSMCs*) aussäen, aber in einer etwas niedrigeren Dichte, da die Zellen an das Medium gewöhnt sind und daher schnell anwachsen. Bei passagierten Zellen wird die für die Messungen notwendige Konfluenz (70-80%) erfahrungsgemäß schon nach 4-6 Tagen erreicht.

B.3 $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen mit Fura-2

Die Messung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 ist ein etabliertes Verfahren, durch dessen Anwendung es möglich ist, Veränderungen der zellulären $[Ca^{2+}]_i$ mit einem Fluoreszenzmikroskop optisch darzustellen und mit Hilfe einer angeschlossenen Software auch quantitativ zu bestimmen. Man kann damit Zellkulturen im Verband wie auch Einzelzellen untersuchen, wobei sich die durchgeführten Experimente auf Letzteres beschränkt haben.

B.3.1 Grundlagen der Furamethode

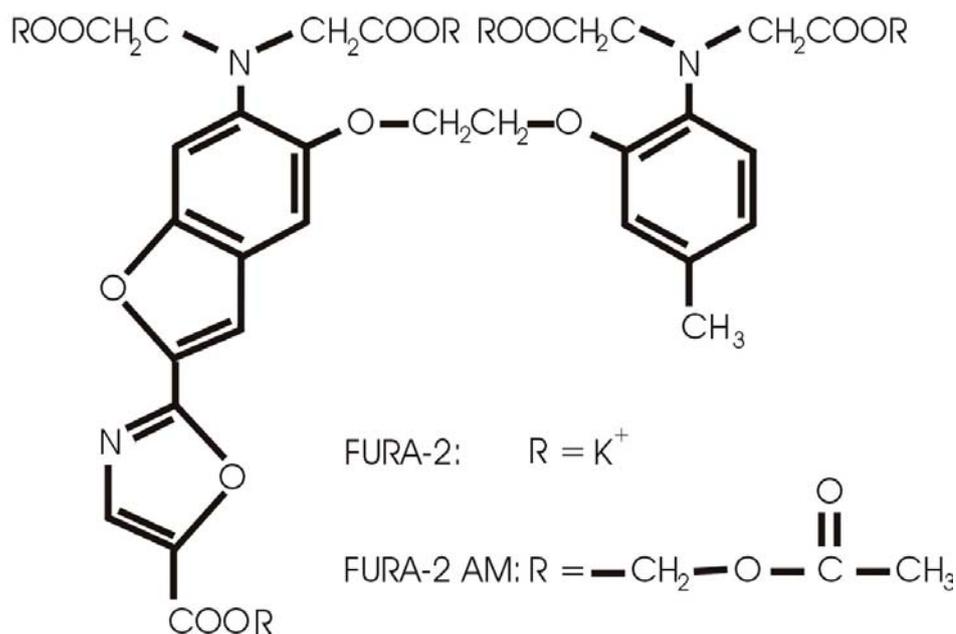


Abbildung B-1: Strukturformel von Fura-2 bzw. seinem Acetoxymethylester Fura-2 AM

Fura-2 ist eine polyaromatische, fluoreszierende organische Säure (s. Abb. B-1), welche die Eigenschaft besitzt, spezifisch mit Ca^{2+} ein Chelat im Verhältnis 1:1 zu bilden und dadurch ihre Fluoreszenzeigenschaften zu ändern. Die Besonderheit dieser Substanz liegt darin, dass bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (350 bzw. 380nm) ihre Photonenemissionsintensität bei 510nm in Abhängigkeit von ihrer Ca^{2+} -Bindung variiert. Es ist somit möglich, durch alternierende Anregung bei 350 bzw. 380nm zwei gegenläufige Intensitätskurven zu messen, die über ein mathematisches Model, in welches das Verhältnis dieser Kurven zueinander einfließt, eine Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglichen (Grynkiewicz, Poenie et al.

1985). Der Vorteil dieser Messungen bei zwei Anregungswellenlängen liegt darin, dass sie unabhängig von der Farbstoffkonzentration in der Zelle, der Zelldicke, der Intensität des Anregungslichtes und der Kamerasensitivität sind. Wichtig für eine korrekte Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die angeschlossene Software ist allerdings eine sorgfältige Kalibrierung der Apparatur mit bekannten $[Ca^{2+}]_i$. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war allerdings nur die relative $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung relevant (s. Abschnitt C.4.1, *Bedingungen zur Messung und Auswertung*); deshalb wurde auf eine exakte Kalibrierung verzichtet. Die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können in Echtzeit auf einem Bildschirm verfolgt werden.

Gegenüber anderen Verbindungen zur Ca^{2+} -Messung besitzt Fura-2 neben den oben genannten weitere wichtige Vorteile: Da Fura-2 ein Fluoreszenzfarbstoff ist, können die Messungen vor einem schwachen Hintergrund durchgeführt werden, was bei Absorptionsfarbstoffen nicht möglich ist. Außerdem ist seine Emissionsintensität gegenüber lumineszierenden Farbstoffen höher; dies erleichtert die Signalauswertung. Wichtig ist auch eine geringere Neigung zum Ausbleichen bei Belichtung mit der Möglichkeit zu validen Ca^{2+} -Messungen über längere Intervalle, die mit früheren Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Quin-2 unzuverlässiger waren. Trotzdem gibt es bei dieser Methode noch einige Einschränkungen und Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der absoluten $[Ca^{2+}]_i$ (Moore, Becker et al. 1990). In den Experimenten wurden deshalb nur die relativen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ berücksichtigt, was für die Fragestellung als ausreichend anzusehen war.

Um Fura-2 membrangängig zu machen, wird es bei der Beladung der Zellen als Acetoxymethylester (Fura-2 AM) eingesetzt, intrazellulär durch Esterasen in seine Funktionsform überführt und reichert sich dann v.a. im Zytosol an (s. Abb. B-1).

B.3.2 EGFP als Marker transfizierter Zellen

GFP (Green Fluorescent Protein) ist ein aus 248 Aminosäuren bestehendes Fluorophor, das in seiner ursprünglichen Sequenz aus einer Quallenart kloniert wurde. Das Ausgangsprotein wird nach der Translation durch einen autokatalytischen, oxydativen Prozess in das eigentliche Fluorophor überführt. Um seine Exzitations- bzw. Emissionseigenschaften, seine Anwendbarkeit für molekularbiologische Experimente und seinen Einsatz in Zellen von Säugern *in vivo* zu optimieren, wurde durch Variation seiner Aminosäuresequenz eine Vielzahl von Mutanten geschaffen.

Je nach biologischer Fragestellung haben sich jeweils einige Mutationsvarianten als die geeignetsten herausgestellt. Allen Varianten gemeinsam ist aber, dass sie als Marker

vollkommen autonom funktionieren, d.h. weder Kofaktoren noch Enzymsubstrate benötigen, geschweige denn mit Antikörpern markiert werden müssen (Spector, Goldman et al. 1998).

Für die Versuche in dieser Arbeit mit VSMCs der Mauseorta wurde EGFP (Enhanced GFP) verwendet, da sein physikochemisches Verhalten (z.B. Anregungs-Wellenlänge bei 480nm) nicht mit der Fura-2 Methode interferiert, es in der Säugerzelle biologisch inert ist und günstige Fluoreszenzeigenschaften als Reporter für Vektoren besitzt (z.B. lange Ausbleichzeit, starke Lichtemission).

EGFP kann nicht nur als isoliertes Protein heterolog exprimiert werden, sondern es besteht auch die Möglichkeit, dass seine cDNS mit der cDNS anderer Proteine in einem Vektor fusioniert werden kann, ohne die Transkription bzw. Translation und weiter auch die Proteinfaltung und -funktion beider Fusionspartner zu beeinträchtigen (s. Abschnitt C.3 für die Funktion von cGKI α/β -EGFP). Diese Eigenschaft empfiehlt es als Reporter für Transfektionsexperimente. Dabei kann EGFP sowohl am N- wie auch am Carboxyterminus des Zielproteins angehängt werden; bei einigen Proteinen ist sogar ein Einfügen innerhalb der Gensequenz des Zielproteins ohne Funktionseinbuße möglich. Die Gensequenz des Vektors, der für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurde, ist unter C.3.1 genau beschrieben.

B.3.3 Versuchsaufbau

Optische Apparatur und Software

Geräte:

Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 35M
Xenonlampe	TillVision, Polychrome IV
CCD-Kamera	Till Photonics, Imago
Objektiv	Zeiss 100, 1,25 Ölimmersion
Filter	Hersteller unbekannt Pos. I: 450-490nm, FT 510, 515-565 Pos. II: 450-490nm, FT 515-535
Immersionsöl	Zeiss. Immersol TM 518F
Rechner	DELL, OptiPlex GX 110
Software	TILLvisION 4.0
Glaskapillaren	Harvard Apparatus, GC150TF-10
Pipettenzieher	WZ, DMZ-Universal Puller
Umwälzpumpe	Ismatec sa, Vario-Pumpsystem
5ml-Spritze	Plastipak

In der Abb. B-2 ist der Versuchsaufbau zur $[Ca^{2+}]_i$ -Messung von VSMCs schematisch dargestellt.

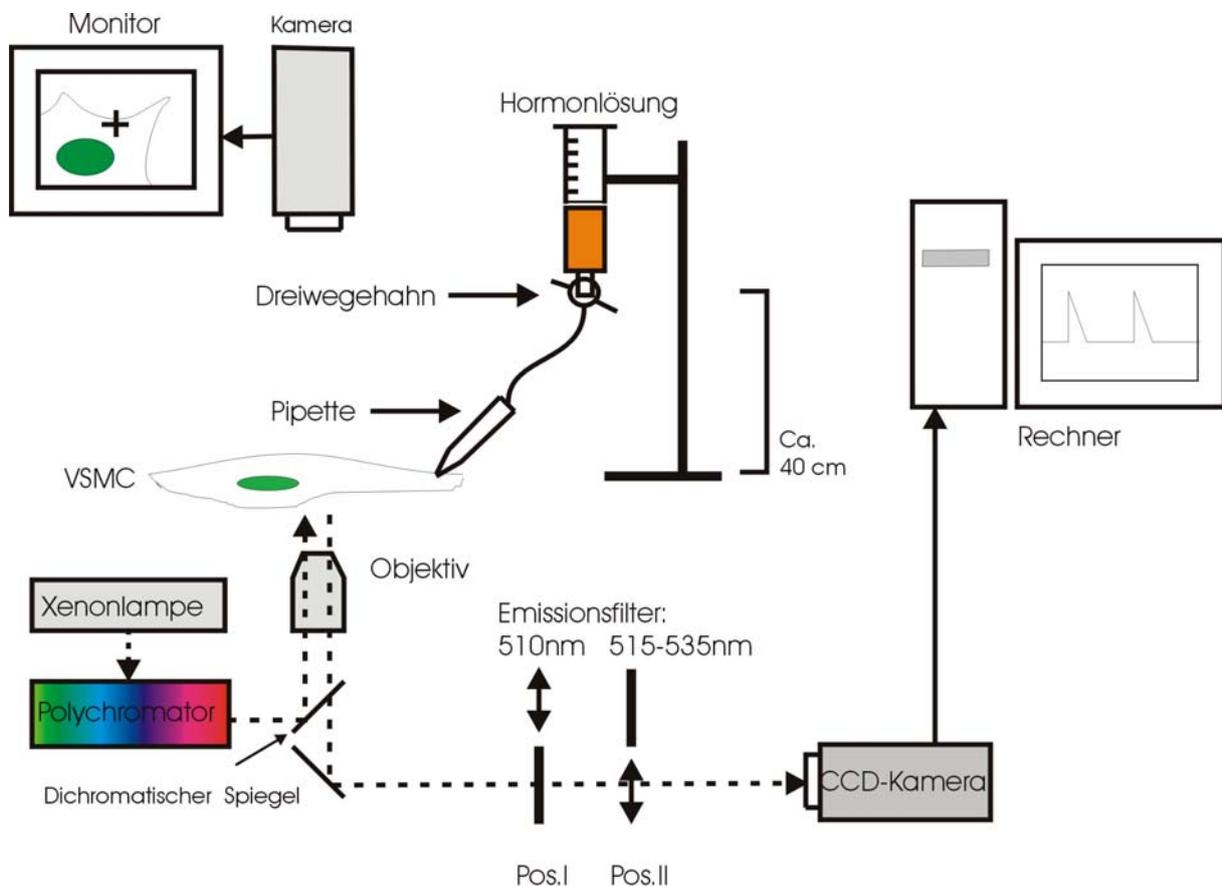


Abbildung B-2: Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus zur $[Ca^{2+}]_i$ -Messung. Nähere Beschreibung im Text.

Optisches System

Grundlage für die Messungen ist ein Zeiss Axiovert 35M Mikroskop. Als Lichtquelle dient ein Polychromator, der über ein optisches Gitter in der Lage ist, eine gewünschte Wellenlänge des Lichtspektrums monochromatisch abzustrahlen. Die erforderliche Wellenlänge für die Fluoreszenzmessungen beträgt 350 bzw. 380nm, sowie 480nm für die Detektion EGFP-beladener Zellen. Das Anregungslicht wird über einen dichromatischen Spiegel mit eingebautem BSP (Beamsplitter) und Emissionsfilter durch das Objektiv auf die Zellen geleitet. Das Emissionslicht wird über den oben genannten Spiegel gelenkt und von einer CCD-Digitalkamera empfangen. Die weitere Verarbeitung der Daten wird von einer speziellen Software übernommen.

Messkammer

Als Messkammern dienen für das Mikroskop speziell angefertigte Edelstahlringe, in welche die 20mm-Glasplättchen aus den 12-Loch Platten eingespannt werden können. Die Messkammern besitzen eine Vertiefung, die ca. 500 μ l Messmedium (Tyrodelösung; s. B.3.4) aufnehmen kann und deren Unterseite durch die mit den Zellen bewachsenen Glasplättchen begrenzt wird. Es sollten immer mindestens 3-4 Messkammern eingesetzt werden, so dass es möglich ist, während der Messung von 1-2 Plättchen die übrigen mit Fura-2 zu beladen (Beladungszeit: \sim 1h). Nach der Messung einer Plättchenreihe kann sofort mit der nächsten fortgefahren werden; somit wird ein kontinuierlicher Messablauf gewährleistet.

Die Plättchen werden mit der Codierung für die unterschiedlichen Genotypen gekennzeichnet, um eine Verwechslung bei der Messung auszuschließen.

Vorrichtung zur Hormonapplikation und Spülung der Messkammer

Die Hormonlösung wird über eine Glaspipette auf die Zellen appliziert, die an einem Pipettenzieher für diese Messungen hergestellt wird. Nach Abfeilen und Abflammen der Pipettenspitze werden die Pipetten ausgewählt, deren Öffnungsdurchmesser bei 20-25 μ m liegt, was für eine langsame und zielgenaue Hormongabe wichtig ist. Die Pipette wird mit Hilfe eines Mikromanipulators an die Zellen herangeführt. Über einen Kunststoffschlauch ist sie mit einem Hormonreservoir (offene 5ml-Spritze) verbunden, das ca. 40cm über der Messebene angebracht wird. Der Hormonfluss ist somit eine Funktion des Pipettenöffnungsdurchmessers und der Höhe des Hormonreservoirs über der Messebene. Die Flusszeit (ca. 1-2sek) kann über einen zwischengeschalteten Dreiweghahn reguliert werden. In dieser Zeit sollten ca. 20 μ l Hormonlösung gezielt auf eine ausgewählte Zelle fließen.

In die Messkammer wird je ein zu- bzw. ableitender Kunststoffschlauch gelegt, der mit einer angeschlossenen Umwälzpumpe nach jedem Messvorgang die alte Messlösung absaugt bzw. eine entsprechende Menge frischer Lösung zuführt.

B.3.4 Messablauf

Nachdem die Pipette auf einen definierten Abstand zum Glasplättchen eingestellt worden ist (s.u.: *Applikation der Hormonlösung und Testsubstanzen*), wird eine transfizierte und mit Fura-2 beladene Zelle nach den unter C.4.1 (*Bedingungen zur Messung und Auswertung*) beschriebenen Kriterien ausgesucht und mit der Messung begonnen. Die Messungen sollten ohne die Kenntnis des Genotyps der Zellen durch den Untersucher durchgeführt und ausgewertet werden (Blindversuch); dazu müssen die Genotypen und das Transfektionsmuster der Zellen vorher kodiert werden.

Jede ausgewählte Zelle wird zweimal mit der Hormonlösung stimuliert, wobei zwischen den Stimulationen ein definiertes Zeitintervall bestehen muss, das es der Zelle ermöglicht, ihre Ca^{2+} -Speicher wieder aufzufüllen und die Messungen unterschiedlicher Zellen vergleichbar macht. Die zweite Stimulation erfolgt nach Inkubation der Zellen mit einer Testsubstanz und dient zur Messung der relativen Wirkung der Testsubstanz im Vergleich zur ersten (Kontroll-) Stimulation. Bei diesem Messablauf wird also die Wirkung der Testsubstanz auf die Zellen durch eine interne Standardisierung objektiviert und unabhängiger von den Eigenschaften der Einzelzelle.

Beladen der VSMCs mit Fura-2

Bei diesem Schritt werden sowohl Tyrode- als auch Furalösung benötigt, deren Zusammensetzung im Folgenden beschrieben werden soll:

- Tyrodelösung:

NaCl	(58,44 g/mol)	140mM	16,36g
HEPES	(238,3 g/mol)	5mM	2,38g
Glucose	(180,2 g/mol)	10mM	3,60g
0,5M KCl	(74,56 g/mol)	5mM	20ml
0,12 M MgSO₄	(246,48 g/mol)	1,2mM	20ml
1M CaCl₂	(147,02g/mol)	2mM	4ml

ad **2l H₂O** – anschließend mit 10 N NaOH auf pH 7,4 einstellen und bei RT lagern.

- Furalösung:

1mg Fura-2 AM Pulver (1001,86 g/mol) in 1ml DMSO auflösen (=1mM) und in 50µl Portionen bei -20°C einfrieren. Für die Messungen 2,5µl der 1mM Fura-2 AM Portionen in 2ml Eppendorfröhrchen aliquotieren und ebenfalls bei -20°C lagern. Diese Aliquots mit 1ml Tyrodelösung und 1% BSA versetzt reichen für die Beladung von 2 Messkammern (je 500µl) mit Fura-2 AM (= 2,5µM). Diese Arbeiten müssen im Dunkeln unter Rotlicht zügig durchgeführt werden, um ein Ausbleichen zu verhindern.

Im Folgenden der Ansatz für 2 Messkammern (frisch ansetzen):

Fura-2 AM (1mM)	2,5µl	(Calbiochem; Kat.-Nr. 344905)
BSA (1mg/ml)	10µl	(Roth, Art.8076.2)

ad **1ml Tyrodelösung** und sofort gut schütteln, um ein Ausfällen von Fura-2 AM zu verhindern.

Ein mit VSMCs bewachsenes Glasplättchen wird vorsichtig in eine Messkammer eingespannt und im Dunkeln unter Rotlicht mit Fura-2 AM beladen. Die Messkammer mit dem Plättchen wird zuerst 1x mit Tyrode gespült und dann mit 500µl frischer Furalösung 1h unter Lichtabschluss inkubiert. Danach wird sie 3x mit Tyrode gewaschen und in 500µl Tyrode belassen.

Sie kann so in das Mikroskop eingespannt werden; bereits mit Fura-2 AM inkubierte Messkammern können im Dunkeln höchstens 1h bei RT aufbewahrt werden.

Applikation der Hormonlösung und Testsubstanzen

Bei 100facher Vergrößerung wird die Pipette mit dem Mikromanipulator in das Gesichtsfeld verschoben und erst bei 1000facher Vergrößerung feinjustiert. Die Zellebene wird unter Fluoreszenzbeleuchtung und die gewünschte Zelle auf die Gesichtsfeldmitte eingestellt. Nun wird die Pipettenspitze an den Rand des Gesichtsfeldes verschoben, so dass nur das äußerste Ende der Spitze noch zu sehen ist (s. Abb. B-3). Die Pipette sollte in einem Winkel von ca. 45° zur Zellebene stehen. Die gewissenhafte Einstellung der Pipette ist für eine zielgenaue und reproduzierbare Hormonapplikation unabdingbar, da kleine Abweichungen bereits zum Ausbleiben einer Zellreaktion führen können.

Folgende Hormon- und Testlösungen werden verwendet:

	Produkt	Stammlösung	Aliquots	Arbeitslösung auf	Endkonz.
Noradrenalin	Sigma, A 7257	100µM in H ₂ O	50µl	5ml Tyrode	1µM
8-Br-cGMP	BioLog, B004-100	10mM in H ₂ O	50µl	500µl Tyrode (= Messkammervol.)	1mM

Stammlösungen bei -20°C aufbewahren; die Arbeitslösungen immer frisch ansetzen.

Als Hormonreservoir hat sich eine offene 5ml-Spritze als zweckmäßig herausgestellt. Bei jeder Stimulation sollten ca. 30µl der Hormonlösung auf die Zelle gegeben werden; dies entspricht ungefähr einer Öffnung des Dreiwegehahns für 1-2sek.

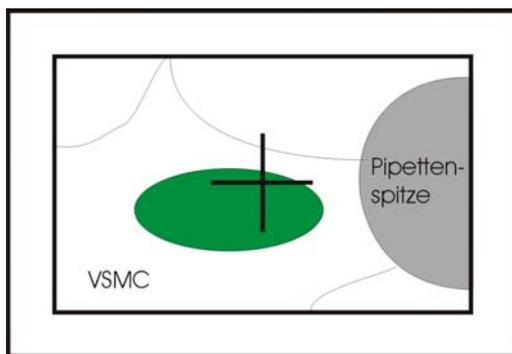


Abbildung B-3: Einstellung der Zielzelle und der Pipettenspitze auf dem Monitorbild. Das Fadenkreuz wird auf den Zellkern ausgerichtet und die Pipette mit dem Mikromanipulator so justiert, dass die Pipettenspitze gerade am Bildrand sichtbar bleibt. (Vergrößerung: 1000x).

Ablauf der Messung

Über die oben beschriebenen Vorrichtungen wird die Hormonlösung auf die nach bestimmten Kriterien (s.u.: *Auswahlkriterien*; C.4.1: *Bedingungen zur Messung und Auswertung*) ausgewählte Zelle gegeben und ein Ca²⁺-Transient ausgelöst. Die folgenden Erklärungen sind in Abb. B-4 zusammengefasst. Nach Wiedererreichen der Basislinie wird die Zelle über ein Intervall von 10min nicht stimuliert und auch nicht belichtet, um ein Ausbleichen von Fura-2 zu vermeiden. Innerhalb dieses Intervalls wird aber nach 4min die Testsubstanz (8-Br-cGMP) in das Zellbad gegeben und kann über eine ausreichend lange Zeit einwirken (6min). Nach Ablauf der standardisierten Zeit wird die Zelle erneut mit Hormon stimuliert.

Im Idealfall lässt sich so ein Doppeltransient auslösen, der dann nach den unten beschriebenen Kriterien ausgewertet wird (s.u.: *Auswahlkriterien*; B.3.5; C.4.1 *Bedingungen zur Messung und Auswertung*).

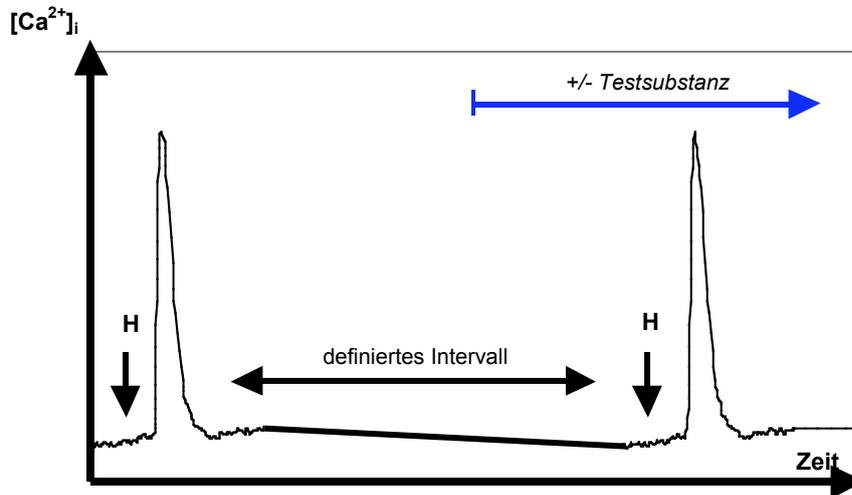


Abbildung B-4: Messablauf bei der Auslösung eines Doppeltransienten (H= Hormongabe). Nähere Erläuterungen finden sich im Text. (Originaldaten aus einer cGKI^{+/+} VSMC der 1. Passage; keine Zugabe einer Testsubstanz)

Optimierte Parameter

In der Diplomarbeit von Rutz (Rutz 2000) wurden bei Versuchen für die Messung glatter Muskelzellen folgende Parameter festgesetzt:

- Mit VSMCs bewachsene Plättchen sollten zu 70-80% konfluent sein
- Zellen werden 2-3 Tage vor den Messungen in serumfreies Kulturmedium überführt
- Zellen 1h mit Furalösung (2,5 μ M) bei RT im Dunkeln beladen
- 1 μ M als Hormonkonzentration für Noradrenalin
- Volumen der Hormonlösung bei einmaliger Stimulation 20-30 μ l (Öffnen des Dreiwegehahns für 1-2sek bei einer Höhe des Hormonreservoirs von 40cm über der Zellebene)
- Zwischen den Messungen verschiedener Zellen auf einem Plättchen wird die Messlösung durch frische Tyrodelösung ersetzt
- Die Position der Pipette wird während eines Messzyklus nicht verändert

Auswahlkriterien (modifiziert nach Rutz 2000)

Aufbauend auf den Ergebnissen der zitierten Arbeit wurden weiterhin folgende Kriterien bei der Auswahl der Zellen definiert, die eine Vergleichbarkeit der Messung verschiedener Zellen gewährleisten sollten (detailliertere Beschreibung unter C.4.1):

- Im Vergleich mit den anderen Zellen eines Messplättchens soll die Fura-2-Fluoreszenz der Zielzelle im mittleren Bereich liegen
- Die basale Fluoreszenzintensität der Zelle, die mit der basalen $[Ca^{2+}]_i$ korreliert, sollte Werte in einem Bereich von 100-500 Einheiten bei o.g. Versuchsaufbau (B.3.3) betragen. Die Einheiten ergeben sich als Ergebnis der Verhältnisbildung der Lichtemissionsintensitäten von Fura-2 bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen nach einem definierten Algorithmus (B.3.1)
- Die Fluoreszenz bei 480nm Anregungswellenlänge (über einen Emissionsfilter für Wellenlängen von 515-535nm) als Zeichen der erfolgreichen Translation von EGFP soll im unteren Intensitätsbereich liegen
- Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation soll unmittelbar erfolgen
- Die Höhe des Transienten muss innerhalb von 100sek nach Stimulation um mindestens 66% des transienten Ca^{2+} -Zuwachses auf einen stabilen Wert abgefallen sein
- Die Höhe des Transienten soll 600-1200 Intensitätseinheiten betragen

B.3.5 Prinzipien der Ergebnisauswertung

Für eine aussagekräftige Messung unterschiedlicher Genotypen ist es Voraussetzung, dass die Isolierung der Zellen, Kultivierung, Passage, Transfektion und Messung unter möglichst gleichen Bedingungen vorgenommen wird. Die Experimente werden zudem als Blindversuch durchgeführt, d.h. nach Aussaat der Zellen auf die Glasplättchen in den 12-Loch Platten wird die Identität des Transfektionsmusters (cGKI_ bzw. I_) verschlüsselt. Jedes Plättchen wird mit einem Großbuchstaben und einer Zahl codiert und erst nach Messung und Auswertung des Messergebnisses decodiert.

Jede Messung wird in ihrem gesamten Verlauf in TILLvisION gespeichert, bei der Auswertung in eine Exceldatei konvertiert und mit Origin 6.0 bearbeitet. Dabei wird bei jedem Transienten das Integral oberhalb der basalen Fluoreszenzintensität berechnet (= area

under the curve, AUC) und anschließend der 2. Transient zum 1. Transienten in ein Verhältnis gesetzt:

$$\frac{\text{AUC}_2 \times 100\%}{\text{AUC}_1}$$

Die statistische Auswertung wird mit einem Student's t-test für gepaarte Daten durchgeführt.

C Ergebnisse

C.1 Genotyp und Genotypisierung

Für die Experimente wurden GK-KI (cGKI-Knock-in) Mäuse auf einem gemischten genetischen Hintergrund verwendet. Dabei wurde in das Exon 10 des cGKI α/β Allels eine IRES-CreER^T-neo Kasette so integriert, dass das Leseraster in Exon 10 unterbrochen wurde und so eine Translation unmöglich machte (Wegener, Nawrath et al. 2002). Somit wurde genotypisch ein funktioneller Knock-out eines Allels herbeigeführt (cGKI $+/-$ Mäuse). Um nun aus der heterozygoten Mutation transgener Mäuse homozygote Knock-out Mäuse zu erhalten, wurden cGKI $+/-$ Mäuse verpaart und der Genotyp der so entstandenen cGKI $-/-$ bzw. cGKI $+/+$ Mäuse mit Hilfe einer PCR-Analyse aus Schwanzbiopsien identifiziert (s. Abb. C-1). Die dabei sowohl für den Nachweis des Wildtyp- als auch des KI-Allels verwendeten Primer sind in Abb. C-2 angegeben. Eine Western Blot Analyse mit einem Antikörper, der beide cGKI-Isoformen bindet („cGKI-common“-Antikörper; Feil, Zimmermann et al. 2005), zeigt, dass in den VSMCs reinerbiger GK-KI Mäuse weder cGKI α noch cGKI β exprimiert werden (s. Abb. C-5B). Auch der Phänotyp der so erhaltenen homozygoten GK-KI Mäuse (cGKI $-/-$) entsprach vollkommen dem Phänotyp anderer cGKI-defizienter Mauslinien (Pfeifer, Klatt et al. 1998).

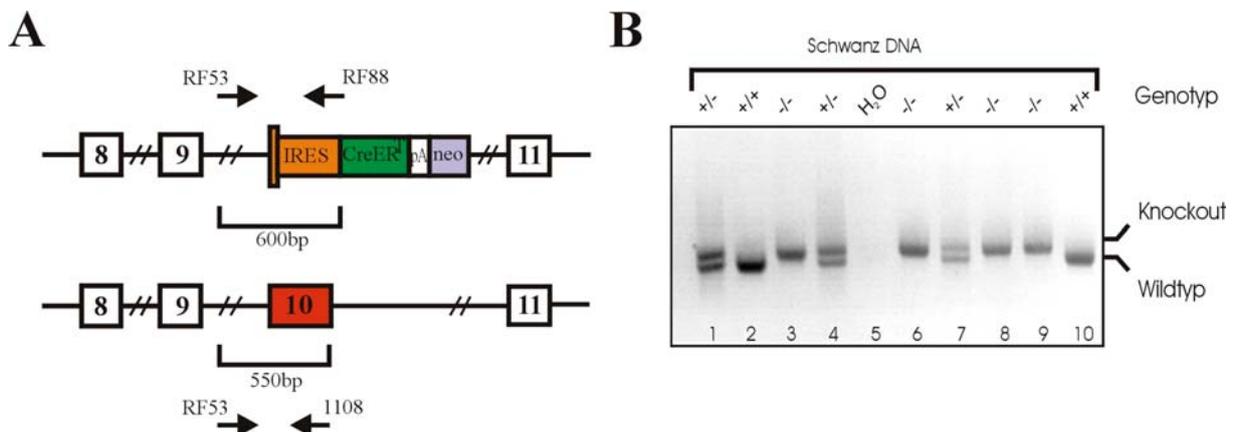


Abbildung C-1: (A) Gensequenz des cGKI-Wildtypallels (unten) und des GK-KI-Allels mit integrierter Kasette in Exon 10 (oben). Die zur Genotypisierung bei der PCR verwendeten Primer und die daraus resultierende Länge der amplifizierten Fragmente ist für beide Genotypen eingezeichnet. Abkürzungen: IRES (internal ribosomal entry site); CreER^T (Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinase); pA (Poly-Adenyl-Sequenz); neo (Neomycinresistenz-Kasette); bp (Basenpaar); RF53, RF88, 1108 (Primer Bindungsstellen) (B) PCR mit DNS aus Schwanzbiopsien von GK-KI-Mäusen (Knock-out) und Wildtyp-Mäusen. Nachgewiesen wurden die in Bildteil A gezeigten Fragmente.

<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3' Richtung)</i>	<i>Bindungsstelle</i>
RF53	CCTGGCTGTGATTTCACTCCA	Intron (vorwärts)
RF88	ACACATTCCACAGCTGGTTCT	IRES (rückwärts)
1108	CAGCTCTACTCGTCCGAAACC	Exon 10 (rückwärts)

Abbildung C-2: Angegeben sind die bei der Genotypisierung verwendeten Primer und ihre Bindungsstelle am Genlocus.

C.2 Morphologie und immunhistochemische Typisierung kultivierter VSMCs

Um die Validität der späteren $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen zu gewährleisten, musste zunächst überprüft werden, ob VSMCs aus cGKI^{-/-} und cGKI^{+/+} Mäusen unter Kulturbedingungen sowohl morphologisch als auch physiologisch vergleichbar sind.

C.2.1 Morphologie

Wie schon Vorversuche zu dieser Arbeit gezeigt haben (Rutz 2000), können cGKI^{-/-} und cGKI^{+/+} VSMCs lichtmikroskopisch nicht voneinander unterschieden werden (s. Abb. C-3). Die Zellen sind zum Beobachtungszeitpunkt in der Primärkultur jeweils über ca. 6 Tage in serumhaltigem Medium auf einer 10cm-Petrischale gewachsen bis sie zu 80-100% konfluent waren. VSMCs beider Genotypen haben das typische spindelförmige Aussehen sowohl in der Primärkultur (wie in Abb. C-3) als auch nach einmaliger Passage (nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich nach einer zweiten Passage eine zunehmende Umwandlung ihrer Morphologie zu einer mehr fibroblastenartig - polygonalen Form; dies war wiederum bei beiden Zelltypen zu beobachten. Wegen dieser augenscheinlichen Dedifferenzierung wurden für die Versuche nur Zellen der Primärkultur oder ersten Passage herangezogen (s. Abschnitt C.4.1 *Kultivierung und Transfektion der VSMCs*).

Außerdem waren auch die Wachstumsrate und Kultivierbarkeit der verschiedenen VSMCs unter Standardkulturbedingungen nicht voneinander zu unterscheiden. In der oben genannten Diplomarbeit (Rutz 2000) wurde zudem gezeigt, dass nicht nur unter den Kulturbedingungen in serumhaltigem Medium, sondern auch bei Belassen der Zellen in serumfreiem Medium für

zwei Tage kein morphologischer Unterschied zwischen Wildtyp- und Knock-out VSMCs erkennbar war.

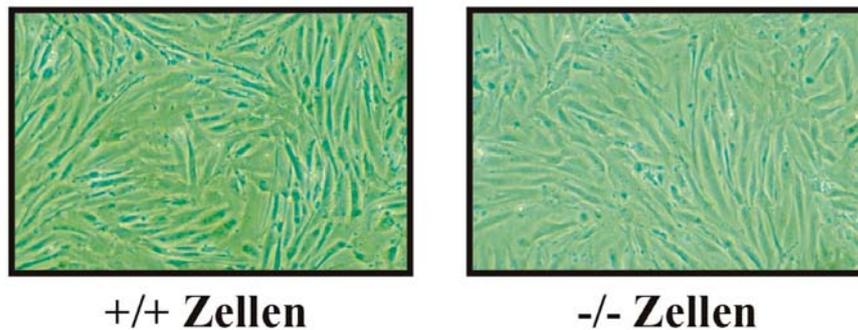


Abbildung C-3: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von Wildtyp- (links) und GK-KI-VSMCs (rechts) in serumhaltigem Medium (10% FCS), die über 6 Tage bis zu einer Konfluenz von 80-100% kultiviert worden waren. Diese Zellen einer Primärkultur zeigen die typische spindelartige Form von VSMCs. (Vergrößerung: 100x)

C.2.2 Immunhistochemische und biochemische Eigenschaften

Da kultivierte VSMCs dazu neigen, unter längerer Kultivierung und nach mehrmaliger Passage zu dedifferenzieren (C.2.1), musste zunächst überprüft werden, ob Wildtyp-VSMCs unter den in dieser Arbeit angewandten Kultur- und Messbedingungen ihre natürlichen physiologischen bzw. biochemischen Eigenschaften beibehalten. Für die Validität (Positivkontrolle) der in Abschnitt B.3.4 und C.4 beschriebenen $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen war vor allem eine uneingeschränkte Expression und Funktion beider Isoformen der cGKI in kultivierten Wildtyp-Zellen wichtig. Die Expression von cGKI konnte mit der immunhistochemischen Färbung von cGKI+/+ Zellen unter Verwendung eines Antikörpers nachgewiesen werden, der beide Isoformen des Enzyms bindet („cGKI-common“-Antikörper: Feil, Zimmermann et al. 2005; s. Abb. C-4A). Es zeigte sich eine deutliche perinukleäre Einfärbung, die sowohl die Anwesenheit der cGKI nachwies als auch Hinweise auf ihre mögliche intrazelluläre Lokalisation am ER gab. Die Immunfärbung der cGKI-/- Zellen fiel erwartungsgemäß negativ aus (nicht gezeigt). Die Färbungen wurden sowohl unter Wachstumsbedingungen (Belassen der Zellkultur in 10% FCS, nicht abgebildet) als auch unter Messbedingungen (serumfreies Medium; s. Abb. C-4A) durchgeführt und lieferten ähnliche Ergebnisse.

Eine Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen jeweils cGKI α bzw. I β (polyklonale Kaninchen-Antiseren, Geiselhoring, Gaisa et al. 2004) sollte dann zusätzlich klären, ob beide Isoformen der cGKI gleichermaßen exprimiert werden. Abbildung

C-4B zeigt eine deutliche Bande bei jedem Isoenzym sowie auch – mit einem weiteren spezifischen Antikörper - die Expression von IRAG, einem schon in Abschnitt A.4.2 genannten Steuerelement der $[Ca^{2+}]_i$ -Regulation in VSMCs (s. Abb. D-1).

Ein mögliches Problem war zudem, dass die Präparation der Mausaorten und anschließende Isolierung und Kultivierung der VSMCs nicht so selektiv und spezifisch vorgenommen werden konnte, dass nicht auch andere in der Aorta vorhandene Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten oder Adipozyten, in die Kultur aufgenommen würden (s. Abschnitt B.2). In der erwähnten Diplomarbeit (Rutz 2000) konnte mit einer immunzytochemischen Färbung des nur in VSMCs vorkommenden glattmuskulären α -Aktin (α -SM-Aktin) gezeigt werden, dass über 90% der kultivierten Zellen VSMCs waren (Ergebnis nicht abgebildet); die späteren $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen konnten also hinsichtlich des Zelltyps als ausreichend spezifisch angesehen werden.

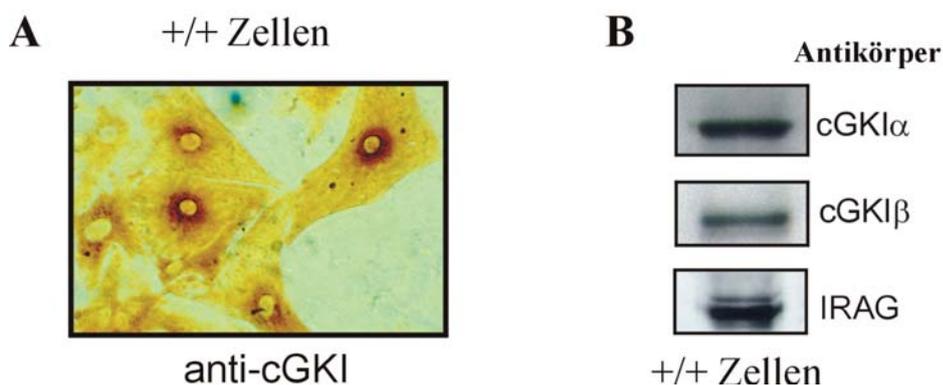


Abbildung C-4: (A) Immunzytochemische Darstellung von endogen gebildeter cGKI in serumfrei kultivierten +/+ Zellen (Primärkultur, Standardkulturbedingungen) mit einem Antikörper, der beide Isoformen darstellt (sog. „cGKI-common“-Antikörper). Zu sehen ist eine perinukleäre, bräunliche Einfärbung (Vergrößerung: 400x). Bei den -/- Zellen war keine Färbung nachweisbar (nicht gezeigt) (B) Nachweis von cGKI α , cGKI β und IRAG in Wildtypzellen mit einer Western Blot Analyse. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Robert Feil zur Verfügung gestellt)

Für ein aussagefähiges Ergebnis der späteren $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen war zwar der Nachweis der Spezifität der Zellkultur und die Expression des Schlüsselenzyms cGKI grundlegend; wichtig war aber auch der ungestörte Ablauf bestimmter biochemischer bzw. physiologischer Prozesse in den VSMCs: Erstens die Funktionsfähigkeit der cGKI unter Kulturbedingungen, zweitens unveränderte biochemische Eigenschaften in der Signaltransduktionskette stromaufwärts (NO-stimulierte cGMP-Bildung) und drittens auch der Ausschluss einer Interferenz der untersuchten Parameter mit anderen physiologischen Signaltransduktionspfaden (z.B. über cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKA)).

Die Abb. C-5B zeigt eine Western Blot Analyse von primär kultivierten Wildtyp- und cGKI-Knock-out VSMCs im Vergleich. Nachgewiesen wird dabei die Expression der cGKI in den Wildtyp-, nicht aber in den cGKI^{-/-} Zellen, mit dem bereits oben erwähnten „cGKI-common“-Antikörper (linker und rechter Bildteil, oben). Es wird aber auch VASP - ein spezifisches Substrat der cGKI und PKA - in seiner phosphorylierten Form an Position Ser-157 (p-VASP) mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Der jeweils untere Teil der abgebildeten Western Blots zeigt die relative Menge von p-VASP unter basalen Bedingungen sowie nach Stimulation mit DEA-NO (einem synthetischen NO-Donor) und 8-Br-cGMP - dem auch bei den späteren $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen verwendeten cGMP-Analogon. Dabei zeigt sich, dass die Menge von p-VASP in den cGKI^{+/+} Zellen unter Stimulation mit NO/cGMP zunimmt, cGKI ihre Funktion also ausübt (linker Bildteil). Diese Zunahme bleibt bei den cGKI^{-/-} Zellen erwartungsgemäß aus (rechter Bildteil).

Abschließend sollte noch sichergestellt werden, dass in cGKI^{+/+} und cGKI^{-/-} Zellen eine physiologische cGMP-Bildung erfolgt. Dazu wurde in beiden Zelltypen mit einem Enzymtest die cGMP-Konzentration in Ruhe und nach Stimulation mit DEA-NO bestimmt (s. Abb. C-5A). In den unstimulierten Zellen war cGMP in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar, während nach Inkubation mit DEA-NO cGMP deutlich anstieg, und zwar in Wildtyp- und Knock-out Zellen gleichermaßen. Dabei deutet das Säulendiagramm eine Sättigung der cGMP-Bildung unter ansteigenden Konzentrationen von DEA-NO an.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente beweisen einerseits, dass die NO/cGMP-Signaltransduktionskette unabhängig von der cGKI-Expression und unter den Bedingungen des Paradigmas dieser Arbeit funktionierte, und andererseits, dass DEA-NO und 8-Br-cGMP die endogen gebildete cGKI aktiviert, ohne dabei cAMP oder die Aktivität der PKA zu erhöhen.

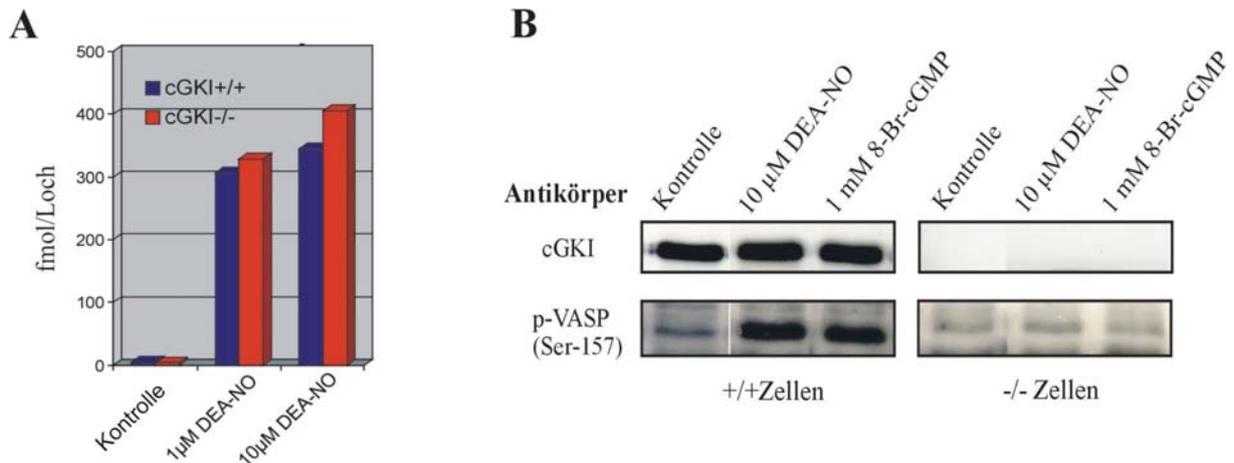


Abbildung C-5: (A) cGMP ist in Wildtyp- bzw. Knock-out Zellen ohne Stimulation nur in geringen Konzentrationen nachweisbar (Kontrolle). Nach Inkubation mit 1 bzw. 10 μmol/l DEA-NO (einem NO-Donor) für 10min steigt die Konzentration in beiden Zelltypen ohne signifikanten Unterschied zueinander stark an. Die Werte ergeben sich aus dem Median von n=3 gemessenen Proben je Säule (Primärkultur unter serumfreien Kulturbedingungen). (B) Western Blot Analyse eines Zelllysates von cGKI+/+ (links) und cGKI-/- Zellen (Primärkultur, Standardkulturbedingungen) mit dem oben erwähnten „cGKI-common“-Antikörper und einem Antikörper gegen an Serin 157 phosphoryliertem VASP (p-VASP; Bezugsquelle des Antikörpers: Alexis). Die Zellen waren entweder unbehandelt (Kontrolle) oder wurden vor der Analyse mit 10 μmol/l DEA-NO bzw. 1mmol/l 8-Br-cGMP für 10min inkubiert. Erläuterungen dazu finden sich im Text.

C.3 Eigenschaften transfizierter Zellen

C.3.1 Aufbau der Vektoren

Da die Konstruktion des Transfektionsvektors nicht Teil dieser Arbeit war, die verwendeten Plasmide aber ein grundlegender Bestandteil der unten beschriebenen Experimente sind, soll kurz auf ihre Zusammensetzung eingegangen werden.

Durch PCR-vermittelte Mutagenese wurde in die bovine cDNS der cGKI α eine *Bam*HI Restriktionssequenz integriert. Das resultierende *Eco*RI-*Bam*HI Fragment der cGKI α -cDNS wurde Ligase-vermittelt in die *Eco*RI-*Bam*HI Schnittstelle des Plasmids pEGFP-N1 (Clontech) inseriert. Dadurch entstand der unter einem CMV-Promotor (Cytomegalievirus) stehende, vollständige Vektor pCMV-cGKI α EGFP, wobei nun EGFP am Carboxyterminus des späteren Translationsproduktes integriert war, ohne dabei das Leseraster der cGKI α -cDNS zu verschieben.

Zur Herstellung des Konstruktes für die cGKI β -Isoform wurde lediglich das 1,8-kb *Eco*RI-*Pac*I Fragment von pCMV-cGKI α EGFP durch das 1,8-kb *Eco*RI-*Pac*I Fragment der bovinen cGKI β -cDNS ersetzt.

C.3.2 Charakterisierung transfizierter Zellen

Um ein verwertbares Ergebnis bei den Fura-2 Messungen mit transfizierten Zellen zu erhalten, mussten folgende Fragen geklärt werden: Erstens, nehmen die kultivierten Zellen die Liposomen in einem ausreichenden Maße auf und interferiert die Toxizität des Verfahrens mit den $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen? Wird zweitens in den transfizierten Zellen die cGKI α bzw. I β in Form des jeweiligen Fusionsproteins mit EGFP translatiert? Haben schließlich die Translationsprodukte (cGKI α -EGFP, cGKI β -EGFP) eine intakte Kinaseaktivität?

Die Zellen wurden auf 20mm-Deckgläsern für die Messungen angezüchtet und bei einer Konfluenz von ca. 80% nach dem oben genannten Protokoll transfiziert (B.1.6). Dabei war die Verträglichkeit der Lipofektion insgesamt gut. Einzelne Kulturen jedoch reagierten empfindlich auf das Verfahren mit der Lyse eines Teils ihrer Zellen. Bei den weiteren Messungen wurden nur Kulturen eingesetzt, die keine oder nur vereinzelte Zeichen der Zytotoxizität nach der Transfektion zeigten (kaum Lyse, keine zytoplasmatischen Granulationen). Durch einen Emissionsfilter von 515-535nm für die Detektion von EGFP bei einer Anregungswellenlänge von 480nm ließen sich im Durchschnitt 10-20 Zellen/Plättchen als eindeutig transfiziert identifizieren (s. Abb. C-6). Das entspricht einer geschätzten Transfektionsrate von 3-5%.

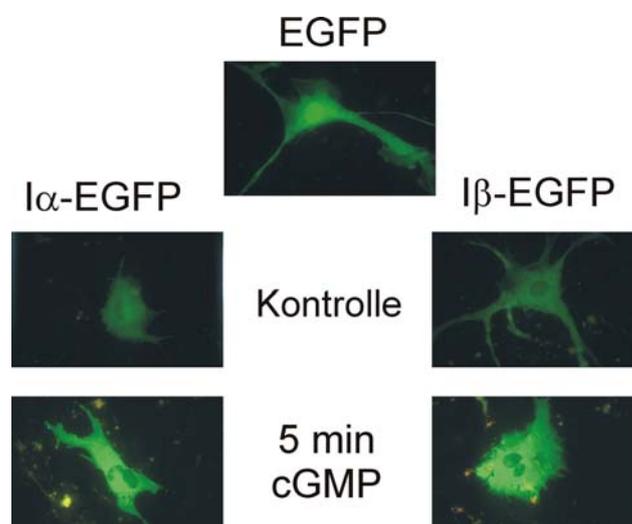


Abbildung C-6: Gezeigt sind unter serumfreien Bedingungen (B.2.2) kultivierte VSMCs nach Transfektion mit einem Vektor, der nur für EGFP kodiert (oberste Aufnahme) und Vektoren, die die Gensequenz für das Fusionsprotein der cGKI α (linke Seite) bzw. der cGKI β (rechte Seite) mit EGFP enthalten, jeweils durch einen Emissionsfilter von 515-535nm bei einer Anregungswellenlänge von 480nm aufgenommen. In allen Aufnahmen ist eine deutliche Fluoreszenz durch EGFP zu erkennen. Die beiden unteren Bilder sind nach einer 5minütigen Inkubation der Zellen mit 1mM 8-Br-cGMP gemacht worden. Dabei ist kein wesentlicher Effekt auf die Lokalisation des EGFP-Signals oder die Zellmorphologie nachweisbar. (Vergrößerung: 400x)

Da trotz der sichtbaren EGFP-Fluoreszenz der transfizierten VSMCs nicht automatisch davon ausgegangen werden kann, dass auch die cGKI-Isoenzyme bzw. dass sie als Fusionsprotein mit EGFP translatiert werden, wurden COS-Zellen mit den oben genannten Vektoren (C.3.1) transfiziert und anschließend eine Western Blot Analyse vorgenommen (Abb. C-7A). Dabei wurden zum Vergleich auch Vektoren eingesetzt, die nicht die Gensequenz für EGFP enthielten, sondern nur für das jeweilige Isoenzym kodierten. Die Banden bei ca. 75kDa entsprachen dem erwarteten Molekulargewicht der beiden cGKI-Isoformen. Die Banden bei ca. 100kDa bewiesen eine Translation der cGKI, die um das bekannte Molekulargewicht von EGFP (~30 kDa) zu dem cGKI α / β -EGFP Fusionskonstrukt erweitert worden war.

Die Fusionskonstrukte behielten sowohl ihre natürliche Kinaseaktivität als auch die Stimulierbarkeit durch cGMP bei. Dieser Schluss konnte gezogen werden aus Ergebnissen der *in vitro* Untersuchung der Kinaseaktivität von cGKI α , cGKI β und dem jeweiligen Fusionsprotein mit EGFP bei stufenweise ansteigenden Konzentrationen von cGMP. Es zeigte sich eine ~10fache Zunahme der Kinaseaktivität beider unveränderter cGKI-Isoformen und auch der Fusionskonstrukte mit EGFP. Der parallele, sigmoidale Kurvenverlauf der jeweiligen Isoform und ihrer EGFP-Mutante deutet auf eine unveränderte physiologische Funktion und Stimulierbarkeit hin (s. Abb. C-7B). Die Verschiebung der Aktivitätskurve von cGKI β und cGKI β -EGFP hin zu höheren cGMP-Konzentrationen lässt sich durch die bekannte geringere Sensitivität der cGKI β gegenüber cGMP im Vergleich zur cGKI α erklären (s. A.4.1; Pfeifer, Ruth et al. 1999).

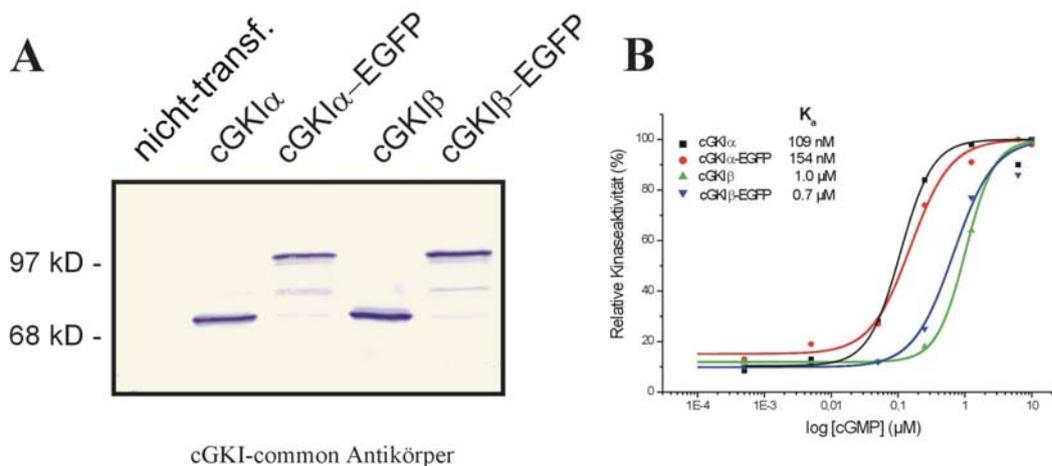


Abbildung C-7: (A) Western Blot Analyse von COS-Zellen, nachdem sie mit verschiedenen Plasmiden transfiziert worden waren. Die Plasmide kodierten für cGKI α bzw. β und das jeweilige Fusionsprotein mit EGFP. Angefärbt wurden die Banden mit einem Antikörper, der beide Isoformen bindet. Als Kontrolle wurden Zelllysate aus nicht-transfizierten Zellen ebenfalls mit dem Antikörper inkubiert (linke Spalte). Die Positionen der Marker für das Molekulargewicht sind angegeben. Weitere Erläuterungen im Text. (B) Kinaseaktivität beider Isoenzyme und Fusionsproteine bei ansteigenden Konzentrationen von cGMP. K_a : Aktivierungskonstante. Erläuterungen im Text. (Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Robert Feil zur Verfügung gestellt)

C.4 Durchführung der $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen mit Fura-2

C.4.1 Festlegung der Messbedingungen

Kultivierung und Transfektion der VSMCs

Die Zellen wuchsen auf den Plättchen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% heran. Diese Zelldichte läßt unter dem oben beschriebenen Versuchsaufbau die Fokussierung auf Einzelzellen zu; gleichzeitig werden die Zellen nicht vollständig aus ihrem Zellverband gelöst, der sich als wichtig für eine reproduzierbare Stimulierbarkeit erwiesen hat. Nach Erreichen ihrer optimalen Konfluenz wurden die Primärkulturen entweder passagiert (B.2.2) oder das serumhaltige Kulturmedium durch serumfreies ersetzt und die VSMCs für etwa 24h darin belassen, bevor sie der Lipofektion zugeführt wurden (s. folgenden Absatz und B.1.6). Durch das Umstellen von serumhaltigem auf serumfreies Kulturmedium treten die VSMCs von der Wachstumsphase in eine Stagnationsphase ein. In diesem Zustand reagieren sie aber deutlicher und verlässlicher auf die Hormongabe (Noradrenalin) und Testsubstanz (8-Br-cGMP). Für die Messungen wurden Zellen aus Primärkulturen und aus der 1. Passage herangezogen. Die Kulturbedingungen bzgl. Primärkultur oder 1. Passage sowie auch die Zeitspanne nach Umstellung auf serumfreies Kulturmedium bis zu den Messungen ist bei den Originaldaten im Anhang jeweils angegeben (s. F Anhang).

24-48 Stunden vor dem Messvorgang wurden die Zellen nach dem unter B.1.6 beschriebenen Verfahren transfiziert. Da die Lipofektion die Zellen belastet und auch zur Zytolyse führen kann, wurden nur Plättchen zur Messung herangezogen, auf denen höchstens vereinzelt lysierte Zellen (extrazelluläre Granulationen) und auch kaum intrazelluläre Granulationen als Zeichen der Zytotoxizität zu sehen waren. Neben der Lipofektion kann aber möglicherweise auch die Überexpression der transfizierten Konstrukte (cGKI α/β -EGFP) und insbesondere der EGFP-Anteil einen zytotoxischen Effekt haben.

Prinzip der Messung eines Doppeltransienten

Vorversuche haben gezeigt, dass sich VSMCs unter den beschriebenen Kultur- und Messbedingungen mit Noradrenalin (NA) stimulieren lassen und mit einer vorübergehenden Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ reagieren (Ca^{2+} -Transient). Das Problem bei der Messung dieser Transienten ist jedoch, dass jede VSMC mit unterschiedlicher Intensität ($[Ca^{2+}]_{i-max}$) und auch unterschiedlichem zeitlichen Verlauf (Form und Dauer) ihres Transienten auf die NA-Stimulation antwortet. Deshalb wurde das Prinzip des Doppeltransienten angewandt. Es

gewährleistet durch die wiederholte Stimulation derselben Zelle nach einem definierten Intervall (10min) und die Quotientenbildung des Integrals des 2. zum 1. Transienten eine interne Standardisierung des Messergebnisses. In den unten aufgeführten und erläuterten Messergebnissen (C.4.2) schwankte dieser Quotient ohne Zugabe von 8-Br-cGMP sowohl bei cGKI+/+ als auch bei cGKI-/- VSMCs immer um 100% (s. Abb. B-4 in Abschnitt B.3.4), d.h. beide Transienten waren hinsichtlich ihrer Kenngrößen ($[Ca^{2+}]_{i-max.}$, Form, Dauer) vergleichbar. Weiterhin stellte sich auch kein Unterschied dieser Kenngrößen bei Vergleich von Wildtyp- mit Knock-out Zellen bzw. Zellen aus einer Primärkultur und der 1. Passage heraus.

Nachdem ein 1. Transient ausgelöst worden war, der allen Auswahlkriterien genügte (s. Tab. C-1; B.3.4: *Auswahlkriterien*), wurde die Belichtung unterbrochen und nach 4 Minuten 1mM 8-Br-cGMP zugegeben. Nach 6 Minuten Inkubation mit 8-Br-cGMP wurde dann erneut mit NA stimuliert.

Bedingungen zur Messung und Auswertung

Um sowohl die Vergleichbarkeit der gemessenen Zellen untereinander zu erhöhen als auch unphysiologisch reagierende VSMCs herauszufiltern, wurden in Vorversuchen (Rutz 2000) Kriterien definiert, nach denen Zellen vor einer Stimulation ausgewählt bzw. gemessene Transienten in die Auswertung aufgenommen wurden. Diese sind in der Tabelle C-1 zusammengefasst.

<i>Kriterien bei der Zellauswahl</i>
<ul style="list-style-type: none"> • VSMC-Morphologie: keine polygonale Form, mononukleär, physiologische Zellgröße • Fluoreszenz der mit Fura-2 beladenen Zellen im mittleren Intensitätsbereich • EGFP-Fluoreszenz im unteren Intensitätsbereich
<i>Kriterien bei der Transientenauswahl</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Basislinie der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen 100-500 Einheiten • Konstante Basalkonzentration von $[Ca^{2+}]_i$ • Unmittelbarer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation • $[Ca^{2+}]_{i-max}$ zwischen 600-1200 Einheiten • $[Ca^{2+}]_i$ fällt nach Stimulation innerhalb von 100 Sek. um mind. 66% des transienten Ca^{2+}-Zuwachses auf einen stabilen Wert ab

Tabelle C-1: Kriterien bei der Zellauswahl und Auswertung der Transienten.

Die Morphologie der VSMCs ist ein Kriterium bei der Zellauswahl, da - wie in Abschnitt C.2 erwähnt - nicht-glattmuskuläre oder dedifferenzierte Zellen unter Kulturbedingungen vereinzelt auftreten und ausselektiert werden müssen. Wichtig ist aber weiterhin, dass die Beladung der Zielzelle mit Fura-2 in einem mittleren Bereich liegt, denn eine hohe Fluoreszenz deutet auf eine unphysiologisch hohe basale $[Ca^{2+}]_i$ hin und erhöht auch die (photo-)toxische Wirkung von Fura-2 auf die Zelle. Die Fluoreszenz von EGFP sollte sogar immer im unteren Intensitätsbereich liegen, da die Translation von EGFP ja an die Translation der transfizierten cGKI gekoppelt ist und diese so der *in vivo* bestehenden niedrigen cGKI-Konzentration angenähert wird.

Die nach Stimulation gemessenen Transienten mussten alle von einem konstanten Basalwert der $[Ca^{2+}]_i$ im Bereich von 100-500 Einheiten ausgehen, unmittelbar auf die Hormongabe folgen, ein Maximum von 600-1200 Einheiten erreichen und dann innerhalb von 100 Sekunden zum Basalwert (\pm 33%) zurückkehren. Die Einheiten ergeben sich als relativer Wert der $[Ca^{2+}]_i$ aus dem Algorithmus, nach dem die Emissionsintensitäten von Fura-2 bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge in ein Verhältnis gesetzt werden (s. Abschnitt B.3.1). Aus dem Algorithmus folgt ein nicht-linearer Verlauf der Skalierung, der auf absolute Konzentrationen geeicht werden kann. Die Messung der absoluten Calciumkonzentration hat sich aber bei diesem Versuchsaufbau als ungenau herausgestellt und war für die Fragestellung auch nicht relevant.

Ein hoher Prozentsatz der transfizierten und EGFP-positiven Zellen ließ sich durch NA stimulieren (\sim 70%), jedoch erfüllten nur 5-10% der 1. Transienten dieser Zellen alle o.g. Kriterien. Bei den nicht-transfizierten Zellen waren \sim 90% stimulierbar und über 40% der Transienten hielten den Bedingungen zur Auswertung Stand. Bis ein verwertbarer Doppeltransient in die Auswertung aufgenommen werden konnte, mussten oft mehrere Zellen auf einem Plättchen gemessen werden. Dabei ist eine gründliche Spülung der Messkammer mit Tyrode-Lösung zwischen den Messungen sehr wichtig, um auch kleine Hormonrückstände bei der folgenden Messung zu vermeiden. Dieser Vorgang konnte bis zu 5-7mal wiederholt werden. Waren bis dahin alle Versuche erfolglos, wurde das Plättchen verworfen. Nach Zugabe von 8-Br-cGMP war die Auswahl einer neuen Zelle nicht mehr möglich.

Bei der geringen „Ausbeute“ transfizierter Zellen wurden im besten Falle 2-4 Doppeltransienten pro Tag gemessen.

C.4.2 Messergebnisse

Das Ziel der $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen mit Fura-2 war der Vergleich der Wirkung des membrangängigen cGMP-Analogons 8-Br-cGMP auf die NA-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Wildtyp-VSMCs (beide cGKI-Isoenzyme vorhanden) mit der Wirkung auf Zellen, die jeweils nur ein Isoenzym exprimieren.

Im Folgenden sind nun die Ergebnisse der Messungen der einzelnen Zelltypen getrennt dargestellt.

C.4.2.1 Wirkung von 8-Br-cGMP auf EGFP-transfizierte Wildtyp-VSMCs

Als Kontrollgruppe wurden Wildtyp-Zellen herangezogen, die nur mit EGFP transfiziert worden waren. Zunächst wurde ein Doppeltransient ausgelöst, ohne die Zellen 8-Br-cGMP auszusetzen. Die AUC des 2. Transienten entsprach mit einer nur geringen Standardabweichung der AUC des 1. Transienten (Abb. C-8B, linker Balken). Nach Zugabe von 8-Br-cGMP wurde der NA-induzierte Ca^{2+} -Transient auf ~60% unterdrückt (Abb. C-8B, rechter Balken). Eine Erniedrigung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ war nach Einwirken des cGMP-Analogons nicht erkennbar. Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz und von Noradrenalin sind in der Legende von Abb. C-8 angegeben.

Die AUC der Transienten transfizierter cGKI+/+-Zellen war insgesamt kleiner als ohne Transfektion, auch die Unterdrückung der Ca^{2+} -Freisetzung entsprach nicht den niedrigeren Werten von nicht-transfizierten Zellen, bei denen die Ca^{2+} -Antwort nach der 2. Stimulation oft vollständig unterdrückt wurde. Diese Beobachtung ergab sich aus dem Vergleich der Transienten bei Wildtyp-VSMCs in diesem Versuchsaufbau mit Transienten des gleichen Zelltyps ohne Transfektion, die in Vorversuchen zu dieser Arbeit gemessen worden waren (Rutz 2000). Weil sich der Versuchsablauf beider Messreihen im Wesentlichen nur durch die Anwendung der Transfektion unterschied und die Auswertung demselben Algorithmus folgte, wurde dies auf spezifische Effekte der Lipofektion (Spector 1998) und/oder die Anwesenheit des EGFP-Proteins zurückgeführt. Da aber Transienten verlässlich auslösbar waren und jede Zelle durch den 1. Transienten intern standardisiert wurde, ließ sich durch diese Beobachtung kein Einfluss auf die Validität der Messergebnisse von EGFP-transfizierten Zellen ableiten.

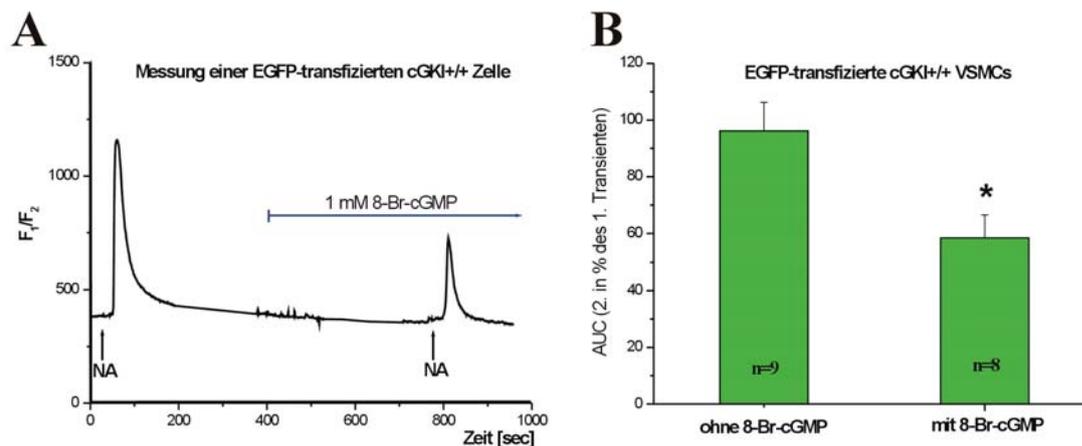


Abbildung C-8: Wirkung von 8-Br-cGMP auf Noradrenalin (NA)-induzierte Ca²⁺-Transienten in EGFP-transfizierten cGKI+/+ Zellen. (A) Repräsentativer Doppeltransient, ausgelöst durch Stimulation mit 1µM Noradrenalin (NA). 4min nach Rückkehr auf basale [Ca²⁺]_i-Werte Inkubation mit 1mM 8-Br-cGMP für weitere 6min. Danach erneute Stimulation. F₁/F₂ entspricht dem Quotienten der Fluoreszenzemissionsintensitäten bei 350nm (F₁) und 380nm (F₂). (B) Histogramm mit Zusammenfassung aller Messergebnisse mit und ohne Zugabe von 1mM 8-Br-cGMP. Gezeigt ist der Mittelwert der Verhältnisse der AUC des 2. zum 1. Transienten und die Anzahl (n) der jeweils gemessenen VSMCs. Signifikanter (*) Unterschied bei p<0.01 (Student *t*-Test) der Kontrolle (linker Balken) zu VSMCs unter 8-Br-cGMP-Wirkung (rechter Balken).

C.4.2.2 Wirkung von 8-Br-cGMP auf cGKIα-EGFP-transfizierte VSMCs

Auch bei cGKIα-EGFP-transfizierten Knock-out Zellen war das Integral des 2. Transienten in Abwesenheit von 8-Br-cGMP dem Integral des 1. Transienten ähnlich (s. Abb. C-9B). Die Wirkung des cGMP-Analogons auf die hormoninduzierte Ca²⁺-Freisetzung war - wie bei den EGFP-transfizierten cGKI+/+ VSMCs - eine deutliche Unterdrückung. Sie nahm mit ca. 65% ungefähr den gleichen %-Wert wie bei den Wildtyp-Zellen an (vgl. Abb. C-9B und C-8B). Eine Veränderung der basalen [Ca²⁺]_i war ebenfalls nicht nachweisbar; dies war ja auch ein Kriterium für die Aufnahme gemessener Zellen in die Auswertung. Die Intensität der EGFP-Fluoreszenz als Indikator für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen entsprach durchweg sowohl den lediglich mit EGFP transfizierten Wildtyp-Zellen als auch den cGKIβ-EGFP-transfizierten VSMCs. Das wurde als Bestätigung gewertet, dass die Fusionsproteine aus EGFP und cGKIα bzw. cGKIβ eine vergleichbare Expressionshöhe erreichten (s. Abschnitt C.3.2) und unterstreicht die Aussagekraft der Messergebnisse.

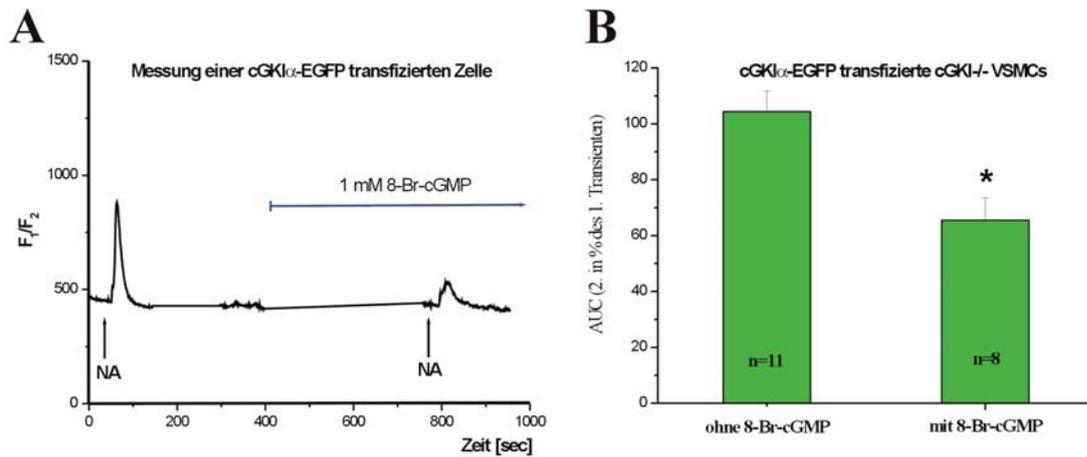


Abbildung C-9: Wirkung von 8-Br-cGMP auf Noradrenalin (NA)-induzierte Ca^{2+} -Transienten in cGKI α -EGFP-transfizierten cGKI α -/- VSMCs. (A) Repräsentativer Doppeltransient bei Inkubation mit 1mM 8-Br-cGMP für 6min. F_1/F_2 entspricht wiederum dem Quotienten aus den Fluoreszenzemissionsintensitäten bei 350nm (F_1) und 380nm (F_2). **(B)** Histogramm mit Zusammenfassung aller Messergebnisse mit und ohne Zugabe von 1mM 8-Br-cGMP. Gezeigt ist der Mittelwert der Verhältnisse der AUC des 2. zum 1. Transienten und die Anzahl (n) der jeweils gemessenen VSMCs. Signifikanter (*) Unterschied bei $p < 0.01$ (Student *t*-Test) der Kontrolle (linker Balken) zu VSMCs unter 8-Br-cGMP-Wirkung (rechter Balken).

C.4.2.3 Wirkung von 8-Br-cGMP auf cGKI β -EGFP-transfizierte VSMCs

Wie schon bei den vorhergehenden Messungen hatte die Transfektion selbst keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit und Höhe einer zweiten Stimulation mit NA. Im Gegensatz zu cGKI α beeinflusste die cGKI β unter cGMP-Aktivierung den hormoninduzierten Ca^{2+} -Transienten jedoch nicht signifikant (s. Abb. C-10).

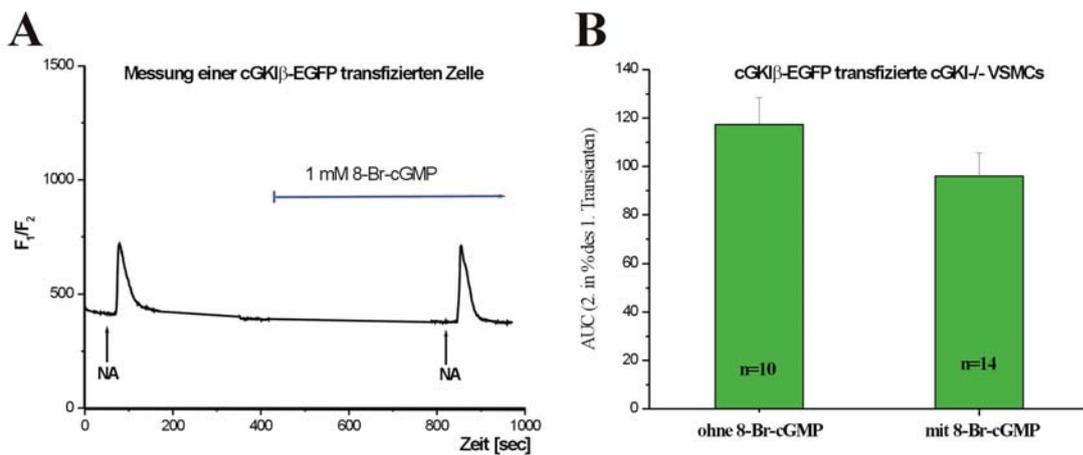


Abbildung C-10: Wirkung von 8-Br-cGMP auf Noradrenalin (NA)-induzierte Ca^{2+} -Transienten in cGKI β -EGFP-transfizierten cGKI β -/- VSMCs. (A) Repräsentativer Doppeltransient unter den gleichen Messbedingungen wie in Abb. C-8 und C-9 beschrieben. **(B)** Histogramm aller Messergebnisse mit und ohne Zugabe von 1mM 8-Br-cGMP. Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (linker Balken) bei Anwesenheit von 8-Br-cGMP (rechter Balken). $p < 0,01$ (Student *t*-Test)

D Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, welche Isoform der cGKI - cGKI α oder cGKI β - die Hauptrolle in der Regulation bzw. bei der Erniedrigung der zytosolischen [Ca²⁺]_i in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) der Mauseorta innehat. Zur Untersuchung dieser Frage wurde ein genetischer Ansatz etabliert, in dem VSMCs aus cGKI-Knock-out (cGKI^{-/-}) Mäusen kultiviert und nach Transfektion mit jeweils nur einer Isoform der cGKI Messungen der [Ca²⁺]_i nach der Fura-2-Methode unterzogen wurden. Dabei wurde das Prinzip der zweimaligen Hormonstimulation einer Zelle (Doppeltransient) angewandt und die Unterdrückung des zweiten Transienten nach Inkubation mit dem cGK-Aktivator 8-Br-cGMP statistisch ausgewertet (interne Standardisierung). Der Vergleich der Messergebnisse sowohl der mit cGKI α oder cGKI β transfizierten VSMCs untereinander als auch mit Wildtyp-VSMCs ergab eine Unterdrückung der hormoninduzierten [Ca²⁺]_i-Erhöhung durch die cGKI α .

Durch die deutliche Aussage der durch diesen genetischen Versuchsansatz gewonnenen Ergebnisse konnte auch ein Verfahren zur Analyse von Enzymwirkungen etabliert werden, das die Nachteile des klassischen pharmakologischen Ansatzes umgeht.

D.1 Genetische, morphologische und molekularbiologische Typisierung kultivierter vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMCs)

Der Genotyp der eingesetzten Mausmutanten (cGKI^{-/-}) und der Wildtyp-Mäuse (cGKI^{+/+}) wurde vor der Anzucht der VSMCs aus den jeweiligen Aorten bestimmt (C.1). Das basale Wachstumsverhalten, die Vitalität und auch die Morphologie der VSMCs beider Genotypen zeigten unter den angewandten Kulturbedingungen keine erkennbaren Unterschiede (C.2.1). Sowohl in der Primärkultur als auch nach einmaliger Passage - nur diese Zellkulturen wurden für die weiteren Experimente herangezogen - besaßen die Zellen die typische spindelartige Form (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979). Es ließ sich somit schließen, dass das Fehlen der cGKI keinen nennenswerten Einfluss auf essentielle Funktionen der kultivierten VSMCs hatte.

Auch konnte schon in Vorversuchen zu dieser Arbeit (Rutz 2000) eine Kontamination kultivierter VSMCs mit anderen Zellarten bzw. mangelnde Spezifität bei der Zellselektion durch die Präparation von Aortengewebe durch den immunhistochemischen Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin ausgeschlossen werden (VSMCs >90%; s. auch C.2.2).

Das Fundament der Messungen war einerseits der Nachweis sowohl der Anwesenheit als auch der Funktionsfähigkeit der cGKI bzw. beider Isoformen in den cGKI^{+/+} VSMCs; andererseits jedoch auch das Vorhandensein und die intakte Funktion des Signaltransduktionsweges stromaufwärts der cGKI in beiden Genotypen.

In Abschnitt C.2.2 konnte in cGKI^{+/+} Zellen eine vergleichbar hohe Expression beider cGKI-Isoformen bestätigt werden. Ebenso wurde ein Verlust der Expression des für die $[Ca^{2+}]_i$ -Regulation durch die cGKI mutmaßlich wichtigen Steuerelementes IRAG (Schlossmann, Ammendola et al. 2000) in Wildtyp-Zellen unter Kulturbedingungen ausgeschlossen. Die Funktionsfähigkeit, d.h. auch Stimulierbarkeit der cGKI konnte durch die Darstellung einer Zunahme von phosphoryliertem VASP - einem Substrat der cGKI - sichergestellt werden; das gleiche Experiment widerlegte die Möglichkeit einer Interferenz mit dem parallel laufenden Signaltransduktionsweg über die PKA (C.2.2). Theoretisch könnte auch eine Interferenz durch eine kompensatorische Hochregulation der PKA in cGKI^{-/-} VSMCs entstehen. Auf diese Weise wäre eine Kreuzaktivierung der PKA - und damit eine nicht-cGKI-vermittelte Relaxation der SMC - bei physiologischen cGMP-Konzentrationen denkbar (Bonnievier, Fassler et al. 2004).

Stromaufwärts der cGKI konnte durch die Bestätigung einer intakten cGMP-Bildung durch NO-Donoren eine lückenlose Signalkaskade belegt werden (C.2.2).

Die oben beschriebenen Ergebnisse (bis auf das Fehlen der cGKI in cGKI^{-/-} VSMCs) wurden bei Wildtyp- und Knock-out-Zellen gleichermaßen gewonnen; von einer Vergleichbarkeit beider Zelltypen in Hinsicht auf ihre biochemischen Eigenschaften im Umfeld der cGKI konnte also ausgegangen werden.

D.2 Eigenschaften transfizierter Zellen

Die Kopplung von cGKI α/β -DNS an die DNS von EGFP und das anschließende Einschleusen in die VSMCs musste zwei grundlegende Bedingungen erfüllen: Erstens eine vollständige Translation und intakte Funktion des Fusionskonstruktes und zweitens keine toxische Wirkung auf die Zielzellen. An transfizierten COS-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die cGKI α - bzw. cGKI β -EGFP Fusionsproteine mit dem erwarteten Molekulargewicht translatiert wurden und eine zu den nativen cGKI-Isoformen vergleichbare Kinaseaktivität und Stimulierbarkeit durch cGMP beibehielten (C.3.2).

Erfolgreich transfizierte und mit cGMP inkubierte Zellen ließen sich morphologisch nicht von der bekannten Form kultivierter VSMCs unterscheiden (s. Abb. C-6). Bei der Auswahl transfizierter Zellen wurde auch darauf geachtet, dass die EGFP-Fluoreszenz im gerade noch sichtbaren Bereich lag (C.4.1 *Bedingungen zur Messung und Auswertung*). Damit sollten mögliche toxische Effekte von EGFP auf die Zellen ausgeschlossen oder zumindest minimiert werden. Zudem sollten unphysiologisch hohe Expressionsraten der an EGFP gekoppelten cGKI-Isoformen vermieden werden. Insgesamt wurde durch EGFP als Markerprotein kein nachteiliger Effekt auf die VSMCs oder eine Interferenz mit der Fura-2 Fluoreszenzmessung beobachtet (B.3.2).

Da aber doch vereinzelt toxische Effekte der Lipofektion zu beobachten waren (C.3.2), konnte die Transfektion selbstverständlich nicht als biologisch inert betrachtet werden. Bei der Kontrollgruppe der lediglich mit EGFP transfizierten Wildtyp-Zellen ließen sich bei den $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen aber reproduzierbar Doppeltransienten auslösen (C.4.2.1, D.3), weshalb von einer ausreichenden Validität der Messungen auch nach Lipofektion ausgegangen werden konnte.

D.3 Interpretation der $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen mit Fura-2

In Vorversuchen wurde bereits das Verfahren zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit NA in kultivierten VSMCs etabliert (Rutz 2000). Dabei wurden auch Bedingungen bei der Zell- und Transientenauswahl definiert, die eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Messungen garantieren sollten. Diese Bedingungen sind für den in dieser Arbeit angewandten Versuchsaufbau (Transfektion, EGFP-Markierung, andere Messapparatur) adaptiert bzw. erweitert worden (B.3.4: *Optimierte Parameter, Auswahlkriterien*; C.4.1 *Bedingungen zur Messung und Auswertung*).

Das Prinzip des Doppeltransienten (B.3.4: *Ablauf der Messung*; C.4.1: *Prinzip der Messung eines Doppeltransienten*) hat sich in dieser Arbeit bewährt, da es durch die Verhältnisbildung des 2. zum 1. Transienten eine interne Standardisierung jeder Einzelzellmessung ermöglicht. Die AUC des 2. Transienten zur AUC des 1. Transienten entsprach bei beiden Genotypen (cGKI+/+, cGKI/-) sowohl mit als auch ohne Transfektion und in Abwesenheit von 8-Br-cGMP durchgängig ~100% (C.4.2 bei transfizierten VSMCs). Nach Inkubation mit 8-Br-cGMP konnte so der Grad der Unterdrückung des 2. Transienten am 1. definiert werden. Damit waren die Ergebnisse unabhängig von natürlichen Unterschieden in der Ca^{2+} -Antwort auf NA-Stimulation und auch in der Ansprechbarkeit auf 8-Br-cGMP interpretierbar.

Trotz der beschriebenen externen und internen Standardisierung war die Reaktion der VSMCs auf Hormon und Testsubstanz sehr variabel; das machte eine Mindestanzahl (n=10-15) von Messungen jedes Genotyps nötig, um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten (C.4.2). Um eine Vorinterpretation der Messergebnisse zu vermeiden, wurden alle Messungen und auch die Auswertung der Einzeltransienten im Blindversuch durchgeführt (B.3.5).

Die Fura-2-Methode selbst ist nach einer Jahrzehnte dauernden Weiterentwicklung der Methodik gegenwärtig wohl das beste Verfahren, um *in vivo* die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu berechnen, die intrazelluläre Verteilung von Ca^{2+} und auch Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ visuell darzustellen (B.3.1). Besonders mit moderner konfokaler Laser-Mikroskopie kombiniert lassen sich auch subzelluläre Verteilungsmuster und lokalisierte dynamische Änderungen (Jaggar, Porter et al. 2000) von freiem Ca^{2+} gut sichtbar machen. Dennoch besitzt diese Methode einige Einschränkungen ihrer Aussagekraft. So ist es z.B. nicht möglich, gebundenes Ca^{2+} oder die Richtung von Ca^{2+} -Bewegungen darzustellen. Auch bei der bestmöglichen Bildtechnik ist die räumliche und zeitliche Auflösung doch begrenzt. Kleine und sehr schnelle Ca^{2+} -Bewegungen, wie sie bei der Regulation von Funktionsproteinen oder über Ca^{2+} -transportierende Proteine des Sarkolemmes auftreten, sind so nicht erkennbar (Karakı 2004). Da in dieser Arbeit aber nur globale Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Bereich von 500-1000msek gemessen wurden, war die Methode mit Fura-2 ohne konfokale Laser-Mikroskopie für die Fragestellung ausreichend.

D.4 Wirkung von cGKI α und cGKI β auf die Noradrenalin-stimulierte Erhöhung der freien zytoplasmatischen [Ca²⁺]_i]

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Funktion der Isoenzyme der cGKI - cGKI α und cGKI β - in dem Signaltransduktionsweg über NO und cGMP in primär kultivierten VSMCs untersucht. Da spezifische Inhibitoren der jeweiligen Isoformen nicht zur Verfügung stehen und Inhibitoren der cGKI ohnehin nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen (Burkhardt, Glazova et al. 2000), wurde in einem genetischen Ansatz in cGKI-defiziente VSMCs jeweils ein Isoenzym eingeschleust. Dabei wurde die defekte [Ca²⁺]_i-Regulation über cGMP in den cGKI α -EGFP-transfizierten Zellen wiederhergestellt (C.4.2.2), während in cGKI β -EGFP-transfizierten Zellen eine Wirkung von 8-Br-cGMP unterblieb (C.4.2.3). Das lässt darauf schließen, dass die cGKI α NA-induzierte Ca²⁺-Transienten unterdrücken bzw. die Relaxation von VSMCs vermitteln kann. Schon in früheren Arbeiten konnte ein Hormon-stimulierter Ca²⁺-Transient in cGKI α -transfizierten CHO-Zellen unterdrückt werden (Ruth, Wang et al. 1993; Pfeifer, Nurnberg et al. 1995), aber nicht in cGKI β -transfizierten 293- oder 3T6-Zellen (Meinecke, Geiger et al. 1994). Andererseits konnten nach cGKI β -Transfektion und Bradykinin-Stimulation in COS-Zellen Ca²⁺-Transienten durch cGMP supprimiert werden (Ammendola, Geiselhoringer et al. 2001). Somit könnte die Aktivierung und Wirkung der cGKI-Isoenzyme vom Zelltyp oder Aktivierungsweg abhängen, was bei der Interpretation widersprüchlicher Forschungsergebnisse zur Funktion der cGKI-Isoenzyme in Erwägung gezogen werden sollte.

Die Eingriffspunkte der cGKI α in die Mechanismen der [Ca²⁺]_i-Regulation konnten durch die Messung der Ca²⁺-Transienten nicht geklärt werden. Indirekte Hinweise auf die Funktion der cGKI α geben histologische und intrazelluläre Verteilungsmuster dieses Enzyms, die eine Wirkung über IRAG nicht vollständig ausschließen lassen (Geiselhoringer, Gaisa et al. 2004). Eine Unterdrückung der Ca²⁺-Transienten könnte durch eine Hemmung der InsP₃-Produktion vermittelt werden (Ruth, Wang et al. 1993). Andere Arbeiten identifizierten einen niederohmigen Ca²⁺-sensitiven K⁺-Kanal (BK_{Ca}) im Sarkolemm als ein mögliches Substrat, der nach Aktivierung durch die cGKI α indirekt durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran den Ca²⁺-Influx über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (VOCCs = L-type Ca²⁺-Kanal) inhibiert (Swayze and Braun 2001). Jüngst wurde ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für die Inhibition der Hormon-induzierten Ca²⁺-Freisetzung durch die cGKI α identifiziert; dabei scheint cGKI α über die Aktivierung von RGS2 („regulator of G protein signaling 2“) in die G_q-Protein-vermittelte Signaltransduktion hemmend einzugreifen (Hofmann, Feil et al.

2006). Einige Forschungen deuten auch auf eine Wirkung der cGKI α am ER hin, d.h. entweder eine Inhibition der Ca²⁺-Freisetzung (Tertyshnikova, Yan et al. 1998; Murthy and Zhou 2003) oder eine Steigerung der Wiederaufnahme von Ca²⁺ (Cohen, Weisbrod et al. 1999). Abb. D-1 zeigt einen Überblick dieser Modellvorstellungen.

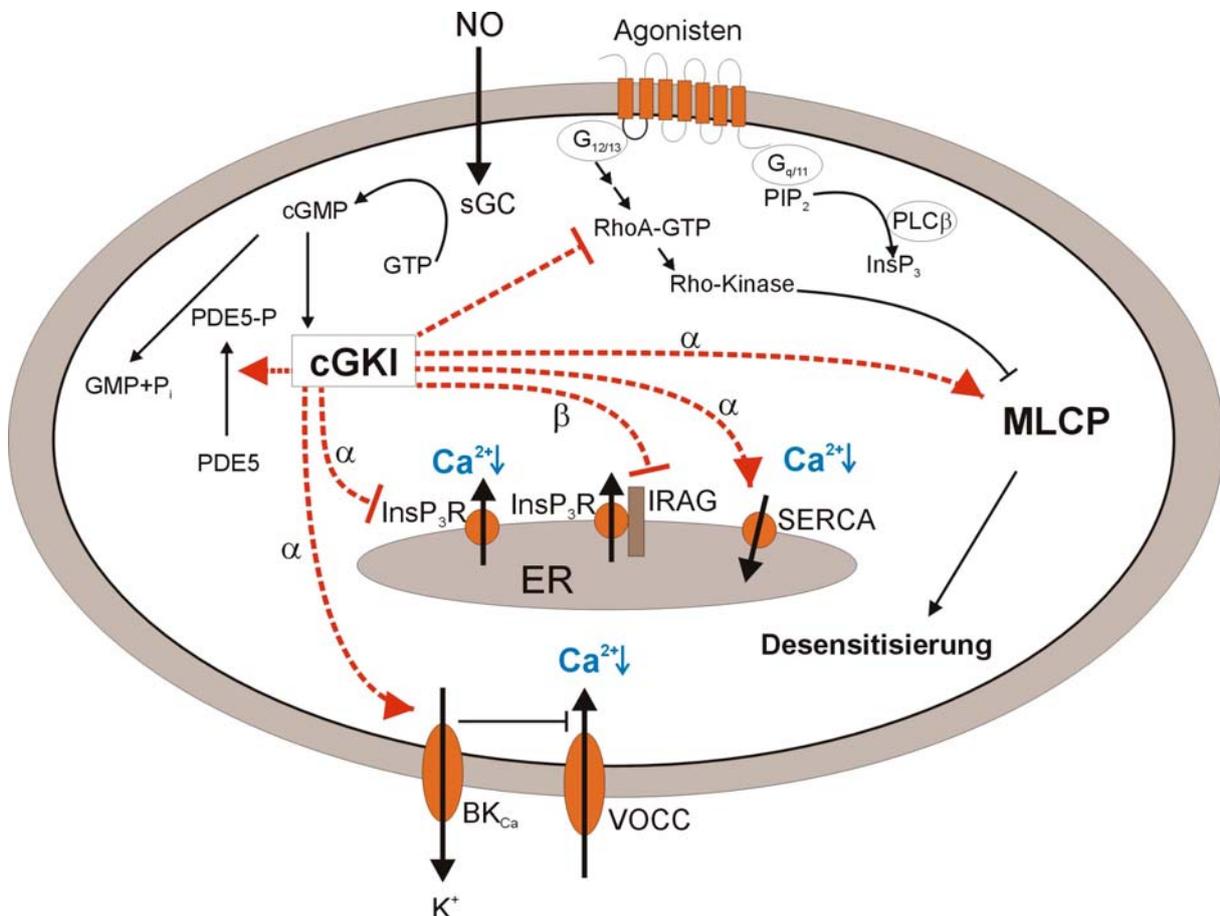


Abbildung D-1: Übersicht über mögliche cGKI-regulierte Abläufe bei der Relaxation der SMC. SERCA: Sarkoplasmatisches Retikulum Ca²⁺-ATPase; VOCC: spannungsabhängiger (L-type) Ca²⁺-Kanal; α/β : vermutete Isoform-spezifische Wirkungen, einige noch keinem Isoenzym zuzuordnen (ohne Bezeichnung). Rote Pfeile deuten eine Aktivierung, rote Balken eine Inhibition des betreffenden Signalweges bzw. Funktionsproteins an. (Erklärung und weitere Abkürzungen im Text)

Überraschend an den Ergebnissen dieser Arbeit war das Fehlen einer Wirkung der cGKI β auf die NA-stimulierten Ca²⁺-Transienten (C.4.2.3). Es gibt nämlich Studien, die eine enge Interaktion der cGKI β mit IRAG und InsP₃R am ER und eine Inhibition der InsP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung über diesen Signalweg beschreiben (Schlossmann, Ammendola et al. 2000; Ammendola, Geiselhoring et al. 2001). Untersuchungen an Kolon-SMCs unterstrichen eine bedeutende Rolle von IRAG für die Unterdrückung der InsP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung durch cGMP (s. Abb. D-1; Fritsch, Saur et al. 2004). Vor kurzem wurde eine Mausmutante generiert, die ein um eine Proteininteraktionsdomäne verkürztes IRAG

exprimiert (Geiselhöringer, Werner et al. 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit und der dort durchgeführten Ca^{2+} -Messungen deuten auf eine wichtige Rolle von IRAG bei der Unterdrückung hormoninduzierter Ca^{2+} -Transienten durch cGMP und auch schon bei der Regulation der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMCs hin. Die depolarisationsinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung bzw. deren Unterdrückung durch cGMP war in den IRAG-Mutanten aber nicht beeinträchtigt. Bei der Interpretation von so gewonnenen Ergebnissen sollten die möglicherweise weitreichenden Auswirkungen einer Genmutation schon im Embryonalstadium und in allen Organsystemen eines Organismus einbezogen werden. Auch lassen sich unbekanntes Wechselwirkungen von Proteinmutanten auf zellulärer Ebene nicht ausschließen. Es wird zudem diskutiert, ob die cGKIβ eine Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Genexpression spielen könnte (Feil, Lohmann et al. 2003).

Eine Erklärung für die Uneinheitlichkeit und Uneindeutigkeit der erwähnten Erkenntnisse einschließlich auch der Schlussfolgerungen dieser Arbeit könnte neben o.g. Gründen wiederum der Einsatz verschiedener Zelltypen (z.B. VSMCs, SMCs anderer Organe, Zelllinien) und die Stimulation der Zellen über unterschiedliche Signalwege sein (z.B. Bradykinin, Noradrenalin, Depolarisation mit Kalium). Es wird zudem vermutet, dass die Bedeutung der Signaltransduktionspfade, über die die cGKI-Wirkungen in VSMCs vermittelt werden, in Abhängigkeit vom Typ, der Funktion und dem Konstriktionsgrad des Gefäßes variieren (Hofmann, Feil et al. 2006). Auch der Verlust der Expression der cGKI und/oder anderer Komponenten der Signalkaskade könnte ein Experiment mit kultivierten Zellen verfälschen (- in dieser Arbeit experimentell aber weitgehend ausgeschlossen; s. C.2). Zu bedenken ist ferner, dass in vielen Arbeiten, die ein Verfahren mit Transfektion der cGKI oder cGKI-Fragmenten angewandt haben, das Enzym in unphysiologisch hoher Konzentration exprimiert wurde oder konstitutiv aktiv war (Feil, Feil et al. 2005).

Da in dieser Arbeit die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen wurde, konnte nur über den bekannten Zusammenhang der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit dem Muskeltonus auf die Endwirkung in Form von Kontraktion bzw. Relaxation geschlossen werden. Deshalb wurden auch andere mögliche und wichtige Wirkungen der cGKI auf Ca^{2+} -unabhängige Prozesse nicht erfasst. Dazu gehören die bereits publizierten Effekte der cGKIα auf die Ca^{2+} -Sensibilisierung über den RhoA/Rho-Kinase Signalweg (Sauzeau, Le Jeune et al. 2000) und die MLCP (Surks, Mochizuki et al. 1999) oder auch die noch vieldiskutierte Wirkung auf das Zytoskelett (Aszodi, Pfeifer et al. 1999) und cGMP-spezifische PDEs (PDE5, s. Abb. D-1; Rybalkin, Rybalkina et al. 2002). Die Wirkung auf Wachstum, Differenzierung und Genregulation (Feil, Feil et al. 2005; Lincoln, Dey et al.

2001) findet bei der Einordnung der vielfältigen Ansatzpunkte der cGKI auch immer mehr Beachtung.

Das Heranziehen von cGKI-/- VSMCs und nachträgliche Ersetzen der cGKI-Isoformen hat sich als geeigneter Ansatz zur Untersuchung Isoenzym-spezifischer Wirkungen herausgestellt. Die weitere Forschung kann nun darauf aufbauend die zellulären Angriffspunkte der cGKI-Isoformen aufklären. Es wären Experimente denkbar, die bei einem ähnlichen Versuchsaufbau das extrazelluläre Ca^{2+} durch Komplexbildner (z.B. EDTA) entfernen und dadurch ausschließlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus zellulären Speichern beleuchten. Aufwendiger, aber von höherer Aussagekraft wäre bestimmt die Entwicklung von cGKI-Isoform-spezifischen Knock-out Mäusen oder auch die gewebespezifische Deletion der cGKI. Die klinische Forschung am Menschen könnte einen Schwerpunkt auf die Untersuchung der cGKI in pathologischen Prozessen wie der arteriellen Hypertonie oder Atherosklerose legen, auf die schon einzelne Ergebnisse hindeuten (Wolfsgruber, Feil et al. 2003). Dabei werden bereits neue Therapieansätze diskutiert, die über verschiedene Angriffspunkte der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade besonders in pathologisch verändertem Gewebe (Myokardhypertrophie, Atherosklerose, u.a.) langfristige Wirkungen (wie z.B. „Anti-Remodelling“) ausüben könnten (Feil and Kemp-Harper 2006). Auch die Deletion anderer wichtiger Gene, wie z.B. IRAG in VSMCs und anschließende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen ist dazu geeignet, Details dieser komplexen Zusammenhänge aufzudecken. Zukünftige Forschungen werden aber nicht der genauen Klärung der Frage ausweichen können, welche Funktionen die cGKI-Isoformen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Ontogenese und besonders auch in unterschiedlichen Abschnitten des Gefäßbaumes spielen.

E Zusammenfassung

Die Bedeutung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI) bei der Regulation des Tonus bzw. der Relaxation der (vaskulären) glatten Muskulatur (VSMC) über den NO/cGMP-Signalweg ist seit längerem bekannt. In der therapeutischen Anwendung werden NO und NO-Donatoren (sog. Organonitrate) z.B. als Antianginosa und bei ARDS (acute respiratory distress syndrome) zur Gefäßerweiterung eingesetzt. Die glatte Muskulatur exprimiert eine α - und eine β -Isoform der cGKI. Allerdings ist die Funktion dieser Isoformen in VSMCs, aber auch Details über die Wirkungen von NO/cGMP stromabwärts dieses Signalweges noch unzureichend erforscht worden. Weitgehend belegt ist bisher nur, dass NO über die Bildung von cGMP die cGKI α/β aktiviert und dies zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle führt. Übereinstimmung besteht auch darüber, dass eine wichtige Stellgröße bei der Regulation des Muskeltonus die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ist und dass die Hormon-induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch den NO/cGMP/cGKI-Signalweg unterstützt wird.

In dieser Arbeit sollte erstmals untersucht werden, welche Isoform der cGKI für die Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und damit die Relaxation verantwortlich ist. Für die Klärung dieser Frage wurde ein genetischer Ansatz gewählt, in dem cGKI-defiziente (cGKI $^{-/-}$) und Wildtyp-VSMCs aus der Mauseorta angezüchtet und nach Transfektion mit jeweils einer cGKI-Isoform $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen unter Einsatz des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 unterzogen wurden. Durch die kurzzeitige Stimulation mit Noradrenalin konnte in den Zellen eine transiente Ca^{2+} -Erhöhung ausgelöst werden, deren Integral über die Zeit mit und ohne Inkubation mit dem membrangängigen cGMP-Analogen 8-Br-cGMP ausgewertet wurde.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Die kultivierten VSMCs beider Genotypen behielten unter den angewandten Kulturbedingungen wichtige biochemische und physiologische Eigenschaften bei, d.h. vor allem eine durch NO stimulierbare cGMP-Bildung und eine intakte Funktion der cGKI (letzteres nur bei Wildtyp-VSMCs).
2. Zur Identifizierung transfizierter VSMCs wurde vorab ein Fusionsprotein aus jeweils einer cGKI-Isoform und dem Fluorophor EGFP (enhanced green fluorescent protein) konstruiert. Die intakte Expression und Kinasefunktion der Fusionsproteine konnte experimentell belegt werden.

3. Die cGKI α -EGFP- bzw. cGKI β -EGFP-Fusionskonstrukte wurden in kultivierte cGKI $^{-/-}$ VSMCs transfiziert und dabei von einer ausreichend hohen Prozentzahl der Zellen translatiert.
4. Bei den Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Noradrenalin zeigten die mit cGKI α -EGFP transfizierten Zellen wie auch die Wildtyp-Zellen eine Unterdrückung des Ca^{2+} -Transienten durch 8-Br-cGMP. Die Unterdrückung durch 8-Br-cGMP blieb bei den mit cGKI β -EGFP transfizierten VSMCs aus.

Diese Forschungsarbeit konnte so unter Vermeidung rein pharmakologischer Methoden wie z.B. dem Einsatz von „Inhibitoren“ der cGKI mit unklarer Spezifität auf eine möglicherweise wichtige Rolle der cGKI α bei der Relaxation vaskulärer glatter Muskelzellen der Mausaorta hinweisen. Auch konnte die genetische Methode - also die nachträgliche Substitution von cGKI-Isoformen in cGKI-defizienten Zellen - eine dem Einsatz pharmakologischer Verfahren überlegene Aussagekraft bei der detaillierten und Isoform-spezifischen Beschreibung von Enzymwirkungen bestätigen.

F Anhang

Auflistung der Originaldaten aus den $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen mit Fura-2

(Abkürzungen: AUC: area under the curve, primär: Primärkultur, 1P: 1. Passage, 2d/3d: 2 Tage bzw. 3 Tage vor Messung in serumfreiem Medium belassen, -: den Auswahlkriterien nicht entsprechend und daher aus der Auswertung genommen)

cGKI+/, Noradrenalin 2x Stimulation, EGFP-transfiziert

n=9

<i>Datei in Excel</i>	<i>Transient 1 (AUC)</i>	<i>Transient 2 (AUC)</i>	<i>Quotient (%)</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
2305,1	4955,46	3498,56	70,6	2d, primär
2405,4	10354,53	4224,65	40,8	2d, 1P
2505,1	8226,51	8687,20	105,6	2d, 1P
1106,3	7926,43	8018,78	101,2	3d, primär
1206,2	4732,50	5008,75	105,8	3d, primär
1206,4	4864,12	4806,25	98,8	3d, primär
1206,6	7603,16	8166,59	107,4	3d, primär
1206,7	13854,11	11468,76	82,8	3d, primär
1908,3	3894,55	5927,51	152,2	2d, primär

cGKI+/, Noradrenalin 2x Stimulation, EGFP-transfiziert, mit 8-Br-cGMP

n=8

<i>Datei in Excel</i>	<i>Transient 1 (AUC)</i>	<i>Transient 2 (AUC)</i>	<i>Quotient (%)</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
2405,5	18687,80	9568,15	51,2	2d, 1P
2405,6	8965,52	8893,80	99,2	2d, 1P
1106,1	7924,59	5454,98	68,8	3d, primär
1106,2	11969,80	3579,09	29,9	3d, primär
1106,4	23400,85	7221,72	30,9	3d, primär
1206,3	9839,23	7197,84	73,2	3d, primär
1908,1	12435,55	6367,0	51,2	2d, primär
1908,2	4320,94	5431,42	125,7	2d, primär-
1908,4	7038,30	4413,01	62,7	2d, primär

cGKI^{-/-}, Noradrenalin 2x Stimulation, cGKI α -EGFP

n=11

<i>Datei in Excel</i>	<i>Transient 1 (AUC)</i>	<i>Transient 2 (AUC)</i>	<i>Quotient (%)</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
2305,2	5574,18	7597,61	136,3	2d, 1P
2405,1	5328,31	6335,36	118,9	2d, 1P
2505,2	5457,16	5429,87	99,5	2d, 1P
2705,4	14913,27	14913,25	100,0	2d, 1P
1306,1	6231,85	4506,09	72,3	2d, 1P
1406,5	4143,40	4315,78	104,2	3d, 1P
2406,1	4589,20	6355,32	138,5	2d, 1P
2406,3	6380,64	4294,75	67,3	2d, 1P
1908,6	6329,88	5295,98	83,7	2d, primär
2008,1	4411,10	5538,05	125,6	2d, primär
2008,3	12562,32	12773,80	101,7	2d, primär

cGKI^{-/-}, Noradrenalin 2x Stimulation, cGKI α -EGFP, mit 8-Br-cGMP

n=8

<i>Datei in Excel</i>	<i>Transient 1 (AUC)</i>	<i>Transient 2 (AUC)</i>	<i>Quotient (%)</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
2505,3	6454,35	3820,98	59,2	2d, 1P
2705,1	10051,15	8523,38	84,8	2d, 1P
2705,2	7421,32	3347,02	45,1	2d, 1P
2705,5	15532,97	14181,60	91,3	2d, 1P
2306,6	5810,97	2561,97	44,1	2d, 1P
2306,7	13062,71	4412,28	33,8	2d, 1P
2406,2	20590,18	15612,11	75,8	2d, 1P
2606,2	8682,94	8291,86	95,5	2d, 1P-
2706,1	3526,54	2883,50	81,8	2d, 1P-
2706,2	5140,84	4600,95	89,5	2d, 1P
2008,2	12528,10	7941,44	63,4	2d, primär-

cGKI^{-/-}, Noradrenalin 2x Stimulation, cGKI β -EGFP

n=10

<i>Datei in Excel</i>	<i>Transient 1 (AUC)</i>	<i>Transient 2 (AUC)</i>	<i>Quotient (%)</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
2305,4	3912,75	7661,17	195,8	2d, 1P
2405,2	3660,11	2734,10	74,7	2d, 1P
1406,1	1748,66	2232,30	127,7	2d, 1P
1406,4	2336,00	2829,07	121,1	3d, 1P
2106,2	9378,09	6651,78	70,9	2d, 1P
2106,5	2814,51	3733,96	132,7	2d, 1P
2106,6	7018,53	8606,87	122,6	2d, 1P
2306,2	3457,30	4426,64	128,0	2d, 1P
2306,4	3471,37	3583,63	103,2	2d, 1P
2306,5	8198,15	7854,79	95,8	2d, 1P

cGKI^{-/-}, Noradrenalin 2x Stimulation, cGKI β -EGFP, mit 8-Br-cGMP

n=14

<i>Datei in Excel</i>	<i>Transient 1 (AUC)</i>	<i>Transient 2 (AUC)</i>	<i>Quotient (%)</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
2405,3	6952,23	5846,83	84,1	2d, 1P
2705,3	10036,50	13900,55	138,5	2d, 1P
2705,6	5025,95	6960,94	138,5	2d, 1P
1406,2	3458,66	2525,27	73,0	2d, 1P
1506,1	2143,59	2103,48	98,1	3d, 1P
2106,1	12752,17	7733,22	60,7	2d, 1P
2106,4	5597,79	3525,69	63,0	2d, 1P
2206,1	3264,70	5346,99	163,8	2d, 1P
2206,2	12269,13	10323,57	84,1	2d, 1P
2306,1	9375,32	6308,34	67,3	2d, 1P
2306,3	7409,57	9963,65	134,5	2d, 1P
2406,4	15427,82	17946,03	116,3	2d, 1P
2406,5	8642,65	4148,91	48,0	2d, 1P
2406,6	10403,98	7703,65	74,1	2d, 1P

G Literaturverzeichnis

G.1 Zitierte Bücher und Veröffentlichungen

- Ammendola, A., Geiselhoring, A., Hofmann, F., and Schlossmann, J. (2001). "Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta." *J Biol Chem* **276**: 24153-24159.
- Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X. H., Ny, L., Andersson, K. E., Kehrel, B., Offermanns, S., and Fassler, R. (1999). "The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function." *Embo J* **18**: 37-48.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). "Signal transduction. The calcium entry pas de deux." *Science* **287**: 1604-1605.
- Bonnevier, J., Fassler, R., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., and Arner, A. (2004). "Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice." *J Biol Chem* **279**: 5146-5151.
- Burkhardt, M., Glazova, M., Gambaryan, S., Vollkommer, T., Butt, E., Bader, B., Heermeier, K., Lincoln, T. M., Walter, U., and Palmeshofer, A. (2000). "KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells." *J Biol Chem* **275**: 33536-33541.
- Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P., and Weiner, C. P. (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." *J Cell Physiol* **184**: 409-420.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R., and Ross, R. (1979). "The smooth muscle cell in culture." *Physiol Rev* **59**: 1-61.
- Cohen, R. A., Weisbrod, R. M., Gericke, M., Yaghoubi, M., Bierl, C., and Bolotina, V. M. (1999). "Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx." *Circ Res* **84**: 210-219.
- Feil, R., Kemp-Harper, B. (2006). "Cyclic GMP signalling: from bench to bedside." *EMBO reports* **7**: 149-153.
- Feil, R., Lohmann, S. M., de Jonge, H., Walter, U., and Hofmann, F. (2003). "Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice." *Circ Res* **93**: 907-916.
- Feil, R., Feil, S., and Hofmann, F. (2005). "A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases." *Trends Mol Med* **11**: 71-75.
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, F., and Feil, R. (2005). "Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina." *Neuroscience* **135**: 863-868.
- Fritsch, R. M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhoring, A., Hofmann, F., and Allescher, H. D. (2004). "InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle." *J Biol Chem* **279**: 12551-12559.
- Fukata, Y., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001). "Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells." *Trends Pharmacol Sci* **22**: 32-39.

- Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F., and Schlossmann, J. (2004). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." *FEBS Lett* **575**: 19-22.
- Geiselhöringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Worner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F., and Schlossmann, J. (2004). "IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase." *Embo J* **23**: 4222-4231.
- Gibson, A., McFadzean, I., Wallace, P., and Wayman, C. P. (1998). "Capacitative Ca²⁺ entry and the regulation of smooth muscle tone." *Trends Pharmacol Sci* **19**: 266-269.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.
- Hofmann, F., Ammendola, A., and Schlossmann, J. (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." *J Cell Sci* **113**: 1671-1676.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., and Schlossmann, J. (2006). "Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion." *Physiol Rev* **86**: 1-23.
- Jaggard, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., Nelson, M. T. (2000). "Calcium sparks in smooth muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C235-256.
- Karaki, H. (2004). "Historical techniques: cytosolic Ca²⁺ and contraction in smooth muscle." *Trends Pharmacol Sci* **25**: 388-393.
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K. I., Harada, K. I., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K. J., and Sato, K. (1997). "Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle." *Pharmacol Rev* **49**: 157-230.
- Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). "Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle." *Genesis* **28**: 15-22.
- Lincoln, T. M., Dey, N., Sellak, H. (2001). "Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression." *J Appl Physiol* **91**: 1421-1430.
- Meinecke, M., Geiger, J., Butt, E., Sandberg, M., Jahnsen, T., Chakraborty, T., Walter, U., Jarchau, T., and Lohmann, S. M. (1994). "Human cyclic GMP-dependent protein kinase I beta overexpression increases phosphorylation of an endogenous focal contact-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein without altering the thrombin-evoked calcium response." *Mol Pharmacol* **46**: 283-290.
- Moore, E. D. W., Becker, P. L., Fogarty, K. E., Williams, D. A., and Fay, F. S. (1990). "Ca²⁺ imaging in single living cells: Theoretical and practical issues." *Cell calcium* **11**: 157-179.
- Murthy, K. S. and H. Zhou (2003). "Selective phosphorylation of the IP3R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G221-230.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., and Hofmann, F. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." *Embo J* **17**: 3045-3051.
- Pfeifer, A., Nurnberg, B., Kamm, S., Uhde, M., Schultz, G., Ruth, P., and Hofmann, F. (1995). "Cyclic GMP-dependent protein kinase blocks pertussis toxin-sensitive hormone receptor signaling pathways in Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **270**: 9052-9059.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., and Hofmann, F. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**: 105-149.

- Ruth, P., Wang, G. X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H., and Hofmann, F. (1993). "Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 2623-2627.
- Rutz, M. (2000). Regulation der cytosolischen Kalziumkonzentration in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen durch die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I. Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F., and Beavo, J. A. (2002). "Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells." J Biol Chem **277**: 3310-3317.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C. H., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Paucaud, P., and Loirand, G. (2000). "Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle." J Biol Chem **275**: 21722-21729.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." Nature **404**: 197-201.
- Schlossmann, J., Feil, R., and Hofmann, F. (2003). "Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases." Ann Med **35**: 21-27.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." Physiol Rev **83**: 1325-1358.
- Spector, D. L., Goldman, R.D., Leinwand, L.A. (1998). Heterologous expression of the green fluorescent protein. In "Cells: a laboratory manual. Vol. 1 Culture and biochemical analysis of cells", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M., and Mendelsohn, M. E. (1999). "Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha." Science **286**: 1583-1587.
- Swayze, R. D. and A. P. Braun (2001). "A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP." J Biol Chem **276**: 19729-19737.
- Tertyshnikova, S., Yan, X., and Fein, A. (1998). "cGMP inhibits IP3-induced Ca²⁺ release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases." J Physiol **512**: 89-96.
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F., and Feil, R. (2002). "cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium." Circ Res **90**: 18-20.
- Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F., and Feil, R. (2003). "A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 13519-13524.

G.2 Eigene Veröffentlichungen

Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C. R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S., and Hofmann, F. (2002). "Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms." Circ Res **90**: 1080-1086.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zu einem erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen:

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme in seinen Mitarbeiterkreis, für sein Interesse und Engagement bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Robert Feil besonders für die intensive Betreuung der Arbeit, die fachliche Unterstützung bei allen Problemen und die familiäre Atmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die geduldige Betreuung und Beratung bei der Etablierung und Durchführung der Fluoreszenzmessungen.

Frau Dr. Susanne Feil für die Bereitstellung der Mäuse und die tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung.

Frau Sabine Brummer, für die stetige und zuverlässige Hilfe bei der Genotypisierung der Mäuse und Einweisung in einige Labortechniken.

Wiebke, Matthias, Andrea und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die unkomplizierte Hilfestellung und das äußerst angenehme Arbeitsklima.

Herzlichen Dank auch an alle nicht erwähnten Mitarbeiter des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.