

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

# **Kalziumregulierende Funktion von IRAG im glatten Gefäßmuskel**

Angela Maria Jochim

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. A. Konnerth

Die Dissertation wurde am 17.09.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.12.2009 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>I.</b>	<b>Einführung in den NO/cGMP-Signalweg</b> .....	1
1	Stickstoffmonoxid-vermittelte Vasodilatation .....	1
1.1	Der NO/cGMP-Signalweg in der Klinik .....	1
1.2	Die endogene NO-Generierung .....	1
2	Die Bildung von cGMP durch Guanylatzyklasen .....	5
3	Intrazelluläre cGMP-Rezeptoren .....	6
3.1	Phosphodiesterasen .....	7
3.2	Cyclic nucleotide-gated Ionenkanäle, Multidrug resistance protein 5 und cAMP-abhängige Proteinkinase .....	8
3.3	Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen .....	9
4	IRAG .....	17
4.1	Struktur und Vorkommen .....	17
4.2	Funktionen von IRAG .....	18
5	Ein mögliches Schema der NO-abhängigen Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Muskelzellen durch IRAG .....	20
<b>II.</b>	<b>Zur Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen</b> .....	21
<b>III.</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	23
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	25
<b>I.</b>	<b>Kalziummessungen an glatten Gefäßmuskelzellen der Maus</b> .....	25
1	Isolierung und Kultivierung glatter Muskelzellen der murinen Aorta .....	25
2	Gewinnung frisch isolierter glatter Muskelzellen muriner Beinarterien .....	27
2.1	Isolierung unter Verwendung der Kollagenase F (Sigma) .....	27
2.2	Isolierung unter Verwendung der Kollagenase IV (Worthington) .....	28
3	Kalzium-Imaging mit Fura-2 .....	29
3.1	Fura-2 .....	29
3.2	Messanlage .....	31
4	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	32
<b>II.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	33
1	Proteingewinnung .....	33

2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	33
3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
4	Westernblot .....	36
<b>III.</b>	<b>Versuchstiere</b> .....	<b>38</b>
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>I.</b>	<b>Kalziummessungen an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der murinen Aorta</b> .....	<b>39</b>
<b>II.</b>	<b>Westernblot</b> .....	<b>46</b>
<b>III.</b>	<b>Etablierung eines Verfahrens zur Kalziummessung an frisch isolierten Gefäßmuskelzellen muriner Beinarterien</b> .....	<b>49</b>
1	Ergebnisse der Kalziummessungen an Zellen, die mit der Kollagenase F (Sigma) isoliert wurden .....	50
1.1	Stimulation mit Phenylephrin und Noradrenalin .....	50
1.2	Stimulation mit Koffein .....	51
1.3	Kaliumdepolarisation.....	51
1.4	Direkte Stimulation der Phospholipase C .....	52
2	Ergebnisse der Kalziummessungen an Zellen, die mit der Kollagenase IV (Worthington) isoliert wurden.....	53
2.1	Stimulation mit Noradrenalin.....	53
2.2	Experimente mit Noradrenalin und 8-Br-cGMP.....	54
<b>D</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
<b>I.</b>	<b>Die Bedeutung von IRAG für die Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration</b> .....	<b>56</b>
<b>II.</b>	<b>Die Bedeutung von IRAG für die Expression tonusrelevanter Proteine</b> .....	<b>68</b>
<b>III.</b>	<b>Etablierung einer Methode zur Kalziummessung in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen</b> .....	<b>70</b>
<b>IV.</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>76</b>
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>78</b>
<b>F</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>I</b>
<b>I.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>XVII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout
°C	Grad Celsius
A	Ampere
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetomethylester
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AKAP	cAK-Ankerprotein
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BK <sub>Ca</sub> -Kanal	Kalzium-aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
BNP	natriuretisches Peptid vom B-Typ
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
8-Br-cGMP	8-Bromo-zyklisches Guanosinmonophosphat
Br	Brom
c	centi (10 <sup>-2</sup> )
ca.	circa
Ca	Kalzium
[Ca <sup>2+</sup> ]	Kalziumkonzentration
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CaM	Calmodulin
CaMK	Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD-Kamera	<i>charge-coupled-device</i> -Kamera
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGKI $\alpha$	cGMP-abhängige Proteinkinase I <i>common</i> (= cGKI $\alpha$ und $\beta$ )
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Chlor
CNG	<i>Cyclic nucleotide gated</i>
CNP	natriuretisches Peptid Typ C
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cPKC	kalziumabhängige PKC
CPI-17	Proteinkinase C-potenziiertes inhibitorisches Protein für heterotrimere MLCP von 17 kDa
COS	Affennierenzelllinie
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
Cre/lox P	Cre Rekombinase ( <i>cyclisation recombination</i> ) / <i>locus of crossing over of P1</i>
CRP	zytoplasmatisches Cystein-reiches Protein
Da	Dalton

DAG	Diacylglycerin
DIM	Dimerisierungsdomäne
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
eNOS	endotheliale NOS
ERK	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EVH	<i>Ena/VASP homology</i>
FAD	Flavinadeninindinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötale Kälberserum)
Fe	Eisen
F <sub>i</sub>	Fluoreszenzintensität
FMN	Flavinmononukleotid
Fura-2	1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
fu	<i>Fluorescence unit</i> (Fluoreszenzeinheit)
g	gramm oder ms <sup>-2</sup>
G	Guanosin
GAF-Domäne	cGMP-Bindungsdomäne, erstmals identifiziert in cGMP-spezifischer PDE, AC und <i>E. coli</i> Transkriptionsfaktor FhlA
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanin nucleotide exchange factor</i> Guaninnukleotidaustauschfaktor
Glu	Glutamat
GKAP	cGK-Ankerprotein
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	Ethansulfonsäure
HETE	<i>20-hydroxyeicosatetraenoic acid</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz (= s <sup>-1</sup> )
iNOS	induzierbare NOS
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
IRAG	IP <sub>3</sub> -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein
IRAG <sup>Δ12/Δ12</sup>	IRAG-Deletionsmutante
ISDN	Isosorbid-2,5-dinitrat
ISMN	Isosorbid-endo-5-mononitrat
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
K	Kalium
KAT	Katalytische Domäne
λ	Wellenlänge

l	Liter
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
L-LTP	späte Langzeitpotenzierung
LTD	Langzeitdepression
L-Typ Ca <sub>v</sub>	spannungsabhängiger Kalziumkanal vom L-Typ
Lys	Lysin
LZ	Leuzinzipper
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	molar
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg	Magnesium
m-3M3FBS	2,4,6-trimethyl-N-( <i>meta</i> -3-trifluoromethylphenyl)-benzenesulfonamid
mmol	millimol
MLC	Myosin Leichte Kette
MLCK	MLC-Kinase
MLCP	MLC-Phosphatase
Mo	Molybdän
mRNS	<i>messenger</i> RNS
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>
Mrv1	murine retrovirus integration site 1
mtNOS	mitochondriale NOS
MYPT1	Regulatorische Untereinheit der MLCP
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NA	Noradrenalin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHERF3	Natrium-Protonen-Austauscher 3 regulierender Faktor
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NOSIP	NOS-interagierendes Protein
NPR	Natriuretisches Peptid-Rezeptor
O	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-on
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
P	Phosphat
PDE	Phosphodiesterase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
pGC	Membranassoziierte Guanylatzyklase
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische PLC
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
PP	Proteinphosphatase
PKC	Proteinkinase C
PTP-PEST	<i>Protein tyrosine phosphatase-prolin, glutamate, serine, and threonine</i>
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Arginin
Rap1-GAP2	GTPase-aktivierendes Protein 2 von Rap1
RGS2	<i>Regulator of G-protein signaling 2</i> (Regulator der G-Protein-Signalkaskade 2)
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i> (Messfenster)
ROK	Rho-Kinase
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde
S	Schwefel bzw. Serin
SMC	glatte Muskelzelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
Ser	Serin
SERCA	Sarkoendoplasmatisches Retikulum-Kalzium-ATPase
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (kleine interferierende RNA)
SNP	<i>sodium nitroprussid</i> (Natrium-Nitroprussid)
s.o.	siehe oben
SOCE	<i>store operated calcium entry</i> (Speicher-abhängiger Kalziumeinstrom)
SR	Sarkoendoplasmatisches Retikulum
ST <sub>a</sub>	Hitzestabiles Enterotoxin
STIM	<i>Stromal- interacting molecule</i>
STOC	<i>spontaneous transient outward current</i> (spontaner transienter Auswärtsstrom)
s.u.	siehe unten
TBST	<i>Tris-Tween-buffered saline</i> (Tris gepufferte Salzlösung)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	<i>Transient receptor potential</i> (transientes Rezeptorpotential)
TRPC	<i>Canonical transient receptor potential</i>
u.a.	unter anderem/n
UV	ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vgl.	vergleiche
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i> (glatte Gefäßmuskelzelle)
w	Gewicht
WT	Wildtyp



## ***Abbildungs- und Tabellenverzeichnis***

- Abb. A.1 Schema der endothelialen NO-Synthase
- Abb. A.2 Schema der löslichen Guanylatzyklase
- Abb. A.3 Intrazelluläre cGMP-Rezeptoren
- Abb. A.4 Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinase
- Abb. A.5 Ein mögliches Schema der NO-abhängigen Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Muskelzellen durch IRAG
- Abb. A.6 Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen
- Abb. B.1 Strukturformel von Fura-2-AM
- Abb. B.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs Fura-2 von der Anregungswellenlänge und der vorherrschenden Kalziumkonzentration
- Abb. B.3 Aufbau der Messanlage
- Abb. C.1 Beispiel einer digitalen Aufnahme kultivierter Aortenzellen der Maus vor Beginn einer Kalziummessung
- Abb. C.2 Zeitlicher Ablauf der Experimente
- Abb. C.3 Beispiele für Kalziumtransienten kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen der murinen Aorta
- Abb. C.4 Statistische Auswertung der Kalziummessungen an VSMCs der murinen Aorta
- Abb. C.5 Beispiel für die Integration des *ersten* Kalziumtransienten eines Experimentes
- Abb. C.6 Vergleich der basalen Kalziumkonzentration sowie der Noradrenalin-induzierten Kalziumausschüttung in VSMCs der murinen Aorta von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen
- Abb. C.7 Vergleich der Verläufe der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten in VSMCs der Aorta von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen.
- Abb. C.8 Proteinexpression des IP<sub>3</sub>RI, IRAG und der cGKI $\alpha$  in der Aorta und der A. tibialis der Maus
- Abb. C.9 Proteinexpression von MYPT-I, der cGKI $\beta$  und von RGS2 in der Aorta und der A. tibialis der Maus
- Abb. C.10 Proteinexpression von IP<sub>3</sub>RI, MYPTI, IRAG, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$ , RGS2 und RhoA in der Aorta und der A.tibialis der WT-Maus.
- Abb. C.11 Proteinexpression von IP<sub>3</sub>RI, MYPTI, IRAG, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$ , RGS2 und RhoA in der Aorta von WT- und IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Maus.
- Abb. C.12 Beispiel einer digitalen Aufnahme frisch isolierter Beinarterienzellen der Maus vor Beginn einer Kalziummessung

Abb. C.13	Strukturformel von Koffein
Abb. C.14	Zweifache Stimulation zweier frisch isolierter Muskelzellen muriner Beinarterien mit Koffein
Abb. C.15	Durch Kaliumdepolarisation induzierter Kalziumtransient einer glatten Muskelzelle einer murinen Beinarterie
Abb. C.16	Strukturformel des PLC-Aktivators <i>m</i> -3M3FBS
Abb. C.17	Stimulation von vier glatten Muskelzellen muriner Beinarterien mit dem PLC-Aktivator <i>m</i> -3M3FBS
Abb. C.18	Zweimalige Stimulation einer glatten Muskelzelle einer murinen Beinarterie mit Noradrenalin (NA)
Abb. C.19	Zweimalige Stimulation einer glatten Muskelzelle aus muriner Beinarterie mit Noradrenalin (NA) (Endkonzentration 0,5 $\mu$ M) mit 8-Br-cGMP-Inkubation (Endkonzentration 2 mM) vor der zweiten NA- Stimulation
Abb. C.20	Statistische Auswertung der Experimente an glatten Muskelzellen muriner Beinarterien mit Noradrenalin und 8-Br-cGMP
Abb. D.1	Modell der zytosolischen Kalziumkonzentration durch den NO/cGMP/cGKI-Signalweg
Abb. D.2	Verschiedene Versuche der Stimulation einer Kalziumfreisetzung aus dem SR einer Gefäßmuskelzelle, die mit Hilfe der Kollagenase F isoliert wurde
Tab.1	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität $F_i$ von Fura-2 von der Anregungswellenlänge $\lambda$ und der Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]$

# A Einleitung

## I. Einführung in den NO/cGMP-Signalweg

### 1. Stickstoffmonoxid-vermittelte Vasodilatation

#### 1.1 Der NO/cGMP-Signalweg in der Klinik

Für viele Patienten, die an der koronaren Herzerkrankung leiden und oft von akuten pectanginösen Beschwerden geplagt werden, ist der Hub aus dem „Nitrospray“ auf die Mundschleimhaut nicht mehr wegzudenken. Bereits nach einer knappen Minute bewirkt Glyceroltrinitrat („Nitroglycerin“) eine spürbare Linderung der nicht selten krisenhaften Schmerzsymptomatik im akuten Anfall. Die Nitrovasodilatoren, von denen neben Glyceroltrinitrat insbesondere auch Isosorbid-2,5-dinitrat (ISDN) und Isosorbid-endo-5-mononitrat (ISMN) für die Anfallskupierung verwendet werden, werden in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße unter Beteiligung von Thiolen enzymatisch abgebaut, wodurch unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), das eigentliche gefäßerweiternde Agens, freigesetzt wird [Schütz *et al.*, 2005]. Die NO-Donatoren führen auf diese Weise zu einer Vasodilatation der großen Blutgefäße: Das heißt zum einen zur Erweiterung der Koronarien, die so das Sauerstoffangebot an den Herzmuskel erhöhen können, zum anderen zur Dehnung der Venae cavae, was durch eine deutliche Vorlastsenkung den enddiastolischen Füllungsdruck im linken Ventrikel reduziert und dadurch den Sauerstoffbedarf des Myokards sowie durch die verminderte Wandspannung zusätzlich den Koronarwiderstand senkt [Förstermann, 2005].

Inzwischen ebenfalls fest etabliert ist der Einsatz von Phosphodiesterasehemmern wie Sildenafil, die durch eine Hemmung der Hydrolyse von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) den gleichen Signalweg fördern. Auch hier wird der gewünschte Effekt, in diesem Fall die Behandlung der erektilen Dysfunktion, über eine Relaxation glatter Muskelzellen (im Corpus cavernosum) erzielt [Förstermann, 2005].

In dieser Arbeit wird ein Effektorprotein dieses klinisch sehr wichtigen NO/cGMP-Signalweges genauer untersucht, nämlich das Inositoltriphosphatrezeptor-assoziierte cGMP-abhängige Kinase-Substrat IRAG.

Zunächst folgt eine Einführung in diese Signalkaskade.

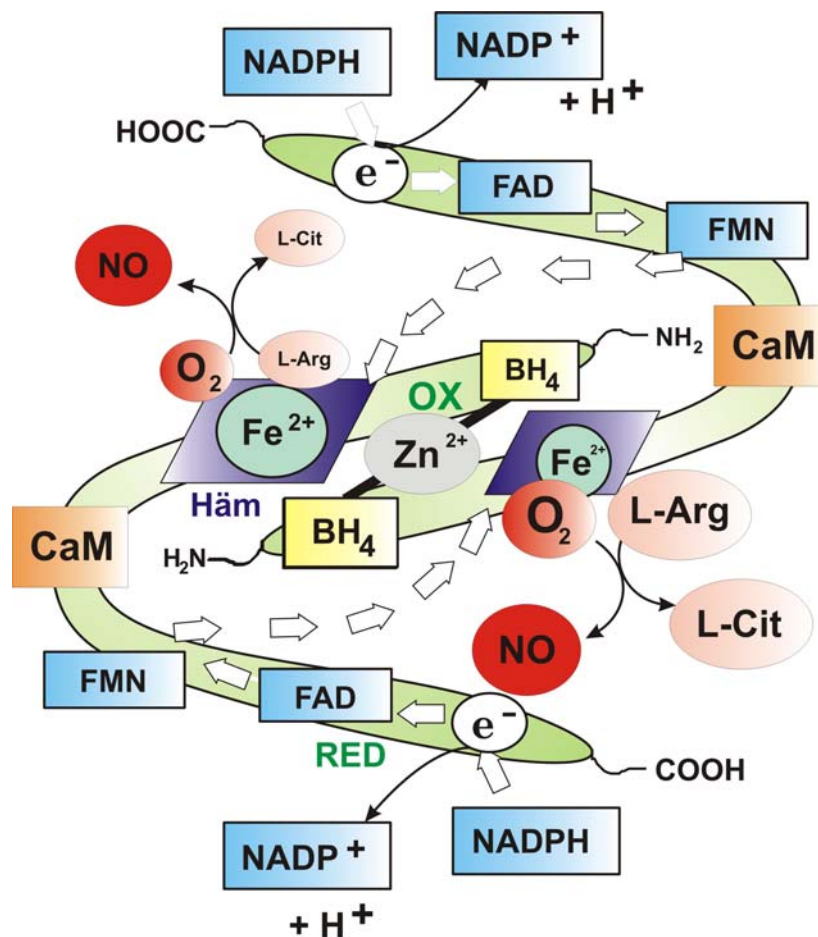
#### 1.2. Die endogene NO-Generierung

Stickstoffmonoxid ist ein gasförmiges, hochreaktives Molekül, das im Körper durch die sogenannten NO-Synthasen (NOS) produziert wird. Man unterscheidet vier NOS-Isoformen, die nach Vorkommen bzw. Aktivierungseigenschaften nNOS (neuronal NOS), iNOS (induzierbare NOS), mtNOS (mitochondriale NOS) und eNOS (endotheliale NOS) benannt wurden.

Alle vier NOS-Isoformen haben die Struktur eines Homodimeres, deren Untereinheiten jeweils eine Oxidations- und eine Reduktionsdomäne beinhalten. Von den Reduktionsdomänen werden über eine Kette von Kofaktoren, nämlich NADPH, Flavinmononukleotid (FMN) und Flavindinukleotid (FAD) Elektronen auf ein eisenhaltiges Hämmolekül der jeweils anderen

Oxidationsdomäne übertragen (vgl. Abb. A.1). Hier werden aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) über die Zwischenstufe  $N^{\circ}$ -hydroxy-L-Arginin L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. An der Dimer-Verbindungsstelle befindet sich ein Zink-Thiolat-Cluster, in dessen Nähe Bindungsstellen für einen weiteren Kofaktor, Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ), liegen.

Der essentielle Kofaktor für die NO-Synthese durch eNOS und nNOS ist Calmodulin, welches bei Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration an die Synthase bindet und dadurch die Elektronenübertragung auf die Hämgruppe erst ermöglicht [Förstermann *et al.*, 2006]. Somit ist die transiente Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder Einstrom aus dem Extrazellulärraum die Grundvoraussetzung für eine Aktivierung dieser NOS-Isoformen [Mitchell *et al.*, 2008].



**Abb. A.1 Schema der endothelialen NO-Synthase**

Die eNOS ist ein Homodimer mit zwei Oxidations (OX)- und Reduktionsdomänen (RED). An den RED werden durch die Reaktion von NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) zu NADP<sup>+</sup> Elektronen ( $e^-$ ) freigesetzt, welche über die Kofaktoren FMN (Flavinmononukleotid) und FAD (Flavinadenindinukleotid) auf ein eisenhaltiges ( $Fe^{2+}$ ) Hämolekül der OX des jeweils anderen Dimers übertragen werden. Dort findet die Synthese von NO (Stickstoffmonoxid) und L-Cit (L-Citrullin) aus  $O_2$  (Sauerstoff) und L-Arg (L-Arginin) statt. An der Verbindungsstelle der Dimere ist ein Zink-Thiolat-Cluster ( $Zn^{2+}$ : Zinkion) lokalisiert sowie ebenfalls an den OX der Kofaktor  $BH_4$  (Tetrahydrobiopterin). Als weiterer Kofaktor ist CaM (Calmodulin) von Bedeutung.

Während eNOS und nNOS konstitutiv exprimiert werden, wird die **iNOS**, die vorwiegend in Makrophagen gefunden wird, erst auf inflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharide und Zytokine hin exprimiert und ist kalziumunabhängig. Auf ihre Aktivität führt man die NO-vermittelte Hypotonie im septischen Schock sowie einen Teil der zytotoxischen Wirkung aktivierter Makrophagen zurück. Zudem wurde die iNOS in atherosklerotischen Plaques gefunden und es wird ihr auf Grund ihrer Generierung von NO in hohen Konzentrationen und der daraus resultierenden Akkumulation von LDL-modifizierendem Peroxynitrit ein hohes atherogenes Potential zugesprochen [Moncada *et al.*, 2006].

Im Gegensatz hierzu wirkt die **nNOS** eher atheroprotektiv, verstärkt aber nach zerebraler Ischämie durch extensive NO-Produktion den Gefäßschaden und vergrößert die Infarktzone [Liu *et al.*, 2008]. Unter physiologischen Bedingungen ist die nNOS in erster Linie in Neuronen, Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert. Nach Produktion durch die nNOS im autonomen Nervensystem wirkt NO in Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstrakt als Neurotransmitter und bewirkt dort die Relaxation glatter Muskelzellen [Liu *et al.*, 2008]. In glatten Muskelzellen selbst ist sie vor allem in Kaveolen in enger Assoziation mit der Kalzium-ATPase der Plasmamembran (PMCA) lokalisiert [Gros *et al.*, 2003] und produziert hier in Abhängigkeit von der lokalen Kalziumkonzentration NO, welches durch Hemmung der 20-HETE-Produktion (20-Hydroxyeicosantetraensäure) durch die Cytochrom P450 4A-Isoform der Vasokonstriktion cGMP-unabhängig entgegenwirken soll [Fleming, 2003].

Die **mtNOS** befindet sich an der inneren mitochondrialen Membran und spielt vermutlich eine Schlüsselrolle für die Modulation der mitochondrialen Atmungskette und des mitochondrialen Membranpotentials [Liu *et al.*, 2008].

Wenngleich iNOS und nNOS insbesondere unter pathologischen Bedingungen vaskuläre Funktionen beeinflussen, ist die **eNOS** die vorherrschende NO-Synthase im Gefäßsystem und daher für die in dieser Arbeit untersuchten Gefäßmuskelzellen von größter Bedeutung.

Über verschiedene Mechanismen wie der Bindung diverser Transkriptionsfaktoren an die eNOS-Promoterregion oder eine zytokinvermittelte Beeinträchtigung der mRNS-Stabilität wird die eNOS-Expression moduliert. Die *posttranslationale* Regulation der eNOS-Aktivität geschieht zum einen über Scherkräfte, welche durch den Blutfluss in den Gefäßen entstehen und über die Regulation der Wandschubspannung eine kontinuierliche, basale NO-Produktion bewirken. Zum anderen wird die Aktivität der eNOS durch die Agonisten-induzierte Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration unter Vermittlung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren reguliert, z.B. infolge einer Acetylcholin- oder Bradykininausschüttung [Fleming *et al.*, 2003]. Beide Wege bedienen sich diverser Substrate, zu denen beispielsweise Serinkinasen wie Akt, cAK oder CaMKII, die Phosphatasen PP1 und PP2A und andere Proteine wie Caveolin-1, Dynamin, NOSIP (NOS-interagierendes Protein) und HSP90 (Hitzeschockprotein 90) gehören [Fleming *et al.*, 2003]. Caveolin-1 wirkt über eine Antagonisierung der kalziumabhängigen Calmodulinbindung an eNOS inhibitorisch, wie auch NOSIP (eNOS-interagierendes Protein), welches durch Translokation des Enzyms von plasmalemalen Kaveolen (Einbuchtungen) zu intrazellulären

Kompartimenten dessen Aktivität beenden soll. Dagegen steigert HSP90 durch Vermittlung der Akt-eNOS-Interaktion und Erleichterung der Caveolin-Dissoziation von der NO-Synthase deren Aktivität [Fleming et al., 2003].

Was geschieht, wenn die Feinregulation der eNOS gestört ist, lässt sich im Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion erkennen, die bei kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus bzw. Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt. Sie ist definiert über eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation trotz adäquater Reize durch Agonisten oder Scherkräfte und lässt sich auf eine verminderte Stickstoffmonoxidfreisetzung zurückführen [Moncada et al., 2006]. Diese ist nicht durch eine reduzierte, sondern fehlgeleitete eNOS-Aktivität zu erklären: Im Rahmen einer sogenannten Entkopplung produziert sie vorwiegend das oxidative Radikal Superoxid ( $O_2^-$ ), welches durch die rasche Reaktion mit NO zum gefäßschädigenden Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) die NO-Halbwertszeit und damit dessen Verfügbarkeit stark reduziert. Tierexperimentell und zum Teil auch in klinischen Studien ließ sich durch die Gabe von  $BH_4$ , Ascorbinsäure, L-Arginin oder Folsäure der eNOS-Entkopplung und damit der endothelialen Dysfunktion erfolgreich entgegenwirken [Förstermann et al., 2006].

Untersuchungen verschiedener Forschungsgruppen ließen auf die Existenz einer *weiteren endothelialen NO-Quelle* neben den bekannten NOS schließen: So konnte beispielsweise die Generierung von NO in perfundierten Mesenterialarterien von Ratten nach KCl-induzierter Kontraktion in Gegenwart des NOS-Inhibitors L-NAME nachgewiesen werden [Mendizabal et al., 2000]. Ob dies auf eine nichtenzymatische NO-Synthese durch den NOS-Inhibitor selbst oder möglicherweise auf die Aktivität eines endothelialen Cytochrom P450-Enzyms zurückzuführen ist, ist ungeklärt [Andrews et al., 2002].

Zudem kommt es im Rahmen der *sogenannten Photorelaxation* unter der direkten Einwirkung von UV-Licht zur reversiblen Relaxation präkontrahierter Kaninchenaorta. Zahlreiche Experimente belegten, dass diese Relaxation mit einer erhöhten NO- und cGMP-Konzentration assoziiert ist, die Relaxation selbst aber auch ohne Endothel stattfindet. Die anschließende Erholungsphase im Dunkeln ist jedoch sehr wohl von Endothelzellen und offensichtlich auch der eNOS abhängig. Aus diesen und weiteren Beobachtungen wurde der Schluss gezogen, dass sich innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen ein Reservoir an vermutlich S-Nitrosothiolen (RSNOs) befindet, aus welchem nach Einwirken eines unbekanntes Stimulus Stickstoff freigesetzt werden kann [Andrews et al., 2002].

Die verschiedenen NO-Effekte wie die Hemmung von Blutplättchenaggregation und Leukozytenadhäsion [Kubes et al., 1991], die Förderung der Vasodilatation sowie die Proliferationshemmung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) werden in erster Linie über die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) vermittelt [Liu et al., 2008]. Ferner interagiert NO direkt mit Sulfhydrylgruppen von Proteinen wie zum Beispiel am Hämoglobin [Andrews et al., 2002] oder der Sarkoendoplasmatischen-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA) [Cohen et al., 2006] oder wirkt durch Reaktion mit Radikalen wie dem Superoxidanion [Liu et al., 2008].

## 2. Die Bildung von cGMP durch Guanylatzyklasen

Ein essentieller Bestandteil der physiologischen Stickstoffmonoxidwirkung wird durch die Aktivierung der sogenannten löslichen Guanylatzyklase (sGC) vermittelt, eines ubiquitären Enzyms, welches die Bildung des „second messenger“ zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert und von der membrangebundenen bzw. partikulären Guanylatzyklase (pGC) abgegrenzt wird.

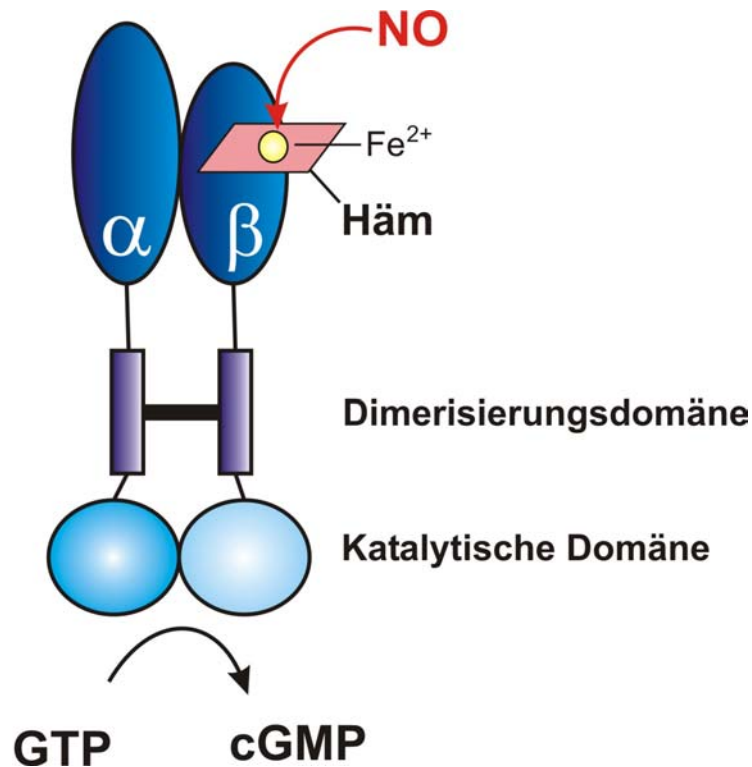
Zur Familie der **pGCs** gehören die oligomeren Rezeptoren für natriuretische Peptide NPR-A und NPR-B (synonym werden die Bezeichnungen GC-A und GC-B verwendet). Sie bestehen aus extrazellulären Ligandenbindungsdomänen mit für die hormonale Aktivierung essentiellen Phosphorylierungsstellen, kleinen membranumspannenden Domänen und intrazellulären Domänen, zu welchen unter anderen die carboxyterminal lokalisierten katalytischen GC-Domänen gehören. Letztere katalysieren ebenfalls die Generierung von cGMP aus GTP [Potter *et al.*, 2006]. Die GC-A werden in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Nierenparenchym und vielen weiteren Organen exprimiert und in erster Linie durch das atriale natriuretische Peptid ANP und das natriuretische Peptid vom B-Typ (BNP) ATP- und HSP90-abhängig aktiviert [Potter *et al.*, 2006]. Hierdurch werden verschiedene physiologische Effekte wie eine verstärkte Natriuresis und Diuresis, Vasodilatation sowie eine Reduktion des intravasalen Volumens durch erhöhte Endothelpermeabilität vermittelt, die insgesamt zur Senkung des Blutdrucks beitragen. An die GC-B (NPR-B) bindet vor allem das natriuretische Peptid vom C-Typ (CNP), welches eine entscheidende Rolle in der Regulation des Knochenwachstums spielt und ferner das vorherrschende natriuretische Peptid im Gehirn darstellt [Potter *et al.*, 2006].

Nachdem NO aus dem Endothel in die glatten Gefäßmuskelzellen oder die Thrombozyten diffundiert ist, aktiviert es dort die zytosolische **sGC** zur cGMP-Produktion [Birschmann *et al.*, 2004]. Wie Abbildung A.2 zeigt, ist sie ein Heterodimer, das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht, von denen jeweils 2 Formen bekannt sind ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ). An die  $\beta$ -Untereinheit, die ein etwas geringeres MG als die  $\alpha$ -Untereinheit aufweist, bindet eine prosthetische Hämgruppe, in deren Mitte sich ein zentrales Eisenion im Komplex zwischen vier Häm-Stickstoffatomen und einer Histidin-Gruppe befindet [Poulos, 2006]. Ist das Eisenion in einem reduzierten Zustand ( $\text{Fe}^{2+}$ ), kann hieran NO binden, so dass über ein instabiles hexakoordiniertes Histidin-Häm-NO-Intermediat ein pentakoordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex entsteht. Durch die Spaltung der Häm-Histidin-Bindung wird die Aktivität der sGC um den Faktor 200 erhöht [Evgenov *et al.*, 2006]. Es hat sich gezeigt, dass die pentakoordinierte Form der sGC in Abhängigkeit von der NO-Konzentration mit hoher oder niedriger Aktivität arbeiten kann, so dass Modelle entwickelt wurden, nach denen ein weiteres NO-Molekül an die sGC bindet, welches für die feinere Abstufung der sGC-Aktivität verantwortlich ist [Poulos, 2006]. Gegenstand der Diskussion bleibt, ob es hierzu einer zusätzlichen NO-Bindungsstelle abseits der Hämgruppe bedarf [Derbyshire *et*

*al.*, 2007] oder ob das zusätzliche NO-Molekül ebenfalls an das Häm-Eisen bindet, so dass eventuell ein vorübergehender NO-Fe-NO-Komplex entsteht [Russwurm *et al.*, 2004].

Durch Oxidation der Hämgruppe, beispielsweise durch Inhibitoren wie ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-on) oder aber *in vivo* in Gegenwart von Sauerstoffradikalen bei oxidativem Stress, verliert die sGC ihre Aktivierbarkeit durch NO. Daher rücken neben schon länger bekannten hämabhängigen sGC-Aktivatoren, die meist strukturelle Ähnlichkeit mit dem Indazol-Derivat YC-1 haben, auch hämunabhängige Substanzen wie BAY 58-2667 in den Fokus des Interesses, welche neben einer hämfreien Form auch die oxidierte sGC aktivieren können [Stasch *et al.*, 2006].

Überdies kann die NO-induzierte, jedoch nicht die basale Aktivität der sGC allosterisch durch Kalzium gehemmt werden [Kazerounian *et al.*, 2002]. Im Sinne eines Negativ-Feedback-Mechanismus wird die sGC außerdem an der  $\alpha_1$ -Untereinheit inhibitorisch durch die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) an Ser64 phosphoryliert [Zhou *et al.*, 2008].



**Abb. A.2 Schema der löslichen Guanylatzyklase**

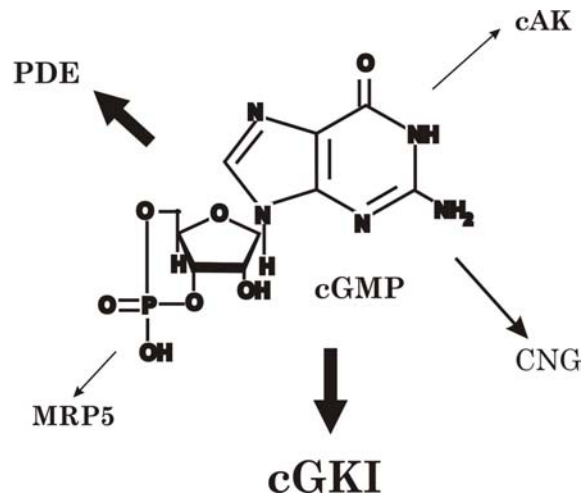
Die sGC ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, die in der zentralen Dimerisierungsdomäne miteinander verbunden sind. An der  $\beta$ -Untereinheit befindet sich ein Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ )-Hämkomplex, an den NO (Stickstoffmonoxid) bindet, wodurch die Aktivität der sGC verstärkt wird. Das Enzym katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP).

### 3. Intrazelluläre cGMP-Rezeptoren

Nachdem cGMP von der glattmuskulären sGC nach Aktivierung durch NO generiert wurde, übernimmt es als sogenannter „second messenger“ diverse essentielle Signalfunktionen.



Abbildung A.3 verdeutlicht, dass es neben der Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (cGKs) an Phosphodiesterasen oder Kationenkanäle sowie an das Multidrug resistance protein 5 und in hohen Konzentrationen an die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAK) bindet.



**Abb. A.3 Intrazelluläre cGMP-Rezeptoren**

cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, PDE: Phosphodiesterase, cAK: zyklische Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase, MRP5: Multidrug resistance protein, cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I, CNG: cyclic nucleotid gated channel

### 3.1 Phosphodiesterasen

Die Gruppe der Phosphodiesterasen (PDEs) wird nach verschiedenen Kriterien wie strukturellen und enzymatischen Eigenschaften in elf Familien eingeteilt (PDE1 bis PDE11), für deren Kodierung bisher 21 verschiedene Gene als verantwortlich identifiziert werden konnten [Omori *et al.*, 2007]. Der Gesamtheit der 48 PDE-Isozyme, die sich aus zahlreichen Spleißvarianten der einzelnen Transkripte zusammensetzt, ist die Eigenschaft gemein, eines oder beide der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) in das entsprechende 5'-Nukleotid zu überführen und somit die Signalwirkung dieser intrazellulären „second messenger“ zu begrenzen [Omori *et al.*, 2007]. Verantwortlich hierfür ist die carboxyterminale katalytische Domäne der PDEs. Während PDE1, -2, -3, -10 und -11 sowohl cGMP als auch cAMP hydrolysieren, bauen PDE4, -7 und -8 spezifisch cAMP und PDE5, -6 und -9 ausschließlich cGMP ab. Die zyklischen Nukleotide können neben ihrer Funktion als Substrat auch enzymregulierende Aufgaben übernehmen. So wirkt cGMP stimulierend auf die PDE2 sowie kompetitiv hemmend auf die PDE3 und cAMP inhibiert die PDE10-Aktivität [Omori *et al.*, 2007]. Im Rahmen eines Autofeedbackmechanismus kann cGMP zudem durch Bindung an eine sogenannte nichtkatalytische GAF-Domäne der PDE5 deren katabolische Aktivität stimulieren [Kass *et al.*, 2007]. (Die GAF-Domäne erhielt ihren Namen nach den ersten drei Proteinen, in denen sie gefunden wurde, nämlich der cGMP-spezifischen PDE, der Adenylatzyklase und dem *E.coli* Transkriptionsfaktor FhlA [Martinez *et al.*, 2002].) Rybalkin *et al.* konnten zeigen, dass die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI), nicht aber die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAK) in

glatten Gefäßmuskelzellen die PDE5 phosphoryliert [Rybalkin *et al.*, 2002], wodurch offenbar die cGMP-Bindung an die GAF-Domäne stabilisiert wird [Rybalkin *et al.*, 2003]. Ferner wurde festgestellt, dass die Proteinphosphatase 1 (PP1), welche z.B. als katalytische Untereinheit der Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase (MLCP) in glatten Gefäßmuskelzellen agiert, die PDE5 dephosphoryliert und damit in ihrer Aktivität hemmt [Rybalkin *et al.*, 2002].

Die Phosphodiesterasen konnten in einer Vielzahl von Gewebetypen gefunden werden, von der Retina (PDE6) über Gehirn (PDE1, -2, -6, -10 und -11), Immunsystem (PDE4, -7, -8) und Niere (PDE8 und -9) zu glatten Muskelzellen (PDE1, -3, -4 und -5) [Omori *et al.*, 2007]. Für das kardiovaskuläre System sind vor allem die PDE1, -3 und -5 relevant. Interessanterweise zeigte sich, dass es für die cGMP-Hydrolyse durch die PDE5 durchaus von Bedeutung ist, dass das zyklische Nukleotid durch das NO-sGC-System und nicht den NP-pGC-Weg generiert wurde [Kass *et al.*, 2007]. Darüber hinaus wird durch die Hochregulation von PDE1 und -5 im Herzmuskel das Phänomen der Nitrattoleranz erklärt: Bei chronischer Exposition des Gewebes zu NO-Donatoren büßen diese vermutlich wegen verstärkter Hydrolyse des Effektors cGMP ihre antihypertensive Wirkung ein [Kass *et al.*, 2007].

### ***3.2 Cyclic nucleotide-gated Ionenkanäle, Multidrug resistance protein 5 und cAMP-abhängige Proteinkinase***

Eine weitere cGMP-Zielstruktur sind sogenannte *cyclic nucleotide-gated ion channels (CNG channels)*, also Kationenkanäle, deren Öffnungszustand durch die Bindung zyklischer Nukleotide reguliert wird. Bisher ist ihre Funktion am Besten für Photo- und Geruchsrezeptoren gesichert, wengleich sie auch in zahlreichen anderen Geweben exprimiert sind. In den Außensegmenten von Stäbchen und Zapfen der Retina vermitteln sie bei Bindung von cGMP (in Stäbchen bei Dunkelheit von einer pGC generiert) den Einstrom von Kalzium- und Natriumionen und bewirken dadurch eine Depolarisation der Zellmembran, welche die Glutamatausschüttung in die Synapse auslöst und somit die Signalkette z.B. zur Dunkelwahrnehmung initiiert [Biel *et al.*, 2007]. In olfaktorischen sensorischen Neuronen ist im Regelfall die Gegenwart von cAMP für die Geruchsdetektion essentiell [Kaupp *et al.*, 2002].

Insbesondere CNGA2 ist in arteriellen Endothel- und Muskelzellen exprimiert und scheint dort in Abhängigkeit von zyklischen Nukleotiden einen Kalziumeinstrom zu fördern, wobei die physiologische Relevanz dieser Beobachtung noch nicht geklärt ist [Cheng *et al.*, 2003]. Endotheliale CNGA2 vermittelt wohl vorwiegend cAMP-gesteuerte Prozesse [Cheng *et al.*, 2008].

Die Bedeutung des *Multidrug resistance protein 5 (MRP5)* für glatte Gefäßmuskelzellen ist noch weitgehend unerforscht. Es transportiert unter ATP-Verbrauch cGMP aus der Zelle heraus und kann wie die PDE5 beispielsweise durch Sildenafil gehemmt werden. Experimente mit Arteriolen der Pia mater von Ratten lassen darauf schließen, dass es eine wichtige Rolle in der Regulation der NO-induzierten Vasodilatation übernimmt [Xu *et al.*, 2004].

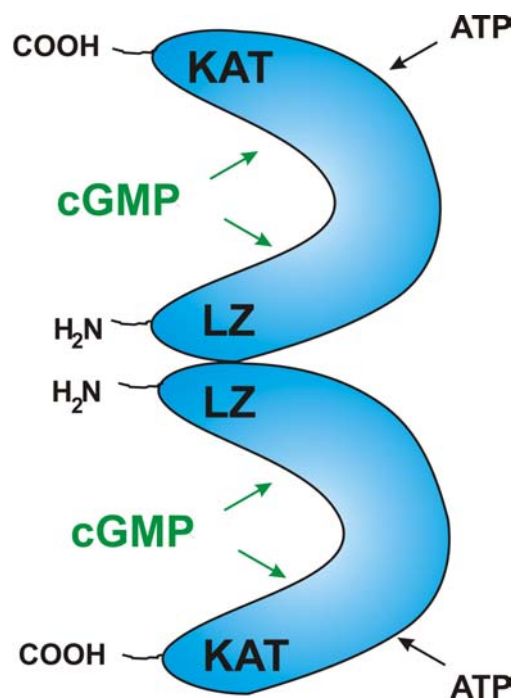
Die cAK zählt nicht zu den klassischen cGMP-Rezeptoren, kann aber unter bestimmten Voraussetzungen durchaus durch cGMP aktiviert werden. Dazu zählen eine sehr hohe intrazelluläre cGMP-Konzentration, die vorwiegend unter pathophysiologischen Bedingungen auftritt [Sausbier *et al.*, 2000], sowie Experimente in permeabilisierten Gefäßen [Wörner, 2006].

### 3.3 Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Da in dieser Arbeit mit IRAG ein Substrat einer cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK) untersucht wurde, soll das Enzym cGK etwas ausführlicher vorgestellt werden.

#### 3.3.1 Struktur und Isoformen

Man unterscheidet die cGK-Typen I und II, die in Säugetieren durch die zwei Gene *prkg1* und *prkg2* kodiert werden und vielfältige Funktionen in verschiedenen Zelltypen übernehmen. Wie in Abb. A.4 schematisch dargestellt ist, sind die cGKs Homodimere der Größe ~75 kDa (I) bis ~86 kDa (II), die sich aus einer katalytischen, einer regulatorischen und einer aminoterminalen Domäne zusammensetzen [Hofmann, 2005].



**Abb. A.4 Struktur der cGMP-abhängigen Proteinkinase**

Die cGK ist ein Homodimer, deren Untereinheiten jeweils zwei cGMP-Bindungsstellen, eine ATP-Bindungsstelle, eine katalytische Domäne (KAT) sowie einen Leuzinzipper (LZ) enthalten, welcher u.a. als Dimerisierungsstelle fungiert. ATP: Adenosintriphosphat, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat. Eine ausführlichere Beschreibung findet sich im Text.

Die katalytische Domäne liegt in der carboxyterminalen Hälfte des Enzyms und enthält eine Peptidbindungstasche sowie eine  $Mg^{2+}$ /ATP-Bindungsstelle, in welcher das  $\gamma$ -Phosphat des ATP auf ein Serin bzw. Threonin des Substrates übertragen wird. Die cGKs phosphorylieren vorzugsweise (aber nicht ausschließlich) Peptide, welche die Consensus-Sequenz RRXSX

enthalten und ähneln hierin der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAK) [Francis *et al.*, 1999]. In der eher aminoterminal gelegenen regulatorischen Domäne liegen zwei homologe cGMP-Bindungsstellen, die sich durch eine unterschiedliche Affinität zu cGMP auszeichnen und (zumindest im Falle der cGKI $\alpha$ ) allosterisch miteinander interagieren [Wall *et al.*, 2003]. Für eine vollständige Aktivierung der cGKs ist die Besetzung aller cGMP-Bindungsstellen erforderlich.

Es existieren zwei Isoformen der cGKI, nämlich cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ , die sich ausschließlich in der aminoterminalen Sequenz ( $\sim$  Aminosäuren 1-100) unterscheiden, welche von zwei alternativen Exons kodiert wird. Die aminoterminal Domäne enthält eine Dimerisierungsstelle in Form eines Leuzin-Isoleuzin-Zippers, der nicht nur für die vermutlich hydrophoben Interaktionen zwischen den Homomeren wichtig ist, sondern auch für die cGKI-Interaktion mit Substraten wie IRAG oder dem Regulator der G-Protein-Signalkaskade 2 (RGS2) (vgl. Kap. A I. 4). Ferner wurden in dieser Enzymhälfte Autophosphorylierungsstellen gefunden, die in Gegenwart von zyklischen Nukleotiden phosphoryliert werden, wodurch die Enzymaktivität sowie die Affinität der cGK zu cGMP und cAMP erhöht werden [Smith *et al.*, 2000]. Auch die Kooperation zwischen den cGMP-Bindungsstellen wird durch eine aminoterminal Region reguliert [Lohmann *et al.*, 1997]. Daneben ist hier eine autoinhibitorische Domäne mit Pseudosubstratsequenzen lokalisiert, die bei fehlender cGMP-Bindung oder Autophosphorylierung die Substratphosphorylierung kompetitiv hemmen [Smith *et al.*, 2000]. Die Aktivierung der cGKI durch cGMP-Bindung oder Autophosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung im Sinne einer Elongation [Wall *et al.*, 2003], die durch eine erhöhte Elektronennegativität infolge der neuen Phosphatbindungen bewirkt wird [Francis *et al.*, 1999]. Dadurch wird der Abstand der autoinhibitorischen Region zur katalytischen Domäne vergrößert und ihr Einfluss verringert, was in einer Phosphorylierung von Substrat und Autophosphorylierungsstellen resultiert [Lohmann *et al.*, 1997].

Durch Modifikation des Aminoterminus wird schließlich die Lokalisation des Enzyms bestimmt. In diesem Sinne ist die Myristoylierung der cGKII essentiell für ihre Bindung an die Plasmamembran [Vaandrager *et al.*, 1998] und ersetzt die nichtexistente Transmembrandomäne des Enzyms [Francis *et al.*, 1999]. Die cGKI, die nicht myristoyliert sondern acetyliert ist, liegt vorwiegend in löslicher Form im Zytosol vor [Francis *et al.*, 1999].

Die cGKs werden durch mikro- bis submikromolare cGMP-Konzentrationen aktiviert [Smolenski *et al.*, 1998], wobei cGMP-abhängige Proteinkinasen entgegen der Namensgebung auch cGMP-unabhängig via Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden können [Hou *et al.*, 2003]. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung ist noch nicht geklärt.

### 3.3.2 Gewebeexpression

Die cGKI $\alpha$  wurde in hohen Konzentrationen in Herz, Lunge und der Kleinhirnrinde nachgewiesen [Keilbach *et al.*, 1992]. In glatten Muskelzellen von Aorta, Magen, Dickdarm, Harnblase und Gebärmutter finden sich beide cGKI-Isoformen, wobei hier die cGKI $\beta$  die überwiegende Form ist, während in humanen Thrombozyten, dem Hippocampus und dem Bulbus olfactorius ausschließlich die cGKI $\beta$  vorhanden ist [Geiselhöringer *et al.*, 2004a]. In niedrigen

Konzentrationen existiert die cGKI auch in Kardiomyozyten, Gefäßendothel, Granulozyten, Chondrozyten, Osteoklasten und Hirnnuclei [Hofmann *et al.*, 2006]. Die cGKII ist vorwiegend in Hirnnuclei, der Dünndarmschleimhaut, der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, der Lunge und in Chondrozyten exprimiert [Hofmann, 2005] sowie in den juxtaglomerulären Zellen, im Bürstensaum der proximalen Tubuli und dem aufsteigenden Teil der dünnen Henleschen Schleife der Niere [Francis *et al.*, 1999]. Im humanen Corpus cavernosum sind beide cGKI-Isoformen vorhanden [Waldkirch *et al.*, 2008], während alle drei cGK-Isoformen in murinen Augen [Gamm *et al.*, 2000] sowie ferner in Niere und Nebenniere [Spießberger, 2007] nachgewiesen wurden.

### 3.3.3 Funktionen von cGKI und cGKII

Entsprechend ihrer vielfältigen Gewebeverteilung erfüllen die cGKs zahlreiche Funktionen, in die man durch Experimente mit genetisch veränderten Zellen bzw. Organismen einen Einblick gewinnen konnte.

Nicht zuletzt durch Versuche mit cGKII-Knockoutmäusen (cGKII<sup>-/-</sup>) erkannte man, dass die cGKII in Chondrozyten eine entscheidende Rolle in der Regulation der **enchondralen Ossifikation** innehat. Die cGKII<sup>-/-</sup>-Mäuse haben bei Geburt eine normale Größe, sind aber ab der etwa 4. Lebenswoche deutlich kleiner als gleichaltrige Wildtypmäuse, was sich auf ein vermindertes Wachstum der langen Röhrenknochen aufgrund einer Desorganisation in der Wachstumsplatte zurückführen lässt [Pfeifer *et al.*, 1996]. Kürzlich konnte die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) als Substrat der cGKII identifiziert werden, deren hemmende Phosphorylierung durch die cGKII zur hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsplatte beiträgt [Kawasaki *et al.*, 2008]. Aktiviert wird die cGKII der Chondrozyten durch cGMP, welches CNP-abhängig generiert wird [Miyazawa *et al.*, 2002].

Ferner ist die cGKII mit dem Chloridkanal *Cystic Fibrosis Conductance Regulator* (CFTR) in der apikalen Membran **intestinaler Mukosazellen** kolokalisiert [Lohmann *et al.*, 1997; Markert *et al.*, 1995]. Es konnte gezeigt werden, dass das hitzestabile *E.coli*-Enterotoxin ST<sub>a</sub> und das endogene Guanylin die intrazelluläre cGMP-Konzentration der Schleimhautzellen erhöhen können, wodurch sie die cGKII aktivieren und somit über eine Öffnung des CFTR eine erhöhte Chlorid- und Wassersekretion ins Lumen im Sinne einer Diarrhö bewirken [Pfeifer *et al.*, 1996].

Zudem werden der cGKII mit der Hemmung der Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen der **Niere** [Wagner *et al.*, 1998] sowie der Inhibition der Angiotensin-stimulierten Natriumreabsorption im proximalen Tubulus [Francis *et al.*, 1999] antihypertensive Wirkungen zugesprochen. Eher überraschend erscheint daher die Beobachtung, dass die cGKII auch die Sekretion von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde fördert [Gambaryan *et al.*, 2003], während durch cGMP-abhängige Aktivierung der PDE2 die Agonisten-induzierte Aldosteronproduktion gehemmt wird und nach Deletion von muriner cGKII die ANP-abhängige Hemmung der ACTH-induzierten Aldosteronsekretion aufgehoben wurde [Nikolaev *et al.*, 2005;

Spiessberger *et al.*, 2009]. Bemerkenswert ist, dass cGKII<sup>-/-</sup>-Mäuse letztlich einen normalen Blutdruck haben, da sich die genannten Mechanismen offenbar ausgleichen [Hofmann, 2005]. Darüber hinaus ist die Wirkung der cGKII relevant für das **Verhalten** von Mäusen. cGKII<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen ein stärker ausgeprägtes Angstverhalten, eine erhöhte Bereitschaft für Alkoholgenuss und eine geringere Empfindlichkeit für die hypnotische Wirkung von Alkohol als Wildtypmäuse [Werner *et al.*, 2004]. Aus verschiedenen Studien wurde außerdem deutlich, dass die cGKII wichtig ist für den **zirkadianen Rhythmus** im Abgleich mit dem Tageslicht [Hofmann *et al.*, 2006].

Auch die cGKI ist in **Neuronen** exprimiert, so zum Beispiel in den dorsalen Anteilen der Spinalganglien, wo sie einen wichtigen Einfluss auf die Wachstumsrichtung sensibler Axone im Embryo hat [Schmidt *et al.*, 2002] und u.a. durch ihre Wirkung auf das Cystein-reiche Protein 2 (CRP2) für die Nozizeption relevant ist [Schmidt *et al.*, 2008]. Unter Umständen reguliert die cGKI auch die Synthese der Substanz P, die in cGKI<sup>-/-</sup>-Knockoutmäusen geringer exprimiert wird [Hofmann, 2005].

Im **Hippocampus** beeinflusst die cGKIβ die späte, proteinsyntheseabhängige Phase von Langzeitpotentialen (L-LTP), ein Korrelat für räumliches Lernen. In Verhaltensstudien mit cGKI<sup>-/-</sup>-Knockoutmäusen konnten allerdings keine Defizite im räumlichen Lernen direkt nachgewiesen werden [Kleppisch *et al.*, 2003]. Wird jedoch die **zerebelläre** cGKIα, die normalerweise in Purkinjezellen hoch exprimiert ist, ausgeschaltet, kommt es zu einem Ausbleiben der Langzeitdepression (LTD) der synaptischen Aktivität in Purkinjezellen. Diese wird als Korrelat für bestimmte Formen des motorischen Lernens gesehen, so dass es in diesem Fall zu einer Beeinträchtigung der Adaptation des vestibulo-okulären Reflexes kommt. Vermutlich phosphoryliert die NO/cGMP-aktivierte cGKI das G-Substrat, welches die Proteinphosphatase 1/2A hemmt, so dass der AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptor vermehrt in phosphoryliertem Zustand an der Plasmamembran vorliegt, was zu dessen Endozytose und damit zu einem Ausbleiben der LTD führt [Feil *et al.*, 2003].

Vorwiegend der cGKIβ wird eine wichtige Rolle in der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala und dem akustisch-getriggerten Angstgedächtnis zugeschrieben [Paul *et al.*, 2008].

Die genaue funktionelle Bedeutung der cGKI im **enterischen Nervensystem** in Anbetracht ihrer Expression in etwa 15 % des Plexus myentericus [Geiselhöringer, 2002] sowie in Cajalzellen des Dünndarms ist noch nicht geklärt. Vermutlich hemmt das Vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) über den NO/cGMP/cGKI-Signalweg die Schrittmacheraktivität der intestinalen Cajalzellen [Kim *et al.*, 2006]. Der gastrointestinale Phänotyp der cGKI<sup>-/-</sup>-Mäuse (siehe Seite 14) deutet jedenfalls auf eine erhebliche Relevanz der cGKI für die Motilität des Magendarmtraktes hin.

Der NO/cGMP-Signalweg bewirkt u.a. durch die Aktivität der intrazellulären cGKI eine Hemmung der **Thrombozytenaggregation** und Fibrinogenrezeptoraktivierung. Einer der molekularen Hauptmechanismen ist hierbei die Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptor-assoziierten cGMP-Kinase-Substratproteins IRAG, die zu einer Reduktion der Agonist-stimulierten

intrazellulären Kalziumkonzentration führt [Antl *et al.*, 2007] (vgl. Kap. A.I. 4.2). Daneben spielt vermutlich aber auch die Phosphorylierung anderer cGKI-Substrate wie des Hitzeschockproteins (HSP27) [Butt *et al.*, 2001], Rap1-GAP2 (GTPase-aktivierendes Protein von Rap1) [Hoffmeister *et al.*, 2008], Thromboxanrezeptor  $\alpha$  [Reid *et al.*, 2003] und des Vasodilatator-stimulierten-Phosphoproteins (VASP) eine Rolle, welches *in vivo* nach NO-Stimulation die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand hemmt [Massberg *et al.*, 2004]. Allerdings scheint die cGKI vor allem bei niedrigeren cGMP-Konzentrationen u.a. über eine erleichterte ADP-Freisetzung [Li *et al.*, 2004] bzw. die Aktivierung von Kinasen wie p38 und ERK (Extrazellulär-Signal regulierte Kinase) auch proaggregatorische Effekte zu vermitteln [Li *et al.*, 2006].

Vermutlich indem sie L-Typ-Kalziumkanäle in Kardiomyozyten hemmt [Schröder *et al.*, 2003], ist die cGKI auch an der negativ inotropen Wirkung von NO im **Herzen** beteiligt [Wegener *et al.*, 2002]. NO und CNP beeinflussen über die Aktivierung der cGKI die Kontraktilität der Kardiomyozyten in konträrer Weise, vermutlich in Abhängigkeit von der intrazellulären Enzymlokalisation. Der Einfluss der cGKI auf die kardiale Hypertrophie ist derzeit noch unklar [Hofmann *et al.*, 2006].

Ähnlich wie in glatten Gefäßmuskelzellen fördert die cGKI die Proliferation und Migration von **Endothelzellen**, vermutlich durch eine verstärkte Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1/2 und p38 [Pyriochou *et al.*, 2007b]. Dieser Effekt wird sowohl durch Hemmung der PDE5, der sGC als auch der cGKI aufgehoben, so dass die klassische NO/sGC/cGMP/cGK-Kaskade als beteiligt angesehen werden kann. Ferner fördert NO auch über einen cGMP-unabhängigen Signalweg die Proliferation des Gefäßendothels und damit die Neovaskularisation [Pyriochou *et al.*, 2007a]. Diese Studien sind konsistent mit der früheren Beobachtung, dass in cGKI-Knockoutmäusen die postischämische Angiogenese, gemessen an Kapillardichte und Blutfluss, reduziert ist [Yamahara *et al.*, 2003].

In anderen Zelltypen, wie Kardiomyozyten, Mesangiumzellen, neutrophilen Granulozyten u.a. wird der cGKI hingegen ein antiproliferativer und proapoptotischer Effekt zugesprochen. Zudem wurde in einigen Tumorzelllinien eine verminderte cGKI-Expression detektiert, beispielsweise in **Colonkarzinomzellen**, in denen insbesondere die  $\beta$ -Isoform supprimiert ist. Die Expression von exogener cGKI $\beta$  in Tumorgewebe bewirkt eine verringerte Invasivität und Proliferation des Gewebes [Hou *et al.*, 2006], wobei dies vermutlich auf eine reduzierte Angiogenese zurückzuführen ist [Kwon *et al.*, 2008].

In **glatten Muskelzellen** vermittelt die cGKI über eine Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration und über kalziumunabhängige Mechanismen die cGMP-abhängige Relaxation (vgl. Kap. AI. 3.3.4). Deutliche Defizite zeigen sich dementsprechend in der Funktionalität verschiedener Organe der cGKI-Knockout-(cGKI<sup>-/-</sup>)-Mäuse.

Beispielsweise ist die Miktion durch den Verlust der cGKI in den Muskelzellen des **Harntrakts** deutlich gestört, da die cGMP-abhängige Relaxation der Urethra erheblich beeinträchtigt und die Blasenmuskulatur hyperaktiv ist [Persson *et al.*, 2000].

Ferner wird die eingeschränkte Reproduktionsfähigkeit von cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen auf ihre erektile Dysfunktion infolge der gestörten cGMP-stimulierten Relaxation der glatten Muskelzellen im **Corpus cavernosum** zurückgeführt, die vermutlich durch die fehlende Aktivierung des cGKI-Substrates BK<sub>Ca</sub>-Kanal mitbedingt ist [Werner *et al.*, 2008].

cGKI<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen auffälligen **gastrointestinalen** Phänotyp mit ausgeprägter Pylorusstenose und Magendilatation, Kontraktion der Ileozökaregion und Dilatation von Duodenum und Zökum sowie einer massiv verlangsamten Chymuspassage [Pfeifer *et al.*, 1998]. Diese Effekte werden hauptsächlich durch die fehlende Relaxation der glatten Muskelzellen in Tunica muscularis und Lamina muscularis mucosae bei NO/cGMP-Stimulation erklärt. Als cGKI-Substrate sind hier neben IRAG [Geiselhöringer *et al.*, 2004b] wohl auch RhoA, MYPT1, Telokin u.a. relevant, die den Effekt der Kalziumdesensibilisierung mitvermitteln [Hofmann *et al.*, 2006]. Letztere ist wohl vor allem in jejunalen Muskelzellen von Bedeutung, während in Colonzellen die cGKI-abhängige Relaxation wohl in erster Linie über eine IRAG-vermittelte Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration erfolgt [Frei *et al.*, 2009].

Im Rahmen von **Feedbackschleifen** beeinflusst die cGKI vorangehende Elemente der NO/cGMP-Signalkaskade. Während die Phosphorylierung der eNOS durch die cGKII den Signalweg wohl noch stärker aktiviert [Butt *et al.*, 2000], wirken Phosphorylierung der PDE5 [Koesling *et al.*, 2005] und Hemmung der sGC [Zhou *et al.*, 2008] gegenregulierend.

### **3.3.4 Funktionen der cGKI in glatten Gefäßmuskelzellen**

Zahlreiche Studien belegen, dass die cGKI auch für die cGMP-abhängige Relaxation **glatter Gefäßmuskelzellen** essentiell ist, welche sich in der Tunica media der Blutgefäße befinden. Die Untersuchung von cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen ergab, dass sich ein Verlust der cGKI vor allem in den ersten 4 Wochen blutdrucksteigernd auswirkt. Zudem konnten vorkontrahierte Aortenringe der cGKI<sup>-/-</sup>-Mäuse im Gegensatz zu denen der Wildtypmäuse nicht durch cGMP-Analoga relaxiert werden [Pfeifer *et al.*, 1998]. Kürzlich wurde auch in glatten Muskelzellen der Aorta hypertensiver Ratten eine verminderte cGKI-Konzentration sowie eine geringere kalziumsenkende Wirkung von cGMP-Analoga nachgewiesen [Di Cesare Mannelli *et al.*, 2009].

Die Regulation des Glattmuskeltonus beinhaltet kalziumabhängige und -unabhängige Mechanismen, wobei die cGKI in beide Wege involviert ist.

Die cGKI $\beta$  bewirkt eine letztlich **zellrelaxierende** Senkung der zytosolischen Kalziumkonzentration zum Beispiel über die Phosphorylierung von IRAG, wodurch die Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)-abhängige Kalziumfreisetzung aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum gehemmt wird (vgl. Kap. A I. 3.2) [Schlossmann *et al.*, 2000]. Weitere Mechanismen, über welche die cGKI den Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum und die Freisetzung aus



intrazellulären Speichern hemmt bzw. die Kalziumelimination fördert und dadurch die Relaxation der Zelle bewirkt, werden im Rahmen der Diskussion ausführlich dargestellt (vgl. Kap. DI).

Das Phänomen, dass durch rezeptorbindende Agonisten eine stärkere Kontraktion bewirkt werden kann als durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, obwohl letztere eine wesentlich höhere intrazelluläre Kalziumkonzentration hervorruft, zeigt, dass der Kontraktionszustand der VSMCs auch kalziumunabhängig moduliert wird. Auch die Tatsache, dass die Agonisten-induzierte Kontraktion länger anhält als die dadurch hervorgerufene Erhöhung der Kalziumkonzentration, deutet auf diese sogenannte „Kalziumsensibilisierung“ des kontraktiven Systems hin. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Hemmung der Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase (MLCP), welche durch Phosphorylierung des CPI-17 (Proteinkinase C-potentiertes-inhibitorisches-Protein für heterotrimere MLCP von 17 kDa) und der MLCP-Untereinheit MYPTI (*Myosin phosphatase targeting subunit 1*) erreicht wird [Hirano, 2007]. Während die Phosphorylierung des CPI-17 -vermutlich durch die kalziumabhängige Proteinkinase C (cPKC)- vor allem für die schnelle Einleitung der initialen Kontraktionsphase in tonischen glatten Muskelzellen verantwortlich ist [Dimopoulos *et al.*, 2007], ist die inhibitorische Phosphorylierung von MYPTI wohl eher für die Aufrechterhaltung der Kontraktion u.a. in phasischen Muskeln wichtig [Lincoln, 2007]. Die Phosphorylierung von MYPTI und CPI-17 (in der späteren Kontraktionsphase) wird von der RhoA-abhängigen Kinase (ROK) katalysiert. Die ROK-Aktivierung durch das monomere G-Protein RhoA wird dann ermöglicht, wenn Agonisten an trimere G-Proteine ( $G_q$ ,  $G_{12,13}$ ) binden, die an Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) gekoppelt sind, welche schließlich die Dissoziation des GDP von RhoA und damit die Bildung eines aktiven RhoA-GTP-Komplexes bewirken [Somlyo *et al.*, 2003]. Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung von CPI-17 und MYPTI [Hirano, 2007] sowie der MLC selbst [Ito *et al.*, 2004] durch diverse andere Kinasen ist derzeit unklar [Hirano, 2007]. Auch die Bedeutung der ROK-induzierten Translokation der MLCP zur Plasmamembran, welche die Dissoziation der MLCP und damit die Hemmung des Proteins nach sich zieht, ist ungeklärt [Ganitkevich *et al.*, 2002].

Analog spricht man von einer **Kalziumdesensibilisierung**, wenn die Agonisten-induzierte Hemmung der MLCP wieder aufgehoben wird, so dass MLC dephosphoryliert und die Zelle relaxiert wird [Nakamura *et al.*, 2007]. Einen entscheidenden Beitrag hierzu leistet die cGKI $\alpha$ , welche MYPTI an einem Serin (Ser695) phosphoryliert, das in direkter Nachbarschaft zu einer der beiden inhibitorischen Phosphorylierungsstellen (Thr696) liegt, und dadurch die Phosphorylierung der letzteren verhindert [Wooldridge *et al.*, 2004]. Umgekehrt postulierten Wörner *et al.*, dass die Phosphorylierung des Thr696 durch die ROK die cGKI/cAK-bedingte Phosphorylierung am Serin 695 verhindert, da sie beobachteten, dass Aortenringe nach Kalziumsensibilisierung über Aktivierung des RhoA/ROK-Signalweg durch 8-Br-cGMP kaum relaxiert werden können [Wörner *et al.*, 2007]. Zusätzlich kann das kleine G-Protein RhoA selbst durch die cGK phosphoryliert und gehemmt werden [Sauzeau *et al.*, 2000]. Während ferner auch

die CPI-17-Phosphorylierung in intestinalen SMCs durch die cGK antagonisiert werden kann [Bonnevier J, 2004], ist dies in VSMCs offensichtlich nicht der Fall [Nakamura *et al.*, 2007]. Auch das kleine Protein Telokin, welches mit dem carboxyterminalen Teil der MLCK identisch ist, aber völlig unabhängig exprimiert wird [Herring *et al.*, 2006], ist für die 8-Br-cGMP-abhängige Kalziumdesensibilisierung in phasischen Glattmuskulgeweben sehr relevant, in kleineren Gefäßen wie der A. femoralis aber nur bedingt [Choudhury *et al.*, 2004] und in großen Gefäßen wie der Aorta offensichtlich gar nicht von Bedeutung [Khromov *et al.*, 2006].

Bemerkenswert ist überdies, dass der NO/cGMP-Signalweg auch eine VSMC-Relaxation *ohne* Dephosphorylierung der MLC bewirken kann. Das kleine hitzestabile Protein 20 (**HSP20**) bindet nach cGMP-abhängiger Phosphorylierung mit erhöhter Affinität an die dünnen, actinhaltigen Filamente und stört damit die Interaktion dieser Filamente mit phosphoryliertem Myosin, welche für die Kontraktion essentiell ist [Rembold *et al.*, 2000]. Es trägt aber vermutlich auch zusätzlich [Salinthonne *et al.*, 2008] zur Kontraktionshemmung bei, indem es die Depolymerisierung der Actinfilamente fördert [Komalavilas *et al.*, 2008]. Die cGMP-abhängige Phosphorylierung von HSP20 konnte *in vitro* allgemein auf gereinigte cGK [Beall *et al.*, 1997] und in kultivierten VSMCs speziell auf transfizierte cGKI $\alpha$  [Brophy *et al.*, 2002] zurückgeführt werden.

Neben der Regulation des kontraktile Status der glatten Gefäßmuskelzellen beeinflusst die cGKI auch **Differenzierung, Wachstum und Zellmotilität** und damit die Angiogenese und Entstehung von Atherosklerose [Wolfsgruber *et al.*, 2003]. Durch Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration wirkt die cGKI der Migration von VSMCs in die Neointima nach Gefäßverletzung entgegen [Zhuang *et al.*, 2005] (vgl. Kap. D I). Ferner erzielt die cGKI bei eher niedrigen NO-Konzentrationen über die Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Kaskade proliferationsfördernde [Wolfsgruber *et al.*, 2003], durch die Phosphorylierung von VASP dagegen eher proliferationshemmende [Chen *et al.*, 2004] Effekte.

In kultivierten VSMCs ist der Einfluss der cGKI auf die Proliferation abhängig von der Zahl der Kultivierungspassagen. Während die aktivierte cGKI in primär kultivierten Zellen die Zellzahl durch Förderung der Adhäsion über eine Hemmung des RhoA/ROK-Signalweges steigert, wirkt die cGKI nach mehrmaliger Zellpassage in Zellen mit synthetischem Phänotyp antiproliferativ, so dass die Zahl lebender Zellen leicht gesenkt wird [Weinmeister *et al.*, 2008].

Überdies zeigten Lukowski *et al.* kürzlich, dass die NO-Effekte auf die Bildung einer Restenose nach Gefäßschaden völlig unabhängig von der cGMP/cGKI-Kaskade sind und die cGKI für den Gefäßumbau vermutlich allenfalls eher im Rahmen einer Atherosklerose denn der Restenosierung eine Rolle spielt [Lukowski *et al.*, 2008]. Ob die (teils) antiproliferative Wirkung von Stickstoffmonoxid in VSMCs möglicherweise durch S-Nitrosylierung diverser Zielproteine oder durch Bindung der mitochondrialen Cytochromoxidase zustande kommt, können nur zukünftige Studien zeigen [Schleicher *et al.*, 2008].

In bestimmten VSMCs wird die cGKI ferner z.T. cGMP-abhängig im Golgiapparat gespalten, so dass das carboxyterminale Fragment cGKI $\gamma$  in den Zellkern transloziert werden kann, wo es

Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element binding protein*) phosphoryliert und anscheinend inhibitorisch auf die VSMC-Proliferation wirkt [Sugiura *et al.*, 2008].

Neueste Ergebnisse zeigen außerdem, dass die cGKI nicht nur für die Angiogenese, sondern auch die Vaskulogenese essentiell ist. Während die Angiogenese auf der Migration reifer Endothelzellen beruht, ist für die Vaskulogenese die Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nötig. An der postnatalen Neovaskularisation nach Ischämie oder Entzündungsreizen sind beide Mechanismen beteiligt und für beide ist offensichtlich die cGKI notwendig [Aicher *et al.*, 2009].

## 4. IRAG

### 4.1 Struktur und Vorkommen

Bei dem „IP<sub>3</sub>-Rezeptor-assoziierten-cGMP-Kinase-Substratprotein“ (IRAG) handelt es sich um ein Protein von circa 125 kDa, das zunächst aus glatten Muskelzellen von bovinem Tracheamembrangewebe isoliert wurde und schon bald mit der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration in Verbindung gebracht wurde [Schlossmann *et al.*, 2000]. Es trägt auch den Namen *murine retrovirus integration site 1 homolog* (MRVI1) und wird vom *Mrv1*-Gen kodiert. IRAG entspricht der *Mrv1a*-Spleißvariante, während die zweite Variante *Mrv1b* aminoterminal um eine hydrophobe Domäne von 84 Aminosäuren kürzer ist [Shaughnessy *et al.*, 1999].

In glatten Muskelzellen und Thrombozyten befindet sich IRAG in einem makromolekularen Komplex mit der cGKI $\beta$  und dem Inositoltriphosphatrezeptor Typ I (IP<sub>3</sub>RI) kernnah am endoplasmatischen Retikulum, wobei die Gegenwart von IRAG für die Interaktion der beiden anderen Komplexpartner zwingend erforderlich ist [Ammendola *et al.*, 2001]. Aus der Beobachtung, dass in den jeweiligen Interaktionsstellen von IRAG und der cGKI $\beta$ , d.h. sowohl im aminoterminalen Bereich von IRAG als auch im aminoterminalen cGKI $\beta$ -Leuzinzipper zahlreiche geladene Aminosäuren (Asp, Glu, Lys und Arg) liegen, wurde die Vermutung abgeleitet, dass die Interaktion zwischen IRAG und der cGKI $\beta$  elektrostatischer Natur ist [Ammendola *et al.*, 2001]. Dies wurde von der Gruppe um Casteel in Experimenten bestätigt, bei denen saure Aminosäuren des cGKI $\beta$ -Leuzinzippers durch basische ersetzt bzw. basische Aminosäuren in der aminoterminalen IRAG-Sequenz gegen saure vertauscht wurden. Aus Untersuchungen mit Proteinstrukturmodellen folgerten Casteel *et al.* zudem, dass die IRAG-Bindungsstelle die Struktur einer  $\alpha$ -Helix hat [Casteel *et al.*, 2005].

In bovinen glatten Muskelzellen konnte Ser696 als Phosphorylierungsstelle für die cGKI $\beta$  identifiziert werden [Ammendola *et al.*, 2001]. Die Phosphorylierungsstelle liegt somit außerhalb der cGKI $\beta$ -Interaktionsstelle, wodurch die Interaktion unabhängig von der Kinaseaktivität ist und durch die permanente Lokalisation der Kinase am Substrat sehr schnelle Antworten auf den entsprechenden Stimulus, also Änderungen der cGMP-Konzentration, möglich sind [Ammendola *et al.*, 2001]. Insbesondere durch Untersuchungen an der IRAG-Deletionsmutante, bei der das Exon 12 entfernt wurde, konnte gezeigt werden, dass eine zentrale *Coiled-coil*-Domäne des IRAG-

Proteins als Interaktionsstelle mit dem IP<sub>3</sub>RI dient und für die Funktion von IRAG in der Zelle essentiell ist [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Mittels des Zwei-Hybrid-Systems konnte ferner belegt werden, dass IRAG zwar mit der cGKI $\beta$ , jedoch nicht mit der cGKI $\alpha$  oder der cGKII interagiert, so dass IRAG ausschließlich durch die cGKI $\beta$ -Isoform phosphoryliert werden kann [Ammendola *et al.*, 2001].

Die Gewebeexpression von IRAG in der Maus wurde mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden ausführlich untersucht. IRAG wurde dabei gemeinsam mit der cGKI $\beta$  vor allem in glatten Muskelzellen der Aorta, des Magens, des Dickdarms, der Harnblase, des Uterus, der Lunge und der Trachea sowie in Thrombozyten [Geiselhöringer *et al.*, 2004a], der Niere und Nebenniere [Spießberger, 2007] gefunden. In geringerem Maße konnte IRAG, wie auch die cGKII, jedoch nicht die cGKI $\beta$ , im Thalamus detektiert werden sowie ferner in Zellen des Plexus myentericus [Geiselhöringer *et al.*, 2004a].

#### **4.2 Funktionen von IRAG**

Eine funktionelle Bedeutung kommt dem IRAG-Protein in Kongruenz mit seiner vorwiegenden Expression in glatten Muskelzellen und Thrombozyten besonders im Hinblick auf das Gefäßsystem, den Gastrointestinaltrakt und das Gerinnungssystem zu.

Kalziummessungen an verschiedenen Zelltypen zeigten IRAG als einen potenten Regulator der intrazellulären Kalziumkonzentration. In transfizierten COS-7-Zellen [Schlossmann *et al.*, 2000], kultivierten glatten Muskelzellen aus Colon [Fritsch *et al.*, 2004] und Aorta [Geiselhöringer *et al.*, 2004b] und in Thrombozyten [Antl *et al.*, 2007] konnte die NO/cGMP-vermittelte Reduktion eines hormongetriggerten Kalziumtransienten durch Ausschaltung der IRAG-Funktion vermindert werden. Hierfür wurden Hormone verwendet, die eine IP<sub>3</sub>-vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem SR bewirkten. Durch Vorinkubation mit cGMP-Analoga konnte in Wildtypzellen bzw. in Zellen, die mit einem IRAG-Vektor transfiziert worden waren, die Höhe der Transienten deutlich vermindert werden. Dies war dagegen in Zellen der erwähnten Deletionsmutante IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup> bzw. in Zellen, die durch Vorbehandlung mit IRAG-*Antisense-mRNS* eine verminderte IRAG-Konzentration hatten [Fritsch *et al.*, 2004] oder aber deren Phosphorylierungsstelle für die cGKI $\beta$  mutiert war [Ammendola *et al.*, 2001], nicht der Fall.

Bei diesen Experimenten wurde darüber hinaus deutlich, dass IRAG offensichtlich nicht an der cGMP-vermittelten Reduktion von Kalziumtransienten beteiligt ist, welche nicht durch Hormonzugabe, sondern durch eine Kaliumdepolarisation getriggert werden [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Ein ähnliches Ergebnis erbrachte der Vergleich von Kraftmessungen an Aortenringen und Colonstreifen (nicht jedoch an jejunalen Muskelstreifen [Frei *et al.*, 2009]) aus Wildtyp- mit IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Mäusen, bei denen nur in Gegenwart eines funktionellen IRAG-Proteins die Muskelproben cGMP-abhängig relaxiert werden konnten, sofern die Muskelstreifen zuvor Hormon-induziert kontrahiert waren. Beruhte die vorangegangene Kontraktion jedoch auf einer

Kaliumdepolarisation, wurde IRAG nicht für die Relaxation benötigt [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Der Phänotyp der IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup>-Maus lässt auf die erhebliche Relevanz des IRAG-Proteins vor allem für die Funktion des Gastrointestinaltraktes schließen: Die genetisch veränderten Mäuse haben eine deutlich reduzierte Lebenserwartung, sowie eine signifikant verlangsamte Magen-Darmpassage bei dilatiertem Magen und Darm und einer ausgeprägten Pylorusstenose [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Während die Absenkung des Blutdrucks durch NO-Donoren in IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup>-Mäusen erwartungsgemäß deutlich geringer ausfällt als in WT-Mäusen, ist ihr basaler Blutdruck überraschender Weise erniedrigt, was auf überschießende Kompensationsmechanismen schließen lässt [Bernhard, 2007].

Vielfältige Experimente mit Thrombozyten aus Wildtyp- und IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup>-Mäusen ergaben, dass IRAG Bestandteil des cGMP/cGK-Signalweges ist, der durch Verminderung intrazellulärer Kalziumtransienten zur Hemmung der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung und -aggregation sowie die Fibrinogenbindung an Thrombozyten führt. Zudem scheint IRAG essentiell für die NO-vermittelte Hemmung einer Thrombusbildung nach Gefäßschaden zu sein [Antl *et al.*, 2007].

IRAG ist auch in völlig anderer Hinsicht ein funktionell relevantes Protein. Dies zeigt die Beobachtung, dass IRAG über seine Interaktion mit der cGKIβ deren cGMP-vermittelte Translokation in den Zellkern verhindert und so deren intrazelluläre Lokalisation beeinflusst [Casteel *et al.*, 2008]. Dadurch lässt sich erklären, dass die cGKIβ in bestimmten Zelltypen wie Osteoklasten oder Fibroblasten die Expression von Genen durch intranukleäre Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie *cAMP-response element binding protein* (CREB), *activating factor-1* und TRII-I regulieren kann, während dies in Zelltypen wie glatten Gefäßmuskelzellen, in denen IRAG und die cGKIβ koexprimiert sind, nicht möglich ist. Der Translokations-hemmende Effekt von IRAG auf die cGKIβ wird allein durch die Bindung von IRAG an den Leuzinzipper der cGKIβ vermittelt und ist somit zum einen völlig unabhängig von der IRAG-Phosphorylierung durch die cGKIβ und zum anderen nicht auf die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zurückzuführen [Casteel *et al.*, 2008].

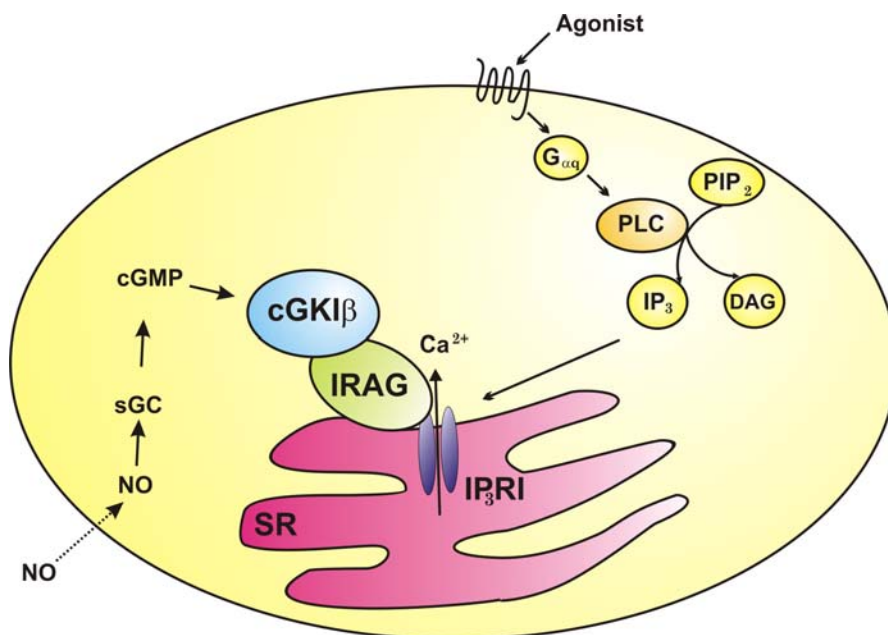
Die Gruppe um Casteel betont, dass die Verankerungswirkung von IRAG für das cGKI-β-Isozym spezifisch ist und diskutieren das Vorhandensein weiterer extranukleärer Proteine, die eine Translokation der cGKI in den Kern verhindern, etwa in Analogie zu den *cAMP-dependent protein kinase anchoring proteins* (AKAPs), welche die Lokalisation der cAMP-abhängigen Proteinkinase regulieren. Als derartige GKAPs wurden bereits Troponin T [Yuasa *et al.*, 1999], CRP4 (Cystein-reiches LIM-only-Protein 4) [Zhang *et al.*, 2007] bzw. CRP2 [Huber *et al.*, 2000], GKAP42 [Yuasa *et al.*, 2000], Vimentin [Macmillan-Crow *et al.*, 1994], die regulatorische

Untereinheit der Myosinphosphatase MYPT1 [Surks *et al.*, 1999], NHERF3 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher 3 regulierender Faktor) u.a. beschrieben.

Die Beobachtung, dass Mrvi1 während der Makrophagenreifung in myelomonozytären Leukämiezellreihen geringer exprimiert ist, deutet darauf hin, dass es zudem in die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung involviert ist [Shaughnessy *et al.*, 1999]. Eine mögliche tumorhemmende Wirkung lässt sich auch aus der Tatsache ableiten, dass Mrvi1 in Pankreaskarzinomzellen in Abwesenheit des Tumor-assoziierten *basic transcription factor 3* stärker exprimiert wird [Kusumawidjaja *et al.*, 2007].

### 5. Ein mögliches Schema der NO-abhängigen Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Muskelzellen durch IRAG

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Signalweg, über den IRAG die Kalziumkonzentration im Zytoplasma glatter Muskelzellen NO-abhängig reguliert.



**Abb. A.5 Ein mögliches Schema der NO-abhängigen Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Muskelzellen durch IRAG**

NO: Stickstoffmonoxid, sGC: lösliche Guanylatzyklase, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I, IP<sub>3</sub>RI: Inositoltriphosphatrezeptor I, IRAG: IP<sub>3</sub>R- assoziiertes cGK-Substrat, SR: Sarkoendoplasmatisches Retikulum, Ca<sup>2+</sup>: Kalziumion, G<sub>αq</sub>: α- Untereinheit eines G-Proteins, PLC: Phospholipase C, PIP<sub>2</sub>: Phosphoinositolbiphosphat, IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerin

Die Bindung von Agonisten wie Noradrenalin an einen heptameren Transmembranrezeptor löst die G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) aus, woraufhin diese die Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphoinositolbiphosphat (PIP<sub>2</sub>) katalysiert [Webb, 2003]. IP<sub>3</sub> erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des IP<sub>3</sub>-Rezeptors (IP<sub>3</sub>RI) und fördert dadurch die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum

(SR) in das Zytosol der Muskelzelle. Eben diese Kalziumfreisetzung wird durch IRAG antagonisiert, sofern eine Phosphorylierung durch die cGKI $\beta$  im IRAG-cGKI $\beta$ -IP<sub>3</sub>RI-Komplex erfolgt ist [Geiselhöringer *et al.*, 2004b]. Letzteres geschieht nach einer verstärkten cGMP-Produktion durch die sGC, welche durch NO aktiviert wird.

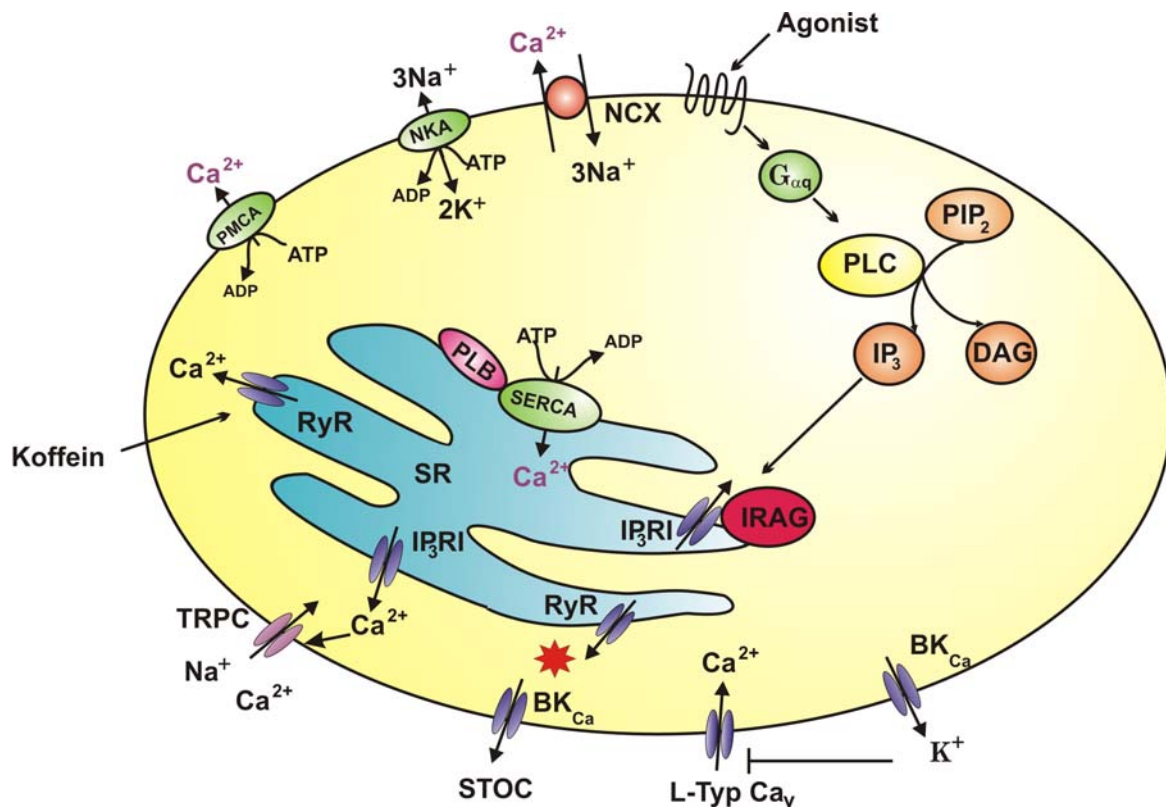
## II. Zur Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen

In glatten Muskelzellen wird durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration in erster Linie der Kontraktionszustand bestimmt. Zur Kontraktion kommt es demnach bei erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration nach Bindung von Kalzium an Calmodulin. Der entstandene Kalzium-Calmodulin-Komplex aktiviert die Myosin-Leichte-Kette-Kinase (MLCK), welche nun die Myosin-Leichte-Kette (MLC) am Serin 19 phosphoryliert. Hierdurch wird die MLC in die Lage versetzt, mit Aktin zu interagieren, welches die Myosin-ATPase aktiviert. Diese stellt die Energie für die Querbrückenbildung und -lösung zwischen Myosin und Aktin bereit, so dass die Myosin- und Aktinfilamente immer weiter ineinander gleiten und sich die Muskelzelle somit kontrahiert. Die Kontraktion wird durch Dephosphorylierung der MLC via die Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase (MLCP) beendet [Webb, 2003].

Eine **Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration** erfolgt durch Kalziumeinstrom aus intrazellulären Speichern, z.B. dem Sarkoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien, sowie aus dem Extrazellulärraum durch Ionenkanäle der Plasmamembran (vgl. Abb. A.6). Hier unterscheidet man die spannungs- von der rezeptorabhängigen Aktivierung bzw. die Kanalöffnung nach Stimulation durch intrazelluläre *second messenger* [Ganitkevich *et al.*, 2002]. Aus dem Extrazellulärraum strömt Kalzium z.B. durch die spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle sowie durch nichtselektive Kationenkanäle wie den *Canonical Transient Receptor Potential Channel (TRPC)*, die besonders für den speicherabhängigen Kalziumeinstrom (SOCE) verantwortlich sind [Leung *et al.*, 2008].

Die extrazelluläre Bindung von Agonisten wie Noradrenalin, Angiotensin II und Phenylephrin an heptamere Rezeptoren der Plasmamembran bewirkt eine Aktivierung heterotrimerer G-Proteine, durch welche beispielsweise die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Diese kann aus dem Membranlipid Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) generieren [Webb, 2003]. DAG aktiviert unter anderem die Proteinkinase C, die beispielsweise L-Typ-Kalziumkanäle phosphoryliert und dadurch einen Kalziumeinstrom auslöst. IP<sub>3</sub> bindet wiederum an den Inositoltriphosphat-Rezeptor I (IP<sub>3</sub>RI), welcher am SR lokalisiert ist und Kalzium ins Zytoplasma entlässt [Krizanova O, 2003].

Am SR ist neben dem IP<sub>3</sub>RI vor allem der Ryanodinrezeptor (RyR) von Bedeutung. Beide Kanäle sind sensibel für eine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, so dass sie auch gleichzeitig auf den selben Reiz reagieren können [Sanders, 2001]. Dennoch ist für den IP<sub>3</sub>R der entscheidende Stimulus die Erhöhung der IP<sub>3</sub>-Konzentration.



**Abb. A.6 Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen**

Die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgt durch Einstrom von Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Inositoltriphosphatrezeptor I ( $IP_3RI$ ) und den Ryanodinrezeptor (RyR). Die Aktivierung des  $IP_3RI$  durch  $IP_3$  und die Hemmung durch IRAG wurden bereits in Abb. A.5 gezeigt. Die Offenwahrscheinlichkeit von RyR wird durch Koffein erhöht. Auch der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle (L-Typ  $Ca_v$ ) und nichtselektive Kationenkanäle wie TRPC (*Canonical Transient Receptor Potential Channel*) erhöht die  $[Ca^{2+}]_i$ . Die angedeutete Interaktion zwischen  $IP_3RI$  und TRPC wird in Kap. D.I ausführlicher beschrieben.

Die ATP-abhängigen Mechanismen der sogenannten  $Ca^{2+}$ -Clearance zur Senkung der  $[Ca^{2+}]_i$  sind violett gekennzeichnet ( $Ca^{2+}$ ) und beinhalten den Transport von  $Ca^{2+}$  ins SR durch die Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA) sowie den  $Ca^{2+}$ -Transport in den Extrazellulärraum durch die Plasmamembran Kalzium-ATPase (PMCA) und den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX). Der NCX bezieht seine Energie aus dem Aufbau eines Natrium ( $Na^+$ )-Gradienten durch die Natrium-Kalium-ATPase (NKA).

Die Öffnung mehrerer RyR induziert die Bildung von  $Ca^{2+}$ -Sparks, die durch einen roten Stern symbolisiert werden\*. Diese Sparks bewirken spontane transiente Auswärtsströme (STOC) durch Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ ). Kalium ( $K^+$ )-Ströme durch  $BK_{Ca}$  hyperpolarisieren die Zelle und bewirken dadurch eine Hemmung der L-Typ  $Ca_v$ , wodurch die  $[Ca^{2+}]_i$  ebenfalls gesenkt wird.

IRAG:  $IP_3R$ - assoziiertes cGK-Substrat, PLB: Phospholamban,  $G_{\alpha q}$ :  $\alpha q$ -Untereinheit eines trimeren G-Proteins, PLC: Phospholipase C,  $PIP_2$ : Phosphoinositolbiphosphat,  $IP_3$ : Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerin, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat.

Eine **Erniedrigung der Kalziumkonzentration**, die letztlich auf die Relaxation der Muskelzelle hinausläuft, wird zum einen durch die meist cAMP- oder cGMP-abhängige Hemmung der eben genannten Mechanismen bewirkt (vgl. Kapitel D I.), zum anderen durch den aktiven Transport von Kalzium aus dem Zytoplasma. Letzteres geschieht ins SR durch die magnesium-abhängige Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA), in die Mitochondrien durch einen Kalzium-Uniporter oder in den Extrazellulärraum durch die Kalzium-



ATPase der Plasmamembran (PMCA) und den Natrium-Kalzium-Austauscher. Die SERCA wird durch die Interaktion mit Phospholamban gehemmt, kann aber nach dessen Dissoziation einen ca. 10.000-fachen Kalziumgradienten zwischen SR und Zytosol aufbauen. Im Inneren des SR wird das Kalzium zudem durch Proteine wie Calsequestrin und Calreticulin gebunden [Sanders, 2001]. Einen aktiven Beitrag zur Senkung der zytosolischen Kalziumkonzentration leisten auch die nichtselektiven Kationenkanäle wie *small-* bzw. *large-conductance* kalziumaktivierte Kaliumkanäle (SK- bzw. BK-Kanäle), die durch Hyperpolarisierung der Membran die Hemmung spannungsabhängiger Kalziumkanäle bewirken. Sie werden u.a. durch sogenannte Kalzium-Sparks, also lokale, kurzzeitige, submembranöse Kalziumfreisetzungen aus dem SR aktiviert. Diese entstehen durch die zeitgleiche Öffnung eines Clusters von mindestens zehn verschiedenen Ryanodinrezeptoren [Jaggar et al., 2000]. Befinden sich die Ryanodinrezeptoren in der unmittelbaren Umgebung von BK<sub>Ca</sub>-Kanälen, regen sie diese zur Ausbildung spontaner transientser Auswärtsströme (STOCs) an, welche die Zelle hyperpolarisieren [Nelson et al., 1995]. Eine ähnliche transiente Kalziumfreisetzung aus IP<sub>3</sub>-Rezeptoren bewirkt Kalziumwellen, welche sich über die gesamte Zelle ausbreiten können [Jaggar et al., 2000].

### III. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des cGMP-abhängige Kinase-Substrates IRAG für die Kalziumregulation in glatten Gefäßmuskelzellen anhand der IRAG-Knockout (IRAG<sup>-/-</sup>)-Maus zu untersuchen.

Vorangegangene Experimente an Aortenmuskelzellen der Deletionsmutante IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup> - einer Mauslinie, in der ein verkürztes IRAG-Protein exprimiert wird, bei dem die IRAG-Interaktionsstelle mit dem IP<sub>3</sub>R zerstört ist - haben ergeben, dass Noradrenalin-induzierte Kalziumfreisetzungen durch das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP nur gehemmt werden können, wenn diese Interaktionsstelle intakt ist. Um eventuelle Störeinflüsse durch das IRAG-Fragment auszuschließen, sollten entsprechende Untersuchungen an der kürzlich entwickelten IRAG<sup>-/-</sup>-Mauslinie, in der IRAG auf Grund einer Leserahmenverschiebung im IRAG-Gen nicht synthetisiert wird, durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden VSMCs der Aorta aus WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Maus isoliert, kultiviert und anschließend intrazelluläres Kalzium mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gemessen.

Ferner sollte die Expression von IRAG, der cGK-Isoformen und anderer kontraktile Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Maus verglichen werden, um zum einen die erfolgreiche Ausschaltung der IRAG-Proteinsynthese zu verifizieren und zum anderen den Einfluss der IRAG-Defizienz auf die Expression anderer Proteine zu detektieren. So sollen eventuell Rückschlüsse auf mögliche Kompensationsmechanismen in der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus bzw. auf physiologische Interaktionspartner IRAGs in der WT-Maus gezogen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der es möglich ist, auch an *frisch isolierten* Gefäßmuskelzellen Kalziummessungen durchzuführen, um den Einfluss der cGMP/cGK-Signalkaskade auf adrenerge Signalwege zu untersuchen, hierbei aber

kultivierungsbedingte Störgrößen wie die Veränderung der Differenzierung der Zellen oder des Expressionsmusters von Proteinen zu vermeiden. Anforderungen an eine solche Methode sind, dass die Einzelzellen während des gesamten Experimentes vital sind und durch Noradrenalin und 8-Br-cGMP stimuliert werden können.

Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in isolierten Gefäßmuskelzellen war insbesondere deshalb von Interesse, da zytosolische Kalziumschwankungen den Tonus der Muskelzellen und damit im lebenden Organismus das Gefäßlumen beeinflussen können. Besonders die Tonusveränderung kleiner Widerstandsgefäße kann Auswirkungen auf den Blutdruck haben, weswegen sie bevorzugt untersucht werden sollten. Da die Isolation einzelner Zellen aus murinen Widerstandsgefäßen aber auf Grund ihrer Größe nicht realisierbar ist, sollten in dieser Arbeit die gut zugänglichen, aber im Vergleich zur Aorta deutlich kleineren Beinarterien als Modelle für Widerstandsgefäße dienen und ihre Muskelzellen für die Kalziummessungen verwendet werden.

## B Material und Methoden

### I. Kalziummessungen an glatten Gefäßmuskelzellen

#### 1. Isolation und Kultivierung glatter Muskelzellen der murinen Aorta

<b>PBS:</b>		<b>Kalziumfreier Puffer:</b>	
NaCl ( <i>Roth</i> )	134 mM	Na-Glutamat ( <i>Sigma</i> )	85 mM
KCl ( <i>Roth</i> )	3 mM	NaCl ( <i>Roth</i> )	60 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O ( <i>Roth</i> )	8 mM	HEPES ( <i>Roth</i> )	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( <i>Roth</i> )	2 mM	KCl ( <i>Roth</i> )	5,6 mM
<i>Aqua bidest</i>		MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O ( <i>Roth</i> )	1 mM
<b>pH = 7,4</b>		<i>Aqua bidest</i>	
		<b>pH = 7,4</b>	
Beide Puffer wurden im Anschluss an ihre Herstellung autoklaviert.			
<b>Enzymlösung A:</b>		<b>Enzymlösung B:</b>	
BSA Fraktion V ( <i>Fluka</i> )	1 mg/ml	BSA Fraktion V ( <i>Fluka</i> )	1 mg/ml
DTT ( <i>Gerbu</i> )	1 mg/ml	Hyaluronidase ( <i>Sigma</i> )	1 mg/ml
Papain ( <i>Sigma</i> )	0,70 mg/ml	Kollagenase F ( <i>Sigma</i> )	1 mg/ml
<i>in Kalziumfreiem Puffer</i>		<i>in Kalziumfreiem Puffer</i>	

Nach Tötung von 4 bis 6 adulten Tiere mit Diethylether (*Roth*) wurden die Aorten aus den Organismen herauspräpariert, in PBS überführt und unter dem Binokular von umgebendem Fettgewebe sowie intravasalem Blut gesäubert.

Alle folgenden Schritte der Isolation und Kultivierung wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkulturen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Aus dem gleichen Grund wurden die Enzymlösungen A und B vor ihrer Verwendung steril filtriert.

Die gereinigten Aorten wurden für 40 bis 50 Minuten in 1,5 ml Enzymlösung A in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert und daraufhin zwei Minuten mit 300 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurde das Pellet in 1,5 ml Enzymlösung B überführt und für ca. 12 bis 20 Minuten wiederum bei 37 °C inkubiert. Während dieses zweiten Verdauschrittes wurden die Gefäße ab der 6. Minute in circa dreiminütigem Abstand durch zwei- bis dreimaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. War mit bloßem Auge zu erkennen, dass die Gefäßstruktur zerstört und nur noch eine amorphe Masse (Extrazellulärmatrix) zu sehen war, wurde der Verdau abgestoppt, indem die Zellsuspension in 10 ml Medium überführt wurde.

Nachdem die Lösung 7 Minuten mit 180 x g (ROTANTA/AP, *Hettich*) bei Raumtemperatur zentrifugiert worden war, wurde der Überstand abgesaugt, und 1 ml Medium zum Pellet hinzugefügt.

Nun wurde in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und die Vitalität mit einer Trypanblaufärbung bestimmt, wobei 18 µl Zellsuspension mit 2 µl Trypanblaulösung (*Sigma*) gemischt wurden. Tote Zellen färbten sich auf diese Weise dunkelblau an, lebende Zellen hellblau. Die Zellausbeute variierte von ca. 60.000 bis 300.000 Zellen pro Aorta, wobei die Vitalität meist über 96 % lag.

Die Zellen wurden in 12-Loch-Platten (*Nunc*) auf Glasplättchen mit 20 mm Durchmesser (*Menzel-Gläser*) ausgesät, wobei Dulbecco's MEM Medium (DMEM, *Gibco Invitrogen*) verwendet wurde mit einem Zusatz von 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep, *PAA*) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS, *Gibco*). Die Kulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

Nach drei Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, danach in zweitägigem Abstand. Je nach der Dichte, in der die Zellen ausgesät wurden (30.000 bis 150.000), waren die Plättchen nach 8 bis 14 Tagen so dicht bewachsen, dass die Messungen der Kalziumkonzentrationen durchgeführt werden konnten. Die optimale Zelldichte für die Messungen war erreicht, wenn sich die Zellen an ihren Ausläufern berührten, jedoch noch gut voneinander abgrenzbar waren und nicht übereinander wuchsen. 24 bis 48 Stunden vor Beginn der Messungen wurde das Medium durch serumfreies ersetzt, um im Serum enthaltene Hormone und sonstige unbekannte Bestandteile auszuwaschen.

#### Vorbereitung der Messkammern:

##### **Tyrode:**

NaCl ( <i>Roth</i> )	140 mM
HEPES ( <i>Roth</i> )	5 mM
KCl ( <i>Roth</i> )	5 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Roth</i> )	2 mM
MgSO <sub>4</sub> ( <i>Roth</i> )	1,2 mM

*Aqua bidest*

Glucose ( <i>AppliChem</i> )	10 mM
------------------------------	-------

**pH = 7,4**

Die Tyrode wurde direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert und kurz vor ihrer Verwendung mit Glucose versetzt.

##### **Fura-2-AM-Tyrode (3,3 µM):**

Fura-2-AM in DMSO (1 mM) ( <i>Calbiochem</i> )	2 µl
BSA Fraktion V 20% ( <i>Fluka</i> )	20 µl
Tyrode	580 µl

Am Messtag wurden die bewachsenen Glasplättchen mit Hilfe einer Kanüle und einer Pinzette aus den 12-Loch-Platten in je eine Messkammer überführt und mit 200 µl Tyrode bedeckt. Die Messkammern sind zweiteilige Messingringe, zwischen denen je ein Glasplättchen mit 20 mm Durchmesser festgeschraubt werden kann. Diese Kammern können so in das Mikroskop eingepasst werden, dass Zellen, die auf dem Glasplättchen angewachsen sind, optimal fokussiert werden können. Im Dunkeln wurden anschließend je 300 µl der Fura-2-AM-Tyrode (vgl. Kap. BI.3.1) hinzupipettiert, welche somit in einer Fura-2-AM-Endkonzentration von 2,0 µM eine Stunde lang einwirken konnte, wobei die Messkammern im Dunkeln gelagert wurden, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Daraufhin wurden die Messkammern dreimal mit Tyrode gewaschen und zuletzt mit 500 µl Tyrode gefüllt. Nach 30 Minuten wurde die erste Kammer ins Mikroskop eingesetzt, so dass die Zellen unter 100facher Vergrößerung fokussiert werden konnten.

## 2. Gewinnung frisch isolierter glatter Muskelzellen muriner Beinarterien

### 2.1 Isolierung unter Verwendung der Kollagenase F (Sigma)

#### Kalziumfreie Lösung:

Na-Glutamat ( <i>Sigma</i> )	80 mM
NaCl ( <i>Roth</i> )	55 mM
HEPES ( <i>Roth</i> )	10 mM
KCl ( <i>Roth</i> )	5,6 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O ( <i>Roth</i> )	2 mM

*Aqua bidest*

**pH=7,4**

Die Kalziumfreie Lösung wurde im Anschluss an die Herstellung autoklaviert.

#### Enzymlösung C:

BSA Fraktion V ( <i>Fluka</i> )	1 mg/ml
DTT ( <i>Gerbu</i> )	1 mg/ml
Papain ( <i>Sigma</i> )	0,7 mg/ml

*in Kalziumfreier Lösung*

#### Enzymlösung D:

BSA Fraktion V ( <i>Fluka</i> )	1 mg/ml
Hyaluronidase ( <i>Sigma</i> )	1 mg/ml
<u>Kollagenase F (<i>Sigma</i>)</u>	1 mg/ml
Trypsin-Inhibitor ( <i>Sigma</i> )	0,5 mg/ml

*in Kalziumfreier Lösung*

Nach Tötung einer 8-11 Wochen alten Versuchsm Maus mit Diethylether wurden beidseitig jeweils die A. tibialis sowie das distale Drittel der A. femoralis entnommen und in einer Petrischale mit Kalziumfreier Lösung bei 4°C zwischengelagert. Unter einem Binokular wurden die Gefäße mit feinen Pinzetten vom umgebenden Fettgewebe und Skelettmuskel sowie intravasalem Blut gesäubert, woraufhin sie für 40 Minuten in 0,5 ml Enzymlösung C bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Anschließend wurden sie für ca. 10-20 Sekunden mittels einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet in 0,5 ml

Enzymlösung D aufgenommen. In dieser Lösung verblieb das Material für 15 Minuten, ebenfalls bei 37°C im Wasserbad.

### 2.2. Isolierung unter der Verwendung der Kollagenase IV (Worthington)

Enzymlösung C*:		Enzymlösung D*:	
BSA Fraktion V( <i>Fluka</i> )	1 mg/ml	BSA Fraktion V( <i>Fluka</i> )	1 mg/ml
DTT ( <i>Gerbu</i> )	1 mg/ml	Hyaluronidase ( <i>Sigma</i> )	1 mg/ml
Papain ( <i>Sigma</i> )	0,7 mg/ml	<u>Kollagenase IV(Worthington)</u>	2 mg/ml
in Kalziumfreiem Puffer (vgl. Kap. B.I.1)		Trypsin-Inhibitor ( <i>Sigma</i> )	0,5 mg/ml
		in Kalziumfreiem Puffer	

Die Ergebnisse der ersten Messreihe waren nicht zufriedenstellend, da die mit Methode 2.1 isolierten Zellen auf Applikation von Noradrenalin und Phenylephrin keinerlei Reaktion im Hinblick auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration zeigten (vgl. Kapitel C3.1.1). Die deshalb durchgeführte Modifikation der Zellisolation bezog sich auf den zweiten Verdauschritt. Hierbei wurde nicht nur die Zusammensetzung der Enzymlösung D verändert, sondern auch die Inkubationsdauer: Statt nur für 15 Minuten wurden die Gefäße nun für 24 Minuten in Lösung D\* belassen, wobei die Wasserbadinkubation bei 37°C alle 8 Minuten zur Resuspension mittels einer Glaspipette unterbrochen wurde, um die Gefäße besser in der Enzymlösung zu verteilen und die Zellen so den Enzymen zugänglicher zu machen. Überdies wurde Kalziumfreier Puffer statt Kalziumfreier Lösung verwendet.

#### Vorbereitung der Messkammern (für beide Verdauvarianten gleich):

Messpuffer:	
NaCl ( <i>Roth</i> )	134 mM
HEPES ( <i>Roth</i> )	10 mM
KCl ( <i>Roth</i> )	6 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Roth</i> )	2 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O ( <i>Roth</i> )	1 mM
<i>Aqua bidest</i>	
Glucose ( <i>AppliChem</i> )	10 mM
<b>pH = 7,4</b>	
Der Puffer wurde direkt nach seiner Herstellung autoklaviert und kurz vor seiner Verwendung mit sterilfiltrierter Glucose versetzt.	
<b>Fura-2-AM-Messpuffer (3,3 µM):</b>	
Fura-2-AM in DMSO (1mM) ( <i>Calbiochem</i> )	2 µl
BSA Fraktion V 20% ( <i>Fluka</i> )	20 µl
Messpuffer	580 µl

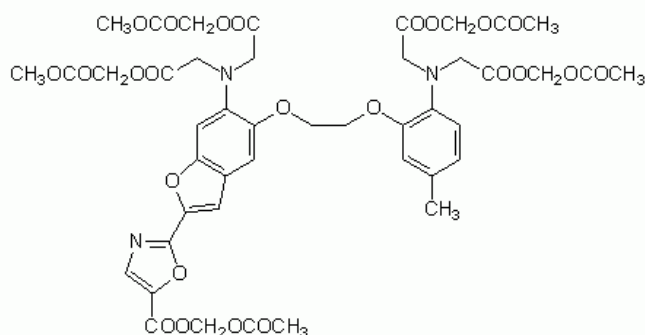
Im Anschluss an den zweiten Verdauschritt wurde die Zelllösung abermals für etwa 10 bis 20 Sekunden in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 0,4 ml Kalziumfreier Lösung bzw. Kalziumfreiem Puffer mit 1 mg/ml BSA aufgenommen. Darin wurde es für 10 Minuten auf Eis gelagert, daraufhin noch mal zunächst mit Hilfe einer Glaspipette, dann mit einer 200 µl-Pipette resuspendiert und in ca. 200 µl-Portionen auf die Messkammern verteilt. Damit die Zellen an den Glasplättchen besser anhafteten, wurden die Plättchen zuvor mit jeweils 2 µl Cell-Tak<sup>®</sup> (*BD Biosciences*) beschichtet. Hierbei handelt es sich um eine Proteinlösung, die auf einem Proteinextrakt der Miesmuschel basiert und zur verbesserten Adhäsion und Immobilisation von Zellen auf verschiedenen Substraten verwendet wird (vgl. Produktinformation *BD Biosciences*).

Nach Auftragen der Zellsuspension in die Messkammer wurden diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, während derer die Zellen auf das Plättchen absanken und adhärten. Daraufhin wurden zu jeder Kammer im Dunkeln 300 µl der Fura-2-AM-Messpuffer-Mischung hinzugefügt, welche für 40 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln in den Kammern verblieb (Fura-2-AM-Konzentration somit 2,0 µM). Anschließend wurden die Kammern zweimal mit Messpuffer gewaschen, am Schluss mit 500 µl Messpuffer gefüllt und für weitere 10 Minuten bis zum Messbeginn im Dunkeln gelagert.

### 3. Kalzium-Imaging mit Fura-2

#### 3.1 Fura-2

Die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 (1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure) (*Calbiochem*) durchgeführt. Das Prinzip dieses Messverfahrens beruht auf der Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes, sein Emissionsverhalten in Abhängigkeit der umgebenden Kalziumkonzentration sowie der Anregungswellenlänge zu ändern und wurde von Grynkiewicz erstmals beschrieben [Grynkiewicz *et al.*, 1985].



**Abb. B.1 Strukturformel von Fura-2-AM**

(aus: <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/PDS/344906-000.pdf>)

Da es sich bei Fura-2 um eine hydrophile Säure mit fünf negativ geladenen Carboxylgruppen handelt, die nicht durch Diffusion ins Zellinnere gelangen kann, wurden die Zellen mit dem nicht-fluoreszierenden Fura-2-Acetomethylester (Fura-2-AM) inkubiert (vgl. Abb. B.1). Diese Substanz ist lipophil und somit membrangängig. Innerhalb der Zelle wird der Acetomethylester von intrazellulären Esterasen abgespalten, sodass die freigewordenen Carboxylgruppen eines Fura-2-Moleküls einen Chelatkomplex mit exakt einem Kalziumion bilden können und der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann.

Fura-2 ändert seine Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der vorherrschenden Kalziumkonzentration: in kalziumfreier Umgebung zeigt Fura-2 ein Fluoreszenzmaximum bei Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 380$  nm. Mit steigender Kalziumbindung nimmt diese Fluoreszenzintensität ab. Für die Anregungswellenlänge  $\lambda = 340$  nm ist dagegen die Fluoreszenzintensität bei hoher Kalziumbindung maximal und sinkt mit fallender Kalziumkonzentration (vgl. Tab. 1).

	$[Ca^{2+}] \uparrow$	$[Ca^{2+}] \downarrow$
$\lambda = 340$ nm	$F_i \uparrow$	$F_i \downarrow$
$\lambda = 380$ nm	$F_i \downarrow$	$F_i \uparrow$

Tab. 1: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität  $F_i$  von Fura-2 von der Anregungswellenlänge  $\lambda$  und der Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]$

Somit erhält man durch Errechnung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen  $\lambda = 340$  nm und  $\lambda = 380$  nm  $F_{340}/F_{380}$  ein Maß für die Kalziumkonzentration. Der Vorteil dieser ratiometrischen Methode ist, dass man die Kalziumkonzentration unabhängig von Konzentrationsschwankungen des Farbstoffs innerhalb der Zelle, Zelldicke, Kamerasensitivität u.ä. betrachten kann. Ein Abfall der Farbstoffkonzentration kann zum Beispiel durch photochemischen Zerfall bewirkt werden. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität ist in Abbildung B.2 graphisch dargestellt.

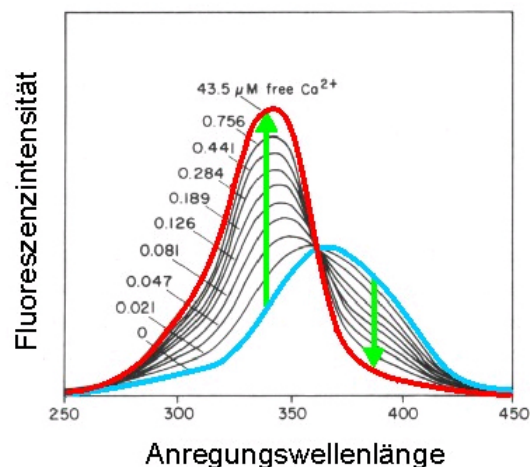


Abb. B.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs Fura-2 von der Anregungswellenlänge und der vorherrschenden Kalziumkonzentration  
 x-Achse: Anregungswellenlänge  $\lambda$  in nm; Rote Kurve: Fluoreszenzintensität bei einer Kalziumkonzentration von 43,5  $\mu$ M; Blaue Kurve: Fluoreszenzintensität in kalziumfreier Umgebung.  
 (nach [Grynkiwicz *et al.*, 1985]; <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/cellfur.htm>)



Die Emissionswellenlänge des angeregten Farbstoffs Fura-2 ist weitgehend unabhängig von der Kalziumkonzentration und variiert in einem Bereich von  $\lambda = 505$  nm (kalziumgebunden) bis  $\lambda = 512$  nm (kalziumfrei).

### 3.2 Messanlage

Für die Kalziummessungen wurde eine Anlage zur analytischen Fluoreszenzmikroskopie der T.I.L.L. Photonics GmbH (Martinsried) verwendet, die aus den Einheiten *Polychrome IV* und der CCD Kamera *IMAGO* besteht.

Eine zentrale Bedeutung kommt hierbei dem Monochromator *Polychrome IV* zu, der eine 150 Watt-Xenon-Lampe enthält, welche weißes Licht entsendet. Nach Bündelung durch zwei Linsen und einen torischen Spiegel zu einem Strahl wird dieses Licht mittels eines parabolischen Spiegels auf ein Gitter gelenkt, das mit einem galvanometrischen Scanner verbunden ist. Dieses Gitter erzeugt ein Spektrum, aus dem je nach Einstellung des Scanners Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgewählt und auf den Lichtleiter fokussiert wird, der selbiges zum invertierten Mikroskop *Axiovert 35 M (Zeiss)* transportiert. Für die Messungen wurden die Wellenlängen  $\lambda = 350$  nm und  $\lambda = 380$  nm ausgewählt, da Licht kleinerer Wellenlängen (z.B. 340 nm) durch den Filter des hier verwendeten Mikroskops herausgefiltert wird. Über einen Epifluoreszenzkondensator wird der monochromatische Lichtstrahl in das Mikroskop eingeschleust und durch einen Spiegel auf das Glasplättchen mit den Gefäßmuskelzellen gelenkt. Hierbei werden ausschließlich die Zellen direkt beleuchtet, die im Gesichtsfeld liegen, das bei der Betrachtung durch Okular und Objektiv (Öl-Immersionsobjektiv mit 100facher Vergrößerung; Öl: Immersol® 518F, Zeiss) eingestellt werden kann. Die Photonen, die durch die angeregten Fura-2-Moleküle emittiert werden, werden von der peltiergekühlten CCD Kamera *Imago* detektiert und die digitalisierten Daten zum Computer weitergeleitet.

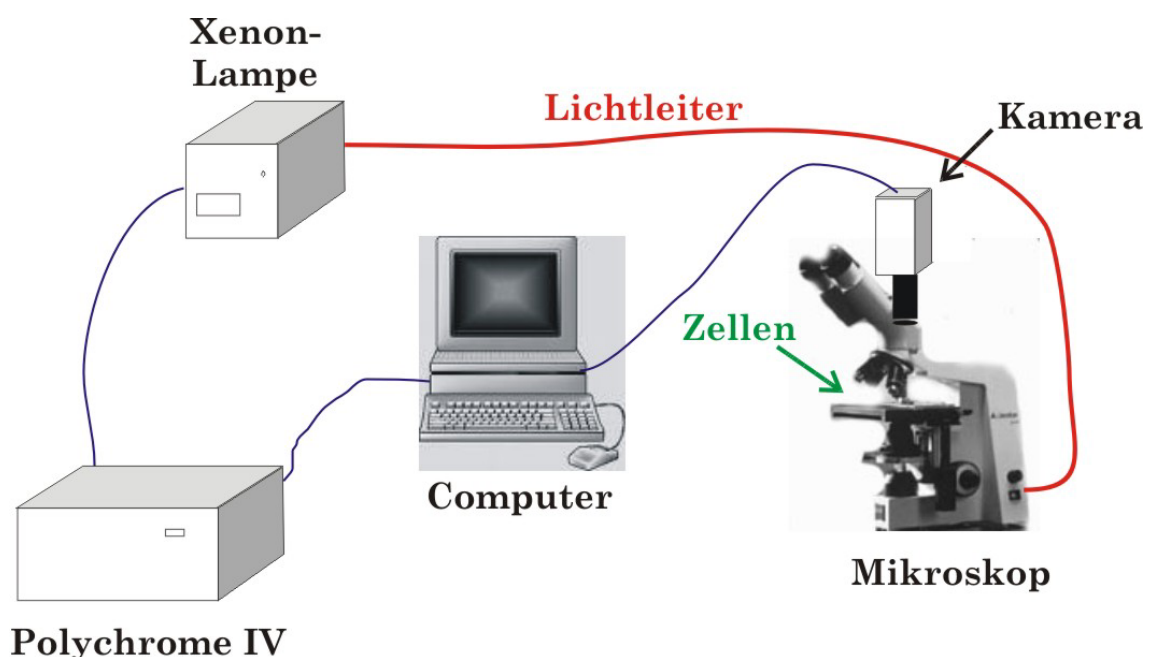


Abb. B.3 Aufbau der Messanlage

Die Steuerung sowie die Aufzeichnung der Messungen wurde mit Hilfe des Programms *Till Vision 4.0* (T.I.L.L. Photonics GMBH) durchgeführt:

Zunächst wurde eine digitale Aufnahme der ausgewählten Zellen erstellt, mit deren Hilfe es möglich war, um jede einzelne Zelle einen genau umrissenen Messbereich (Region of interest, ROI) festzulegen, innerhalb dessen anschließend die Kalziumkonzentration erfasst wurde. Während der Messung wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz mit Lichtblitzen von 20 ms Dauer beleuchtet. Hierbei konnte sowohl in einem Livefilm die Leuchtstärke der Zellen mitverfolgt sowie die Aufzeichnung der Messkurven für die Fluoreszenzintensitäten bei  $\lambda = 350$  nm und  $\lambda = 380$  nm und die Kurve der resultierenden Ratio  $F_{350}/F_{380}$  durchgeführt werden.

Während einer Messung wurden verschiedene Substanzen mit Hilfe einer 100  $\mu$ l-Eppendorf-Pipette direkt in die Messkammer appliziert, wobei die Pipettenspitze in der Nähe der beleuchteten Zellen in die Pufferlösung eintauchte, ohne die Kammer oder das Glasplättchen zu berühren. Bei diesen Substanzen handelte es sich um 8-Br-cGMP, Phenylephrin, Noradrenalin, Koffein und *m*-3M3FBS. Sie konnten mit Hilfe einer Pumpe (*Ismatec Vario Pumpsystem*) wieder ausgewaschen und durch reine Pufferlösung ersetzt werden.

Ferner war es mit dieser Pumpe möglich, zum Beispiel einen Puffer mit hoher Kaliumkonzentration direkt in die Badlösung einzuwaschen.

#### 4. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm *OriginPro 6.1*. Mit diesem Programm konnten die Integrale der Kalziumtransienten berechnet und die Quotienten aus den Integralen der beiden Transienten einer Kalziummessung ausgewertet werden. Hierzu wurden zunächst Mittelwerte, Standardabweichungen und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) ermittelt und anschließend der Student-t-Test für zwei Populationen durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  festgelegt.

## II. Proteinbiochemische Methoden

### 1. Proteingewinnung

<b>SDS-Lysepuffer:</b>		
Tris ( <i>Roth</i> )	50 mM	Abschätzung des benötigten Volumens:
SDS ( <i>Roth</i> )	2%	$(\text{Masse des Gewebes in g}) \times 4 = \text{Volumen in ml}$
<b>pH=7,5</b>		

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Expression u.a. von IRAG in frischem Gewebe der Beinarterien und der Aorta sowie in kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta der Maus zu bestimmen. Um den hierfür nötigen Westernblot durchführen zu können, musste zunächst eine Proteinbestimmung gemacht werden.

Aorten und Beinarterien von Wildtypen und IRAG-Knockoutmäusen wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren präpariert (vgl. Kapitel BI. 1 und 2.1) und anschließend sofort in Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wodurch ein Proteinabbau durch zelleigene Proteasen weitgehend vermieden wurde. Daraufhin wurden sie mit Hilfe eines gekühlten Mörsers zerkleinert, erneut schockgefroren und gewogen. Bevor sie mit einem Metallstößel im Eppendorfglas noch weiter zerkleinert wurden, wurden sie in SDS-Lysepuffer aufgenommen. Nachdem sie für zwei Minuten mit 13.000 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert worden waren, wurde der Überstand abgenommen und zu selbigem 1/7 des Volumens an Proteaseinhibitor (*Roche*, „complete protease inhibitor cocktail tablets“, 1 Tablette in 10 ml PBS gelöst) hinzugefügt.

### 2. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry [Lowry *et al.*, 1951] basiert auf der Molybdänblau-Reaktion, bei der sechswertiges Molybdat als Heteropolysäure (z.B. in Bindung an einen Phosphatrest:  $[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]^{3-}$ ) zu vierwertigem Molybdänblau ( $\text{MoO}_2 + \text{MoO}_3$ ) reduziert wird. Die aus dieser Blaufärbung resultierende Extinktionsänderung kann photometrisch erfasst werden. Ursprünglich wurden als Reduktionsmittel für die Molybdänblau-Reaktion Phenole verwendet (Folin-Reaktion), die dadurch quantifiziert werden konnten. Ebenso werden aber auch Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan und - in geringerem Maße - Histidin und Cystein oxidiert. Der entscheidende Schritt, durch den die Molybdänreaktion so empfindlich gemacht wird, dass sie für eine sensitive Proteinbestimmung verwendet werden kann, ist die Bildung von Biuret-Komplexen, die aus Kupferionen und Proteinen in alkalischer Lösung entstehen [Kleber, 1997].

Für diese Arbeit wurde das *Sigma Diagnostics – Protein Assay Kit P 5656* verwendet, dessen Anleitung insofern modifiziert wurde, dass jeweils nur ein Fünftel der angegebenen Mengen verwendet wurde. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden jeweils 200 µl der BSA-Stammlösungen mit den Konzentrationen 0 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml mit je 800 µl bidestilliertem Wasser gemischt. Ebenso wurden 2 bis 6 µl Zellysat mit bidestilliertem Wasser

zu jeweils 1 ml aufgefüllt. Aufgrund der Proportionalität der Extinktion zur Proteinkonzentration ließ sich an die erstellte Eichkurve eine Eichgerade anlegen, über deren Funktionsgleichung letztlich auf die Konzentrationen der Proteinproben geschlossen werden konnte.

### 3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<b>TBST (Tris-buffered saline Tween-20):</b>	
Tris (pH 8,0) ( <i>Roth</i> )	10 mM
NaCl ( <i>Roth</i> )	150 mM
Tween 20 ( <i>Roth</i> )	0,05% (w/v)
<b>11,5% Trenngel (für zwei Gele):</b>	
<i>Aqua bidest.</i>	6500 µl
30% Acrylamid/0,2% BIS-Acrylamid	6500 µl
1,8 M Tris/HCL (pH 8,8) ( <i>Roth</i> )	3600 µl
10% SDS ( <i>Roth</i> )	167 µl
TEMED ( <i>Roth</i> )	20 µl
10% APS ( <i>Serva</i> )	200 µl
<b>5% Sammelgel (für zwei Gele):</b>	
<i>Aqua bidest.</i>	3600 µl
30% Acrylamid/0,2% BIS-Acrylamid	830 µl
0,6 M Tris/HCL (pH 6,8) ( <i>Roth</i> )	500 µl
10% SDS ( <i>Roth</i> )	50 µl
10% APS ( <i>Serva</i> )	50 µl
TEMED ( <i>Roth</i> )	10 µl
<b>4x Laemmli-Puffer:</b>	
Tris/HCl (pH 6,7)	240 mM
DTT ( <i>Gerbu</i> )	200 mM
SDS ( <i>Roth</i> )	8% (w/v)
Glycerin ( <i>Roth</i> )	40% (w/v)
Bromphenolblau ( <i>Serva</i> )	0,004% (w/v)
<b>10x SDS-Laufpuffer:</b>	
Tris/HCl (pH 8,3) ( <i>Roth</i> )	250 mM
Glycin ( <i>Roth</i> )	1,92 M
SDS ( <i>Roth</i> )	1% (w/v)

Um die einzelnen Proteine im Gewebe mit einem Westernblot detektieren zu können, sollten die Proteine zunächst nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wurde die SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli, 1970] durchgeführt. Bei SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen der Proteine sehr effektiv überdeckt. So entstehen SDS-Protein-Komplexe mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit (1,4 g SDS pro 1 g Protein), welche bei der Elektrophorese allesamt zur Anode wandern. Die Beweglichkeit der SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld hängt deshalb weder von ihrer Aminosäurezusammensetzung noch dem isoelektrischen Punkt ab, sondern nur von ihren Molmassen. Für die Elektrophorese wurden ein weitporiges Sammelgel und ein engporiges Trenngel verwendet. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes laufen die Proteine durch das Sammelgel in einer Reihe ohne Lücke zwischen dem sehr mobilen Leitton Chlorid und dem trägeren Folgeion Glycin in Richtung Anode. Die Proteine gelangen dadurch in einem sogenannten Proteinstapel ans Ende des Sammelgels, aufgefächert nach ihrer Mobilität, ohne dabei zu aggregieren. Im Trenngel treffen die Proteine nun auf einen höheren Reibungswiderstand, so dass es zu einer schärferen Zonentrennung kommt und die Proteine sich allein nach ihrem Molekulargewicht auftrennen [Görg *et al.*, 1998].

Die Gele entstehen durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit dem Vernetzer BIS-Acrylamid. Die Polymerisationsreaktion wird durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) in Gang gesetzt und durch den Katalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) beschleunigt.

Zuerst wurden ca. 3,5 ml Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 11,5% in eine Gießvorrichtung (*Labtech*) eingefüllt, welche mit Isopropanol bedeckt wurden, um einen geraden Gelrand zu erzeugen. Innerhalb von ca. 20 Minuten polymerisierte das Gel, woraufhin das Isopropanol abgegossen bzw. mit Papier abgesaugt, das Sammelgel aufgegossen und ein Kamm, der die Kammer in 10 Taschen teilt, eingesetzt wurde. Nach weiteren 20 Minuten war auch das Sammelgel polymerisiert, so dass nun die Glasplatten mit den Gelen in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden konnten, welche daraufhin mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurden. Anschließend wurden in die 10 Taschen je 20 µl der Marker *Precision Plus Protein™ Standards All Blue (BioRad)*, 4xLaemmli oder Probenlysat eingespritzt. Die Proben wurden zuvor aufbereitet, indem 50 µg Proteinlysat in entsprechendem Volumen an 4x Laemmli aufgenommen wurde, um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten, anschließend für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann mit der Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert wurde. Das Erhitzen auf 95 °C bewirkt eine Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle. Disulfidbrücken werden durch DTT im Laemmli-Puffer reduziert.

Zuletzt wurde für eine Stunde eine Spannung von 150 V angelegt, wodurch die Proteine der Größe nach aufgetrennt wurden.

#### 4. Westernblot

<b>Anodenpuffer I:</b>	
Tris/HCl (pH 10,4) ( <i>Roth</i> )	300 mM
Methanol	20% (v/v)
<b>Anodenpuffer II:</b>	
Tris/HCl (pH 10,4) ( <i>Roth</i> )	30 mM
Methanol	20% (v/v)
<b>Kathodenpuffer:</b>	
Tris/HCl (pH 7,6) ( <i>Roth</i> )	25 mM
$\epsilon$ -Aminocapronsäure ( <i>Sigma</i> )	40 mM
Methanol	20% (v/v)

Die aufgetrennten Proteinproben wurden vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, *Immobilon-P*, *Millipore*) transferiert (blotting). Hierzu wurden die PVDF-Membran und Filterpapiere (GB001 Gel Blotting Papier; *Schleicher & Schüll*) auf die Größe des Gels zugeschnitten und nach dem Semidry-Verfahren in einer Transferapparatur (*Novablot*) zwischen Anoden- und Kathodenplatte folgendermaßen angeordnet:

3 Lagen Filterpapier (in Anodenpuffer I getränkt)

2 Lagen Filterpapier (Anodenpuffer II getränkt)

PVDF Membran (befeuchtet mit Methanol, dann Anodenpuffer II)

SDS-Gel

5 Lagen Filterpapier (in Kathodenpuffer getränkt)

Es wurde für 60-75 Minuten eine Spannung von 160 V angelegt, die Stromstärke lag konstant bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

#### Immundetektion:

Um eine unspezifische Antikörperbindung an freie Proteinbindungsstellen zu verhindern, wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 5% Magermilchpulver in 1x TBST geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern inkubiert. Wiederum wurde der Blot dreimal je 5 Minuten mit 1 %-igem Magermilchpulver/1xTBST gewaschen und schließlich mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem sekundärem Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Auf erneutes zweimaliges Waschen in TBST / 1% Magermilchpulver folgte ein Waschschrift in reinem TBST.

Zur Detektion der Meerrettich-Peroxidase wurden das ECL (enhanced chemiluminescence)- und das ECL-advanced-System (*Perkin-Elmer*) verwendet. Diese Methoden beruhen auf der Oxidation von Luminol durch die Peroxidase, bei der Chemilumineszenz entsteht, die mit einem

Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, *Amersham*) sichtbar gemacht werden kann. Um die Reaktion auszulösen, wurde die Membran für 1 min in je 1 ml der Reagenzien des Kits inkubiert. Die Belichtungszeit betrug 5 bis 30 Sekunden (ECL advanced) bzw. 5 bis 15 Minuten (ECL). Die Filme wurden von einer Entwicklermaschine (*Agfa, Curix 60*) entwickelt.

**Primäre Antikörper:**

<b><i>Antikörper</i></b>	<b><i>Herkunft</i></b>	<b><i>Verdünnung</i></b>	<b><i>Referenz</i></b>
IRAG <sub>bsd</sub> -Antikörper Nr. 91 gereinigtes Serum	Kaninchen polyklonal	1:300	(Geiselhöringer, 2002, S. 35)
cGKI $\alpha$ ; gereinigt	Kaninchen polyklonal	1:80	(Geiselhöringer et al., 2004, S. 19-22)
cGKI $\beta$ 105-4; gereinigt	Kaninchen polyklonal	1:1000	(Geiselhöringer et al., 2004, S. 19-22)
RGS2	Kaninchen polyklonal	1:200	<i>Santa Cruz</i>
IP <sub>3</sub> RI	Kaninchen polyklonal	1:1000	<i>ABR Affinity</i> <i>BioReagents<sup>TM</sup></i>
$\beta$ -Actin	Kaninchen polyklonal	1:40000	<i>Abcam</i>
MYPT 1	Schaf polyklonal	1:200	<i>Upstate</i>

**Sekundäre Antikörper:**

<b><i>Antikörper</i></b>	<b><i>Herkunft</i></b>	<b><i>Verdünnung</i></b>	<b><i>Referenz</i></b>
Anti-Kaninchen/ Meerrettichperoxidase	Ziege polyklonal	1:50000	<i>Dianova</i>
Anti-Schaf/ Meerrettichperoxidase	Affe polyklonal	1:2000	<i>Dianova</i>

### **III. Versuchstiere**

Alle verwendeten Mäuse stammten aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Sowohl die IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse wie auch die Wildtypen wurden vor dem genetischen Hintergrund Sv/129 gezüchtet. In der IRAG<sup>-/-</sup>-Mauslinie ist das Exon 3 des IRAG-Gens mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems deletiert worden, was zu einer Leserahmenverschiebung bei der Translation und damit zum Translationsstopp führt. Dadurch ist das IRAG-Gen in dieser Mauslinie komplett ausgeschaltet [Sigl, 2004]. Die verwendeten Mäuse hatten ein Alter von 8 bis 11 Wochen.

Die Tiere wurden in einem geeigneten Tierstall in Makrolon-Käfigen gehalten, wobei sich in einem Typ II-Käfig maximal 5 und in einem Typ III-Käfig maximal 12 adulte Mäuse oder zwei Weibchen mit ihrem Nachwuchs befanden. Die Mäuse wurden mit Pellets mit 10 mm Durchmesser und 12,5 MJ/kg gefüttert (*Altromin*: „Zuchtdiät Ratte/Maus“, Artikel-Nr. 1314) und erhielten regelmäßig frisches Trinkwasser. Die Käfige wurden mit autoklavierten Spänen (*Altromin*) ausgelegt. Zur Verpaarung wurden je zwei Weibchen im Alter von 5 bis 30 Wochen mit einem Männchen im Alter von 6 Wochen bis 18 Monaten für zwei Wochen in einen Typ-II- Käfig gesetzt.

Die Experimente wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.



## C Ergebnisse

Um den Einfluss von IRAG auf die Regulation der Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen zu untersuchen, wurden zunächst Kalziummessungen an kultivierten Muskelzellen der Aorta von Wildtyp (WT)- und IRAG-Knockoutmäusen (IRAG<sup>-/-</sup>) durchgeführt. Ferner wurde mittels eines Westernblots die Expression von IRAG und anderen Proteinen, welche die zytosolische Kalziumregulation regulieren, in Aorta und A. tibialis untersucht.

Darüber hinaus wurden für die Kalziummessungen frisch isolierte glatte Muskelzellen der murinen Beinarterien verwendet, um die Messungen unter physiologischeren Bedingungen durchführen zu können: Zum einen hatte sich gezeigt, dass die Expression von IRAG in VSMCs während der Kultivierung supprimiert wird (vgl. Kapitel D.III) und somit die Messung an frisch isolierten Zellen repräsentativer erscheint. Zum anderen liegt die Vermutung nahe, dass IRAG über eine Einflussnahme auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration von Gefäßmuskelzellen an der Regulation der Öffnungsweite von Gefäßlumina beteiligt ist. Trifft dies tatsächlich auf Widerstandsgefäße zu, so ist ein Einfluss von IRAG auf den arteriellen Blutdruck eines Organismus möglich. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit eine Methode etabliert, mit der es möglich ist, Kalziummessungen an frisch isolierten Gefäßmuskelzellen von murinen Beinarterien als Modell für Blutdruck-relevante Widerstandsgefäße durchzuführen.

### I. Kalziummessungen an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta

Die Isolierung und Kultivierung der VSMCs (*Vascular smooth muscle cells*), die Vorbereitung der Messkammern sowie der Aufbau der Messanlage wurden in Kapitel B.I ausführlich dargestellt.

Vor Beginn jedes Experimentes wurde eine digitale Aufnahme der Zellen erstellt, in welcher der Messbereich (ROI: *region of interest*) für jede einzelne Zelle festgelegt werden konnte. Ein Beispiel für eine derartige Aufnahme ist in Abbildung C.1 dargestellt.

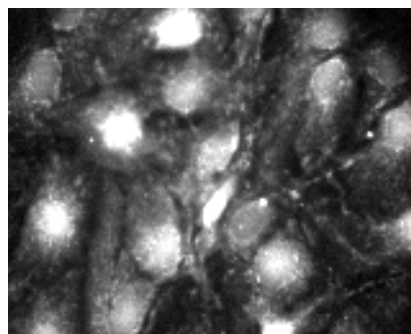
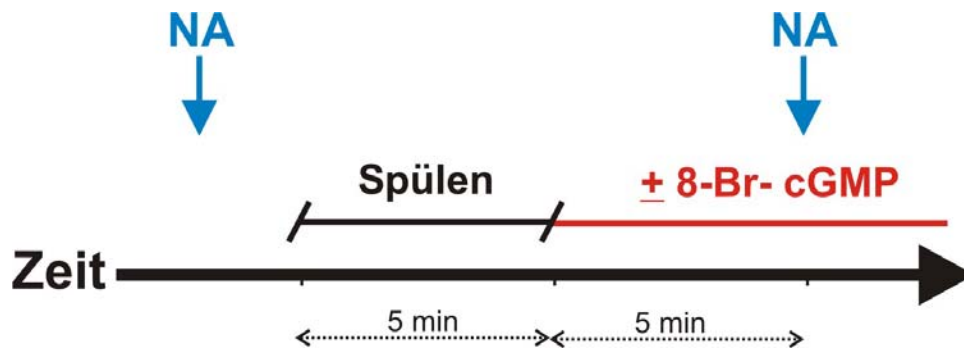


Abb. C.1 Beispiel einer digitalen Aufnahme kultivierter Aortenzellen der Maus vor Beginn einer Kalziummessung

Man erkennt deutlich die Zellen mit den durch die Aufnahme von Fura-2-AM stark fluoreszierenden Zellkernen sowie der über das Zytosol und über Ausläufern der Muskelzellen verteilten Fluoreszenz..

Abbildung C.2. zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf der Experimente.



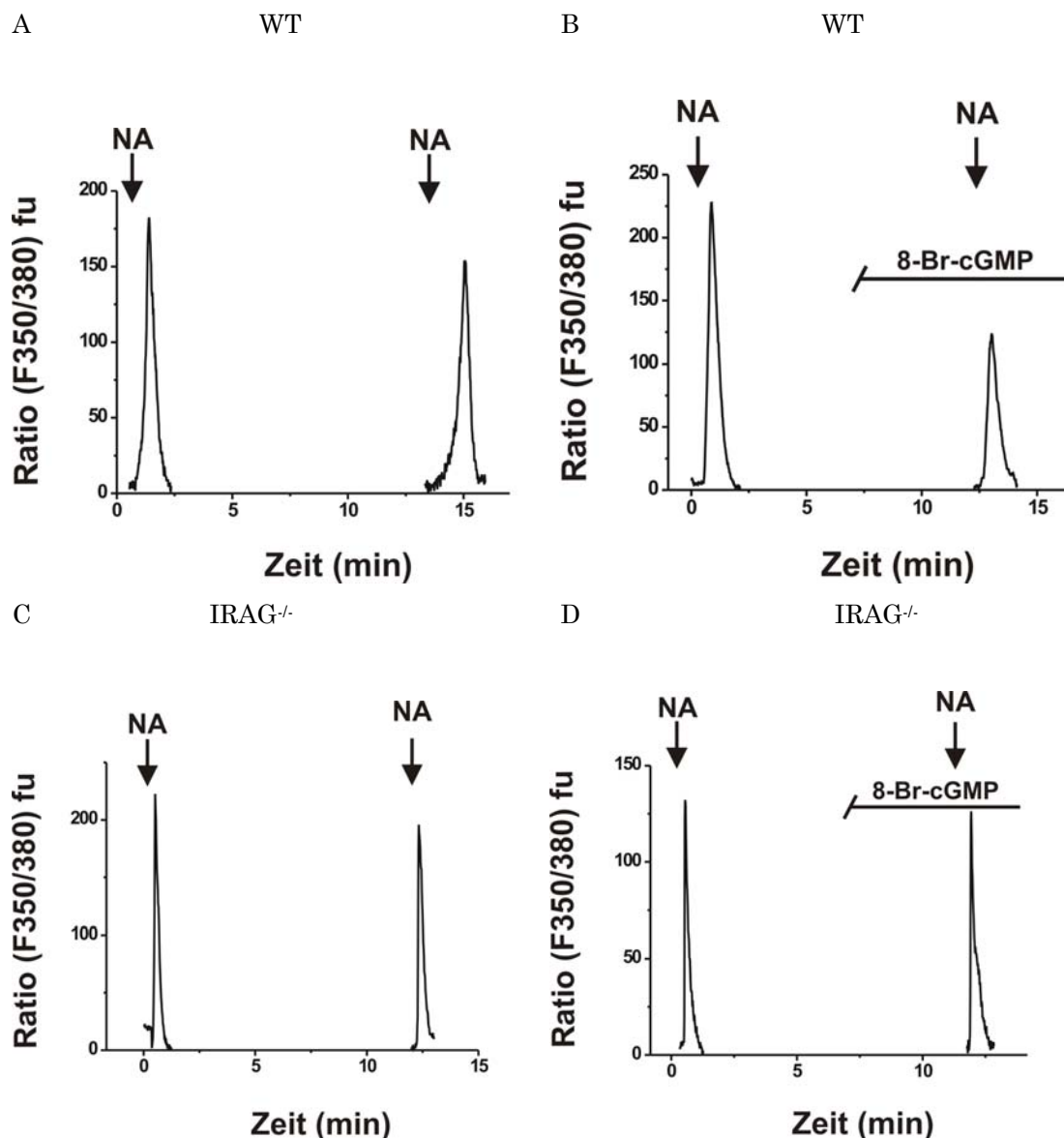
**Abb. C.2 Zeitlicher Ablauf der Experimente**

Erläuterungen im Text. NA: Noradrenalin; 8-Br-cGMP: 8-Bromo- zyklisches Guanosinmonophosphat

Jedes Experiment beinhaltete die zweimalige Stimulation der Zellen mit je 50  $\mu\text{l}$  einer 0,5  $\mu\text{M}$  Noradrenalinlösung, welche über eine festinstallierte Glaspipette zugeführt wurde (finale Konzentration 50 nM). Das Noradrenalin wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und auf eine 100  $\mu\text{M}$ -Lösung verdünnt, wobei die weitere Verdünnung auf 0,5  $\mu\text{M}$  mit glucosefreier Tyrode erfolgte. Im Normalfall reagierten die Zellen auf diese Stimulation prompt mit einem transienten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (Kalziumtransient). Nach der ersten Noradrenalingabe wurde die Pufferlösung in einer fünfminütigen Messpause mit Hilfe einer Pumpe vollständig ausgewechselt. Es folgten weitere fünf Minuten einer Ruhephase bei den Kontrollexperimenten bzw. einer Inkubationszeit mit 8-Br-cGMP. Von letzterem wurden 20  $\mu\text{l}$  einer 50 mM Lösung in die Pufferlösung pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 2 mM erreicht wurde. Bei 8-Br-cGMP handelt es sich um ein membranpermeables cGMP-Analogon, das in die Zelle eindringt und dort u.a. die cGMP-abhängigen Proteinkinasen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  aktiviert und die Kalziumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum hemmt. In den zehn Minuten zwischen dem Erreichen des Basalniveaus der Kalziumkonzentration nach dem ersten Transienten und der zweiten Zugabe von Noradrenalin, wurden die Zellen nicht belichtet, um ein unnötiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 zu verhindern.

Die Experimente wurden ausgewertet, indem die Flächen unter den Kalziumtransienten (AUC: *Area under the curve*) berechnet und zueinander in Relation gesetzt wurden.

Die folgende Abbildung zeigt vier Beispielperimente an Zellen von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen mit und ohne Inkubation mit 8-Br-cGMP.



**Abb. C.3 Beispiele für Kalziumtransienten kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen der murinen Aorta**

- A: Kontrollexperiment an einer VSMC einer WT-Maus (zweimalige Stimulation mit NA)  
 B: Eine VSMC einer WT-Maus, die vor der zweiten Stimulation mit NA fünf Minuten mit 8-Br-cGMP inkubiert wurde.  
 C: Kontrollexperiment an einer VSMC einer IRAG<sup>-/-</sup>-Maus (zweimalige Stimulation mit NA)  
 D: Eine VSMC einer IRAG<sup>-/-</sup>-Maus, die vor der zweiten Stimulation mit NA fünf Minuten mit 8-Br-cGMP inkubiert wurde.  
 NA: Noradrenalin; 8-Br-cGMP: 8-Bromo- zyklisches Guanosinmonophosphat; min: Minute  
 VSMC: glatte Gefäßmuskelzellen, WT: Wildtyp; IRAG<sup>-/-</sup>: IRAG-Knockout; fu: fluorescence unit

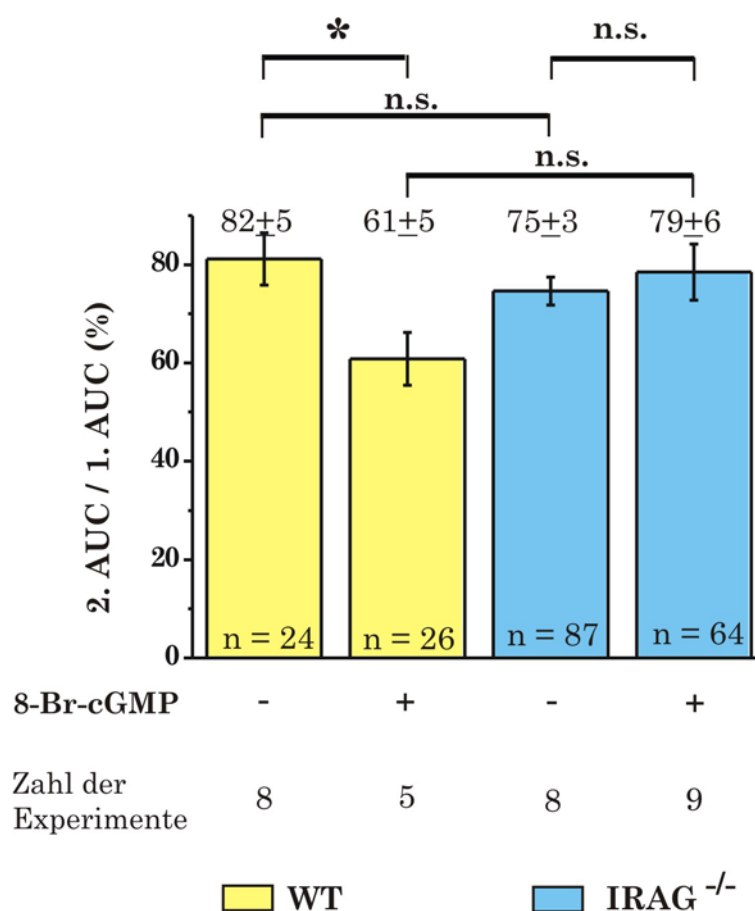
Bei den Messungen an glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) von WT-Mäusen konnte eine signifikante Reduktion der Noradrenalin-induzierten intrazellulären Kalziumtransienten durch Inkubation mit 8-Br-cGMP gezeigt werden. Ohne Behandlung mit 8-Br-cGMP nahm die Fläche unter dem zweiten Transienten  $82 \pm 5\%$  der Fläche unter dem ersten Transienten ein. Bei Zusatz von 8-Br-cGMP verringerte sich die Fläche unter dem zweiten Transienten dagegen auf  $61 \pm 5\%$  der Fläche unter dem ersten Transienten ( $p = 0,02$ ). Bei Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Das Integral des zweiten Transienten betrug  $75 \pm 3\%$  des

ersten Transienten bei den Kontrollexperimenten und  $79 \pm 6$  % bei den Experimenten mit 8-Br-cGMP, wobei sich diese Relationen voneinander nicht signifikant unterschieden ( $p = 0,52$ ).

Aus den Ergebnissen der Experimente an VSMCs von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen *ohne* Zugabe von 8-Br-cGMP ergibt sich außerdem der Trend, dass bei VSMCs der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse der zweite Noradrenalin-getriggerte Kalziumtransient im Vergleich zum ersten deutlicher verringert ist als bei VSMCs der WT-Mäuse. Dieser Trend ist mit  $p = 0,29$  allerdings nicht signifikant.

Ebenso wenig signifikant ist der Vergleich der Relationen der Flächen von zweitem zu erstem Transienten zwischen WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs in den Experimenten *mit* Applikation von 8-Br-cGMP ( $p = 0,07$ ).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in folgender Abbildung graphisch dargestellt.



**Abb. C.4** Statistische Auswertung der Kalziummessungen an VSMCs der murinen Aorta.

Die Balken zeigen die Mittelwerte der Quotienten aus dem Integral des 2. Kalziumtransienten zum Integral des 1. Transienten der einzelnen Experimente. Es werden vier Experimenten-Gruppen miteinander verglichen: WT-VSMCs ohne Applikation von 8-Br-cGMP, WT-VSMCs mit Applikation von 8-Br-cGMP vor der Auslösung des 2. Transienten sowie IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs mit oder ohne Applikation von 8-Br-cGMP vor der Auslösung des 2. Transienten.

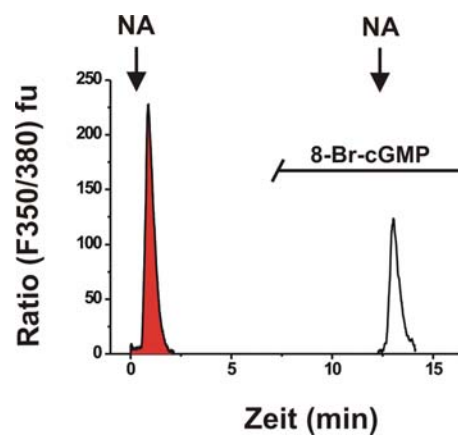
AUC: Area under the curve; n: Zahl der Zellen; WT: Wildtyp; IRAG<sup>-/-</sup>: IRAG-Knockout; VSMC: Vascular smooth muscle cell; \*: signifikant mit  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant

Die Ergebnisse dieser Messreihe zeigen, dass IRAG für die cGMP-vermittelte Reduktion der Noradrenalin-induzierten intrazellulären Kalziumtransienten benötigt wird und somit eine

entscheidende Rolle in der Regulation der Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta spielt.

Ferner wurde untersucht, ob die intrazelluläre Kalziumerhöhung nach Stimulation durch Noradrenalin in IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen *per se* auch unabhängig von einer Aktivierung des NO-/cGMP-Signalweges verändert ist. Hierzu wurden die basalen Kalziumkonzentrationen in den VSMCs, die Integrale sowie die Verläufe der jeweils ersten Transienten der soeben vorgestellten Experimente verglichen.

In Abbildung C.5 wird die Berechnung der Fläche unter dem jeweils ersten Transienten exemplarisch dargestellt.

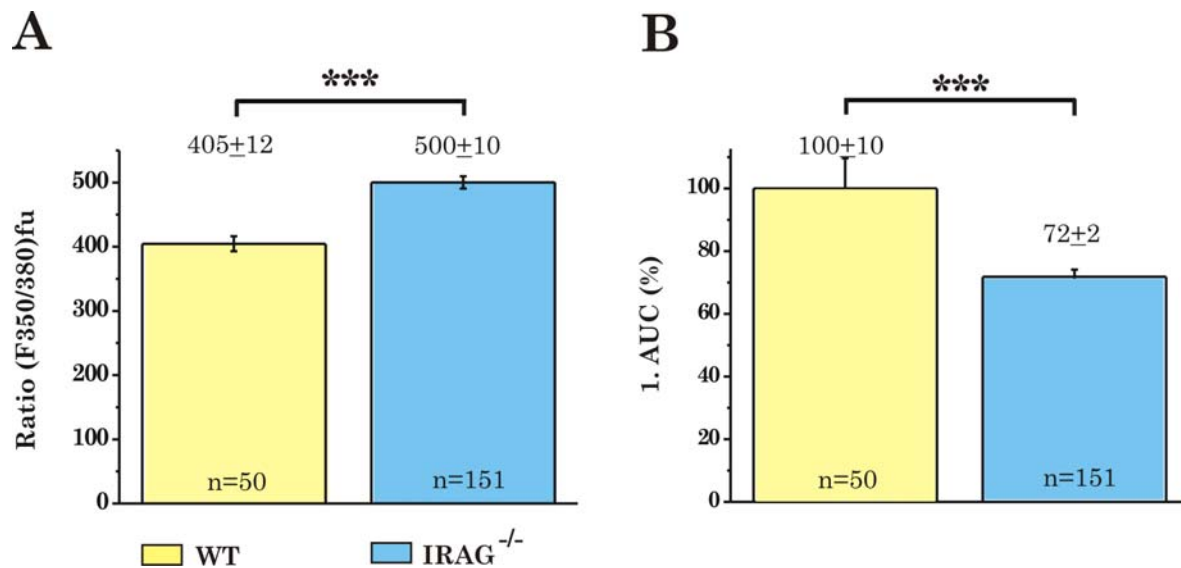


**Abb. C.5 Beispiel für die Integration des *ersten* Kalziumtransienten eines Experimentes**

Um die Noradrenalin (NA)- induzierte intrazelluläre Kalziumerhöhung in VSMCs der murinen Aorta von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse zu vergleichen, wurden die Integrale des jeweils *ersten* Transienten eines Experimentes berechnet, unabhängig davon, ob im weiteren Verlauf des Experimentes 8-Br-cGMP appliziert worden war (wie im hier gezeigten Beispiel) oder nicht. In der Abbildung wurde das verwendete Integral zur Veranschaulichung rot markiert. Die Fläche unter dem zweiten Transienten wurde nicht in die Berechnung miteinbezogen.

NA: Noradrenalin; 8-Br-cGMP: 8-Bromo- zyklisches Guanosinmonophosphat;  
VSMC: glatte Gefäßmuskelzellen, fu: fluorescence unit

Die Auswertung ergab, dass einerseits die basale Kalziumkonzentration der VSMCs der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse mit  $500 \pm 10$  fu (*fluorescence unit*) die der WT-Mäuse mit  $405 \pm 12$  fu deutlich übersteigt (+24 %), dass aber andererseits die Kalziumausschüttung in den Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse nur etwa 72% der Ausschüttung in Zellen von WT-Mäusen beträgt. Beide Effekte sind mit  $p = 3,01 \times 10^{-7}$  bzw.  $p = 5,66 \times 10^{-5}$  hochsignifikant. Veranschaulicht werden diese Ergebnisse in der Abbildung C.6.



**Abb. C.6 Vergleich der basalen Kalziumkonzentration sowie der Noradrenalin-induzierten Kalziumausschüttung in VSMCs der Aorta von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**A: Vergleich der basalen Kalziumkonzentration**

Der Unterschied zwischen den Messwertreihen ist hoch signifikant (\*\*\*) :  $p < 0,001$ .

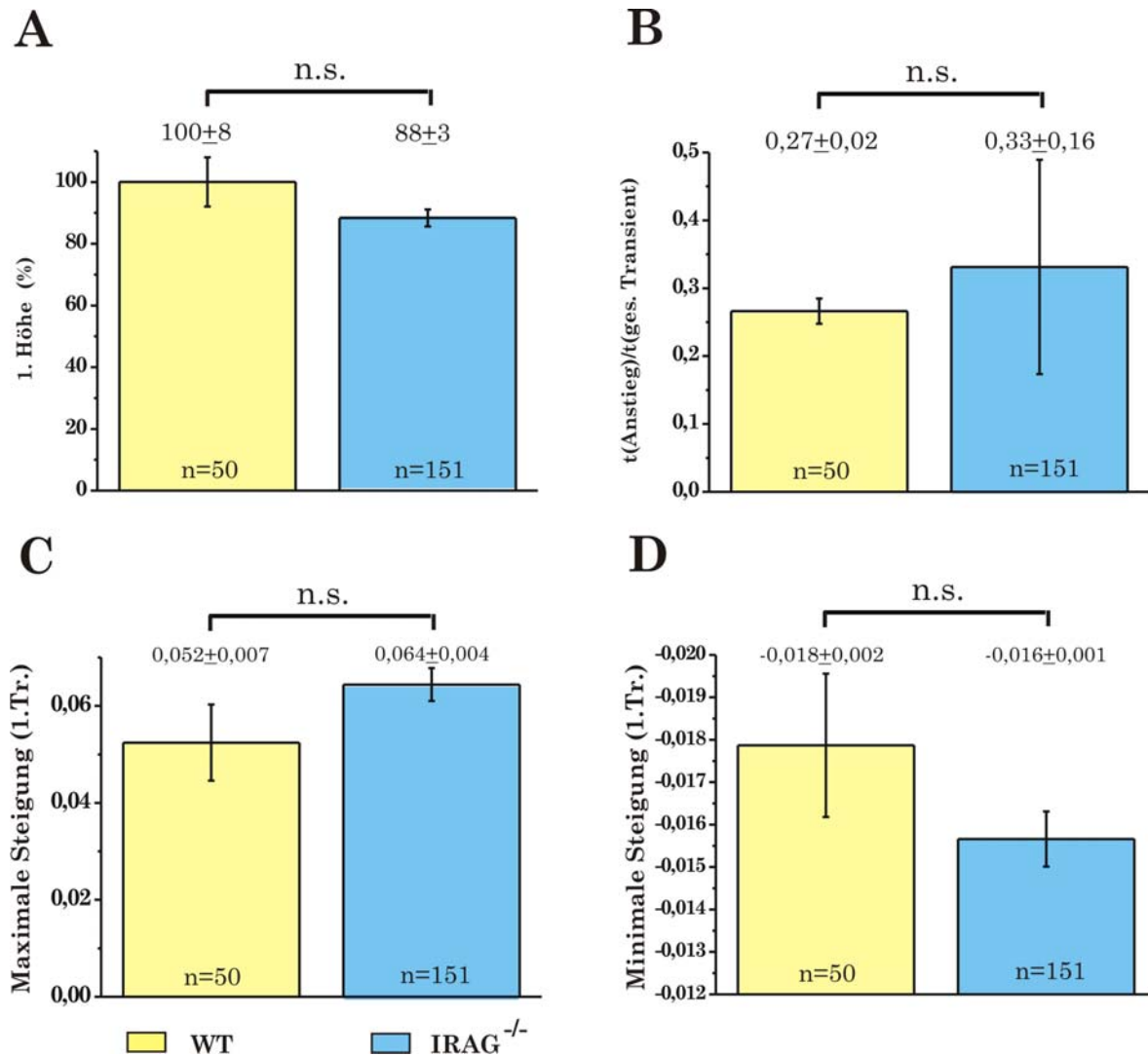
**B: Vergleich der Noradrenalin-induzierten Kalziumausschüttung**

Der Mittelwert der Flächen unter den jeweils ersten Transienten der durchgeführten Experimente an WT-VSMCs wurde als 100% festgesetzt. Der Mittelwert der Flächen unter den ersten Transienten der Experimente an den IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs wurde als Prozentsatz dessen ausgedrückt. Der Unterschied zwischen den Messwertreihen ist hoch signifikant (\*\*\*) :  $p < 0,001$ .

fu: fluorescent unit; AUC: Area under the curve; n: Zahl der Zellen; WT: Wildtyp; IRAG<sup>-/-</sup> : IRAG-Knockout; VSMC: Vascular smooth muscle cell

Um mögliche Unterschiede in den Verläufen der Transienten zu quantifizieren und damit zu objektivieren, wurden ebenfalls die ersten Noradrenalin-induzierten Transienten der vorgestellten Experimente genauer untersucht. Weder ein Vergleich der Transientenamplituden noch der maximalen und minimalen Steigung noch der Zeitverläufe zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Aortenzellen der WT- und der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse, wie Abbildung C.7 verdeutlicht.

Die Amplitude der Kalziumtransienten von IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs beträgt nur 88 % der Amplitude von Transienten der WT-VSMCs, wobei dieser Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,08$  nicht signifikant ist. Um auch eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Kalziumtransienten machen zu können, wurde die Zeit des Anstiegs des Transienten in Beziehung zur Gesamtzeit des Transienten gesetzt. Ein Vergleich dieser Relationen zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen der WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Tiere ( $p = 0,81$ ). Auch die maximale Steigung im Anstieg bzw. im Abfall (= minimale Steigung des Gesamttransienten) der Transienten unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht ( $p = 0,11$  bzw.  $0,14$ ).



**Abb. C.7: Vergleich der Verläufe der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten in VSMCs der Aorta von WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**A: Vergleich der Amplitude der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten**

Der Mittelwert der Höhen des jeweils ersten Transienten der durchgeführten Experimente an WT-VSMCs wurde als 100% festgesetzt. Der Mittelwert der Höhen der ersten Transienten der Experimente an den IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs wurde als Prozentsatz dessen ausgedrückt. Der Unterschied zwischen den Messwertreihen ist nicht signifikant (n.s.:  $p > 0,05$ ).

**B: Vergleich des Verhältnisses der Anstiegszeit zur Gesamtzeit der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten**

Jeder Kalziumtransient lässt sich in eine Phase des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration bis zum Erreichen eines Maximalwertes und einer anschließenden Phase des Abfalls der Konzentration bis zum Wiedererlangen der Ausgangskonzentration unterteilen. Um die Verläufe der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten in den VSMCs zu vergleichen, wurden die Quotienten aus der Zeit der Anstiegsphase und der Gesamtzeit der Transienten gebildet. Der Vergleich dieser Quotienten von Transienten von WT- mit KO-VSMCs zeigt keinen signifikanten Unterschied (n.s.:  $p > 0,05$ ).

**C: Vergleich der maximalen Steigung der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten**

Die maximalen Steigungen der jeweils ersten Transienten der durchgeführten Experimente an WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs unterscheiden sich nicht signifikant (n.s.:  $p > 0,05$ ).

**D: Vergleich der minimalen Steigung der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten**

Die minimalen Steigungen der jeweils ersten Transienten der durchgeführten Experimente an WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs unterscheiden sich nicht signifikant (n.s.:  $p > 0,05$ ).

n: Zahl der Zellen; WT: Wildtyp; IRAG<sup>-/-</sup>: IRAG-Knockout; VSMC: Vascular smooth muscle cell; n.s.: nicht signifikant; t: Zeit; ges.: gesamt; Tr.: Transient

Die Messergebnisse an kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta aus WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen lassen sich somit folgendermaßen zusammenfassen:

Zum einen lassen sich Noradrenalin-induzierte Kalziumtransienten in den IRAG<sup>-/-</sup>-Zellen nicht wie in WT-Zellen supprimieren, was für eine bedeutende Rolle von IRAG in der cGMP-abhängigen Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration spricht.

Zum anderen ist in den IRAG<sup>-/-</sup>-Zellen die basale Kalziumkonzentration im Vergleich zu WT-Zellen leicht erhöht, während die Noradrenalin-induzierte Kalziumausschüttung vermindert ist und sich der Verlauf der Kalziumtransienten nicht signifikant unterscheidet.

## II. Westernblot

Mit Hilfe eines Westernblots sollte die Expression von IRAG in arteriellem Gewebe von IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen untersucht werden.

Zum besseren Verständnis des Einflusses von IRAG auf Regulationsmechanismen der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen, ist es notwendig, auch die Expressionsmenge anderer Proteine, die in diesem Zusammenhang unter Umständen eine wichtige Rolle spielen, zu betrachten.

Hier ist zunächst der Inositoltriphosphat-Rezeptor I (**IP<sub>3</sub>RI**) von Bedeutung. Mit diesem und der cGMP-abhängigen Proteinkinase **cGKIβ** liegt IRAG in einem Komplex am sarkoendoplasmatischen Retikulum vor und ist dadurch an der zytoplasmatischen Kalziumregulation beteiligt [Geiselhöringer *et al.*, 2004b]. IRAG ist ein Substrat der cGKIβ, und die Expressionsmenge beider Proteine korreliert eng miteinander [Ammendola *et al.*, 2001].

Auch die Expression der **cGKIα** ist in diesem Zusammenhang zu analysieren, ebenso die seines Substrates *Regulator of G-Protein signalling 2* (**RGS2**), das nach neueren Erkenntnissen entscheidend zur Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen beiträgt [Osei-Owusu *et al.*, 2007]. Darüber hinaus ist auch die regulatorische Untereinheit der Myosin-Phosphatase **MYPTI** für die Kontraktionsmechanismen in glatten Muskelzellen von großer Relevanz.

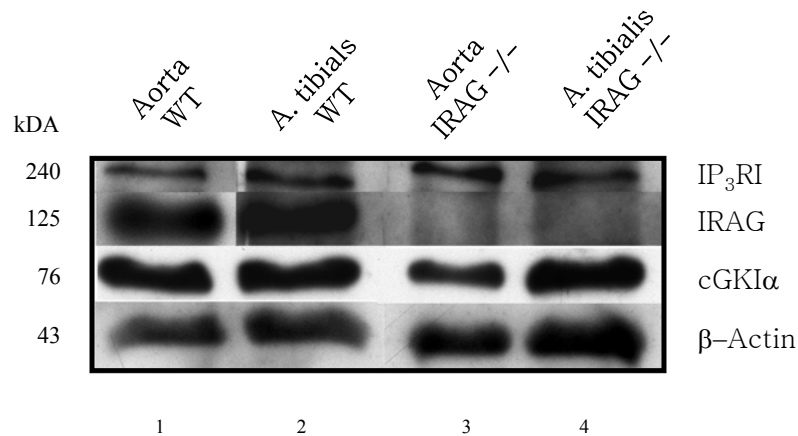
Daher wurden auch diese Proteine mit spezifischen Antikörpern im untersuchten Mausegewebe detektiert.

Die Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen steuert Kontraktion und Relaxation der Zellen und somit den Gefäßtonus. Der Gefäßtonus von Widerstandsgefäßen wiederum beeinflusst den Blutdruck eines gesamten Organismus. Will man mögliche Einflüsse von IRAG und anderen cGMP-Signalproteinen, die für die Kalziumregulation relevant sind, auf den arteriellen Blutdruck untersuchen, sollten nicht nur Muskelzellen der Aorta, sondern auch kleinerer Gefäße analysiert werden. Die Aorta nämlich hat die Struktur eines sogenannten Windkesselgefäßes mit der Eigenschaft, Druckspitzen des Blutstromes, der aus dem linken Ventrikel ausgestoßen wird, abzumildern, bevor das Blut über kleinere Arterien im Körper verteilt wird. Ein Widerstandsgefäß hingegen erhöht durch Vasokonstriktion den Blutdruck im vorangegangenen Strömungsgebiet und erniedrigt ihn durch Vasorelaxation.



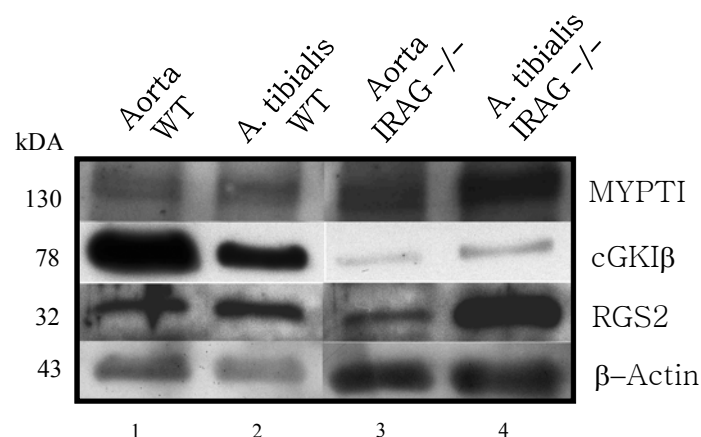
Da Widerstandsgefäße im Körper einer Maus zwar zahlreich, jedoch außerordentlich klein sind, wurde für diese Arbeit die gut zugängliche Schienbeinarterie (A. tibialis) als Modell für ein Widerstandsgefäß gewählt, da sie eine deutlich feinere Struktur als die Aorta aufweist und dennoch ergiebig genug für eine Zellisolation ist.

Auf Grund dieser Überlegungen wurden Westernblots an Gewebe der Aorta und der A. tibialis von Wildtyp- sowie IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt und die Expression der erwähnten Proteine untersucht.



**Abb. C.8 Proteinexpression des IP<sub>3</sub>RI, IRAG und der cGKIα in der Aorta und der A. tibialis der Maus.**

Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Aorten- und A. tibialis-Gewebe, der mit spezifischen Antikörpern gegen IP<sub>3</sub>RI bzw. IRAG bzw. cGKIα immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde. In den Spuren 1 und 2 handelt es sich um das Aorten- und A. tibialis-Gewebe der WT-Maus, in den Spuren 3 (Aorta) und 4 (A. tibialis) ist das Gewebe der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus aufgetragen. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Links ist die Größe des Molekulargewichts angegeben. Als Ladungskontrolle diente β-Actin.



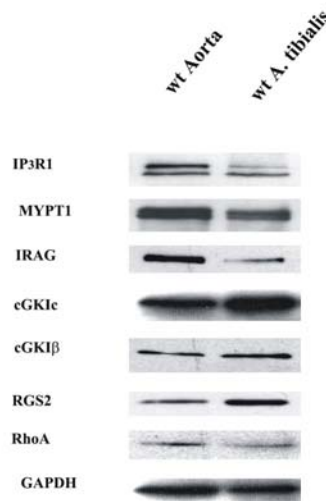
**Abb. C.9 Proteinexpression von MYPT-I, der cGKIβ und RGS 2 in der Aorta und der A.tibialis der Maus.**

Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Aorten- und A. tibialis-Gewebe, der mit spezifischen Antikörpern gegen MYPTI bzw. cGKIβ bzw. RGS2 immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde. In den Spuren 1 und 2 handelt es sich um das Aorten- und A. tibialis-Gewebe des WT, in den Spuren 3 (Aorta) und 4 (A. tibialis) ist das Gewebe der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus aufgetragen. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Links ist die Größe des Molekulargewichts angegeben. Als Ladungskontrolle diente β-Actin.

Die Abbildungen C.8 und C.9 zeigen die Ergebnisse der Immunoblots, bei denen  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle fungierte.

Erwartungsgemäß findet sich im Gewebe der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse kein IRAG-Protein, wohingegen der IP<sub>3</sub>RI und MYPT1 in allen Proben nachgewiesen werden können. Während die cGKI $\beta$  im Gewebe der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich geringer exprimiert ist als im Wildtypgewebe, kann die cGKI $\alpha$  unabhängig vom Genotyp in Aorta und A. tibialis mit einer starken Bande detektiert werden. Auch RGS2 ist sowohl im Gewebe von Wildtyp und IRAG-Knockout zu finden, wobei auffällt, dass es in der A. tibialis offensichtlich stärker exprimiert wird, als in der Aorta.

Ergänzend sollen an dieser Stelle zwei früher entstandene Westernblots von Frau Dr. Katja Sigl gezeigt werden. Der erste zeigt ebenfalls einen Vergleich der Proteinmengen der genannten Proteine sowie von RhoA in Gewebeextrakten der Aorta und der A. tibialis von WT-Mäusen (vgl. Abb. C10).



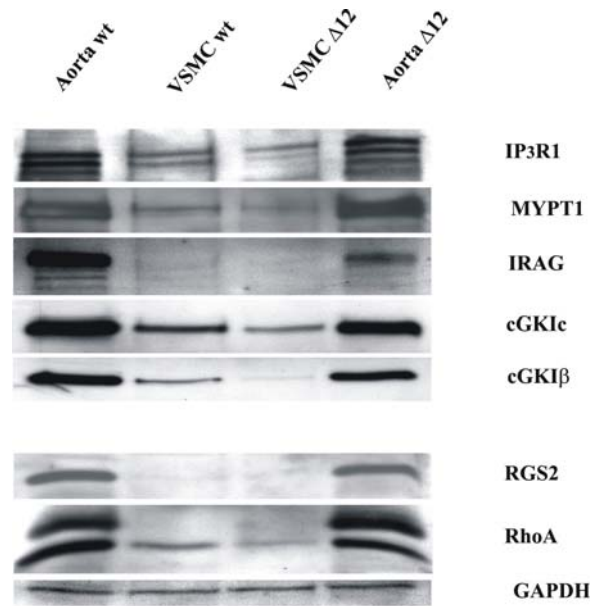
**Abb. C.10: Proteinexpression von IP<sub>3</sub>RI, MYPT1, IRAG, cGKIc, cGKI $\beta$ , RGS2 und RhoA in der Aorta und der A.tibialis der WT-Maus.**

Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Aorten- und A. tibialis-Gewebe, der mit spezifischen Antikörpern gegen IP<sub>3</sub>RI, MYPT1, IRAG, cGKIc (= cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ ), cGKI $\beta$ , RGS2 bzw. RhoA immunodekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde. In der ersten Spur wurde Aortengewebe und in der zweiten Spur Gewebe der A. tibialis aufgetragen. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Katja Sigl.

Auch dieser Blot zeigt, dass die untersuchten Proteine im Gewebe der Aorta und der A. tibialis detektierbar sind. IP<sub>3</sub>RI, IRAG und RhoA scheinen in der A. tibialis geringer nachweisbar zu sein, während RGS2 in der A. tibialis stärker exprimiert zu sein scheint als in der Aorta.

Der zweite Westernblot von Frau Dr. K. Sigl, der hier gezeigt werden soll, vergleicht die Proteinmengen in frisch isoliertem Aortengewebe und kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta (VSMCs).



**Abb. C.11: Proteinexpression von IP<sub>3</sub>RI, MYPT1, IRAG, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$ , RGS2 und RhoA in der Aorta von WT- und IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Maus.**

Gezeigt ist ein Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Aortengewebe, der mit spezifischen Antikörpern gegen IP<sub>3</sub>RI, MYPT1, IRAG, cGKI $\alpha$  (= cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ ), cGKI $\beta$ , RGS2 bzw. RhoA immundekoriert und mittels des ECL-Systems detektiert wurde. In der 1. Spur wurden Aortengewebe und in der 2. Spur kultivierte VSMCs der Aorta der WT-Maus aufgetragen. In der 3. und 4. Spur handelt es sich um Aortengewebe bzw. kultivierte Aorten-VSMCs der IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Maus. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Katja Sigl.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Proteinexpression aller untersuchten Proteine in den kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta deutlich vermindert ist im Vergleich zum frisch isolierten Gewebe der Aorta. Dies trifft sowohl auf Zellen der WT- als auch der Deletionsmutante IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Maus zu. Außerdem ist erkennbar, dass IRAG im Aortengewebe der IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Maus geringer nachweisbar ist als im Aortengewebe der WT-Maus.

### III. Etablierung eines Verfahrens zur Kalziummessung an

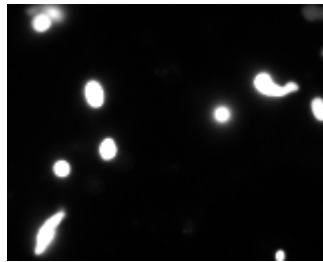
#### frisch isolierten Gefäßmuskelzellen muriner Beinarterien

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aus zwei Gründen ein Verfahren etabliert werden, mit dem es möglich wäre, Kalziummessungen mittels Fura-2 nicht nur an kultivierten VSMCs der Aorta, sondern auch an frisch isolierten Gefäßmuskelzellen muriner Beinarterien durchzuführen. Zum einen können Beinarterien auf Grund ihrer Größe als Modell für Widerstandsgefäße verwendet werden. Zum anderen zeigten Westernblotuntersuchungen, dass durch die Kultivierung von Gefäßmuskelzellen der Aorta die Expression von IRAG im Vergleich zu Aortengewebe deutlich verringert wird (vgl. Abb. C.11) und somit Messungen an frisch isolierten Zellen möglicherweise physiologisch besser geeignet sind. Ziel war es deshalb, Gefäßmuskelzellen der Beinarterien frisch zu isolieren und an ihnen anschließend Kalziummessungen in Analogie zu den Messungen an kultivierten Aortenzellen durchzuführen, d.h. zunächst eine Reduktion von Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten durch 8-Br-cGMP in Wildtypzellen nachzuweisen.

## 1. Ergebnisse der Kalziummessungen an Zellen, die mit der Kollagenase F (*Sigma*) isoliert wurden

Die Isolierung der Zellen wurde nach einem ähnlichen Protokoll durchgeführt wie die Isolierung der Aortenzellen vor ihrer Kultivierung (vgl. Kapitel B I.2).

Zu Beginn jedes Experimentes wurde - wie auch für die Messungen an kultivierten Aortenzellen - eine Voraufnahme zur Festlegung der *regions of interest* erstellt. Abbildung C.9 zeigt eine exemplarische Aufnahme.



**Abb. C.12** Beispiel einer digitalen Aufnahme frisch isolierter Beinarterienzellen der Maus vor Beginn einer Kalziummessung

Im Gegensatz zu kultivierten Zellen haben frisch isolierte Zellen keine Ausläufer. Bezüglich der Morphologie ließen sich zwei Gruppen frisch isolierter Zellen unterscheiden: zum einen kugelige Zellen und zum anderen eher segmentierte, längliche Zellen (vgl. Abb. C.12). Dies kann seine Ursache einerseits im unterschiedlichen Kontraktionsstatus der Zellen haben, andererseits aber auch ein Abbildungsartefakt sein, insofern als eine unterschiedliche Lagerung der Zellen im dreidimensionalen Raum durch die zweidimensionale Aufsicht nicht erfasst wird.

### 1.1 Stimulation mit Phenylephrin und Noradrenalin

In Analogie zu den Experimenten mit kultivierten Aortenzellen sollten auch die Beinarterienzellen mit Pharmaka stimuliert werden, die letztlich über eine Aktivierung des Inositoltriphosphatrezeptors eine Kalziumausschüttung aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum ins Zytosol bewirken. Hierzu wurden Noradrenalin und der  $\alpha$ -Adrenozeptoragonist Phenylephrin verwendet. Die Bindung dieser Substanzen an  $\alpha$ -Rezeptoren von glatten Muskelzellen führt zur Aktivierung von  $G_q$ -Proteinen, anschließend zur Stimulation der Phosphatidylinositspezifischen Phospholipase C (PI-PLC) und durch diese zur Hydrolyse von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ), welches schließlich den  $IP_3$ -Rezeptor, den  $IP_3$ -abhängigen Kalziumkanal des sarkoendoplasmatischen Retikulums, aktiviert [Starke, 2005].

In zahlreichen Versuchen wurden frisch isolierte glatte Muskelzellen von murinen Beinarterien mit Konzentrationen von 1 nM bis 200  $\mu$ M Phenylephrin oder Noradrenalin superfundiert, ohne dass Änderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration gemessen werden konnten.

### 1.2 Stimulation mit Koffein

Die Zugabe von Koffein zu den Zellen hingegen führte zu einer reproduzierbaren vorübergehenden Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration (vgl. Abb. C.14). Koffein ist in erster Linie als Adenosinrezeptorantagonist bekannt, bewirkt aber in hohen (i.e. unphysiologischen) Konzentrationen über seine Wirkung auf den Ryanodinrezeptors eine Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum.

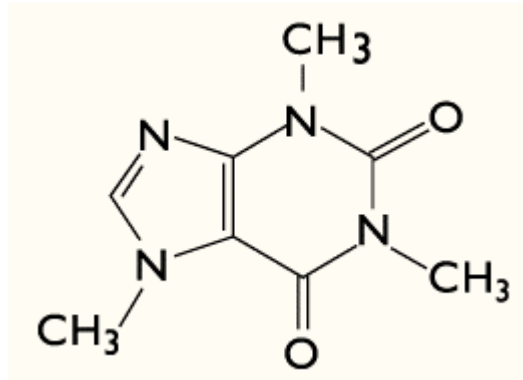


Abb. C.13 Strukturformel von Koffein  
(aus: <http://koffein.know-library.net>)

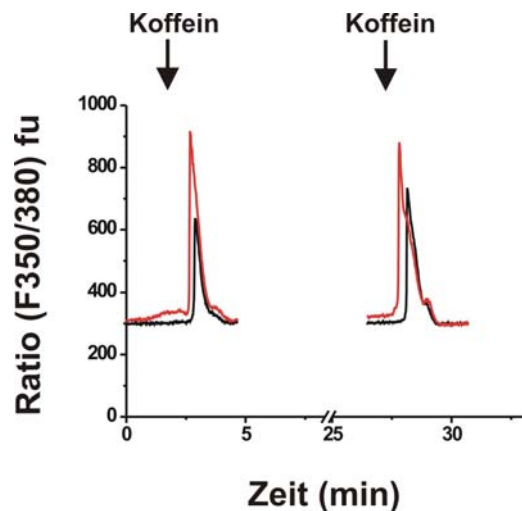


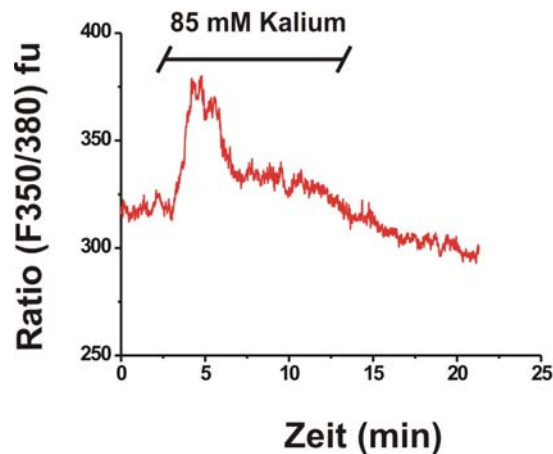
Abb. C.14 Zweifache Stimulation zweier frisch isolierter Muskelzellen muriner Beinarterien mit Koffein (Endkonzentration 10 mM).

Die Kalziumtransienten der einen Zelle sind in Rot, die der anderen Zelle in Schwarz dargestellt. fu: fluorescence unit

### 1.3 Kaliumdepolarisation

Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration durch Einwaschen eines entsprechenden Puffers führt zur Verschiebung des Membranpotentials der einzelnen Zellen in Richtung 0 mV, also zu einer Depolarisation. Dadurch werden spannungsabhängige Kalziumkanäle, die in der Zellmembran lokalisiert sind, geöffnet, so dass durch einen Kalziumeinstrom die zytosolische Kalziumkonzentration ansteigt.

Auch dieser Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration ließ sich an den frisch isolierten glatten Muskelzellen muriner Beinarterien nachweisen, wie Abbildung C.15 zeigt.

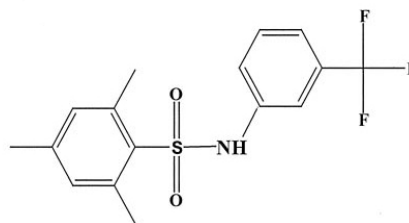


**Abb. C.15** Durch Kaliumdepolarisation induzierter Kalziumtransient einer glatten Muskelzelle einer murinen Beinarterie

fu: fluorescence unit

#### 1.4 Direkte Stimulation der Phospholipase C

Die bisherigen Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die frisch isolierten Zellen zwar vital waren, so dass sich ihre zytosolische Kalziumkonzentration messbar und reversibel durch Koffein und Kalium verändern ließ, dass sich andererseits aber die adrenerge Signalkaskade, die zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt, nicht aktivieren ließ. Um zu differenzieren, ob dies an einer gestörten Bindung der Adrenozeptoragonisten an die membranständigen Rezeptoren lag oder aber an einem distalen Defekt im weiteren Verlauf der Kaskade, wurden Experimente mit einer Substanz durchgeführt, die aus dem Extrazellularraum ins Zytosol diffundieren kann und dort direkt die Phospholipase C aktiviert. Hierbei handelt es sich um die synthetische Chemikalie 2,4,6-trimethyl-N-(*meta*-3-trifluoromethylphenyl)-benzenesulfonamid (*m*-3M3FBS), die in der Lage ist, die PLC-Isoformen  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  und  $\delta_1$  direkt zu aktivieren [Bae *et al.*, 2003].



***m*-3M3FBS**

**Abb. C.16** Strukturformel des PLC-Aktivators *m*-3M3FBS

Wie Abbildung C.17 exemplarisch zeigt, führte die Exposition der Zellen zu *m*-3M3FBS zu einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Nach ihrer Applikation ließ sich die Substanz durch einen Pufferwechsel nicht aus den Zellen auswaschen. Darüber hinaus bewirkte eine weitere Zugabe von *m*-3M3FBS keine erneute Änderung der Kalziumkonzentration. Einige Minuten nach der Stimulation mit dem PLC-Aktivator erfolgte in der Regel der Zelltod, bei dem

ein massiver Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentrationen zu beobachten war. Diese Beobachtung konnte bei verschiedenen *m*-3M3FBS-Konzentrationen (8 bis 40  $\mu$ M) gemacht werden.

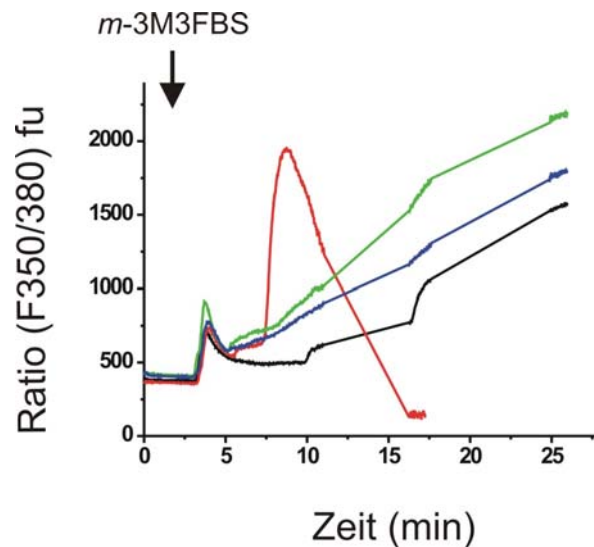


Abb. C.17 Stimulation von vier glatten Muskelzellen muriner Beinarterien mit dem PLC-Aktivator *m*-3M3FBS (Endkonzentration 40  $\mu$ M)

## 2. Ergebnisse der Kalziummessungen an Zellen, die mit der Kollagenase IV (*Worthington*) isoliert wurden

Die in Kapitel C.III.1 dargestellten Ergebnisse ergaben, dass an frisch isolierten glatten Muskelzellen, die mit der Kollagenase F von *Sigma* verdaut worden waren, zwar Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration durchgeführt werden konnten, dass aber die Voraussetzungen für Untersuchungen des cGMP-Signalweges im Hinblick auf die Kalziumkonzentration nicht gegeben waren. Daher war es nämlich nicht möglich, eine Hormon-induzierte und reversible Ausschüttung von Kalzium aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum ins Zytosol durch Aktivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors zu erreichen, so dass sich auch mögliche Auswirkungen einer veränderten cGMP-Konzentration auf die cGKI-Aktivität bezüglich dieses Signalweges nicht untersuchen ließen. Die Kollagenase-Aktivität führte dementsprechend wahrscheinlich zu einer Inaktivierung der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren.

Durch die Verwendung der Kollagenase IV konnten die Untersuchungsvoraussetzungen in dieser Hinsicht entscheidend verbessert werden.

### 2.1 Stimulation mit Noradrenalin

Bei frisch isolierten glatten Muskelzellen der murinen Beinarterien, die mit der Kollagenase IV (*Worthington*) verdaut worden waren, konnte durch die Applikation von Noradrenalin eine transiente Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration erreicht werden. Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 0,5 bis 1  $\mu$ M stimuliert und reagierten auch auf mehrmalige Zugabe von Noradrenalin (vgl. Abb. C.18). Nach der ersten Hormonapplikation wurde mit einer Pumpe die

Pufferlösung ausgewechselt, woran sich eine Ruhephase bis zur nächsten Hormonapplikation anschloss.

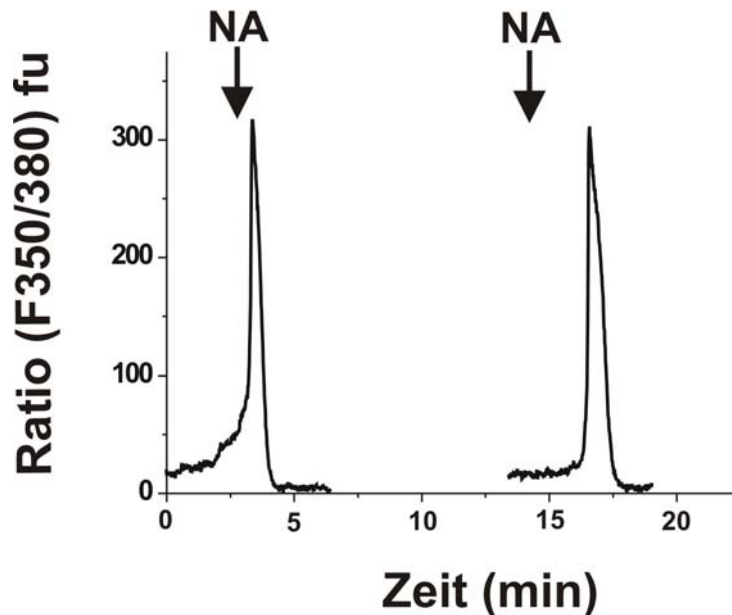


Abb. C.18 Zweimalige Stimulation einer glatten Muskelzelle einer murinen Beinarterie mit Noradrenalin (NA) (Endkonzentration  $1 \mu\text{M}$ )

fu: fluorescence unit

### 2.2 Experimente mit Noradrenalin und 8-Br-cGMP

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde zunächst ebenfalls ein Kalziumtransient durch Exposition der Zellen zu Noradrenalin ausgelöst, daraufhin das Hormon ausgewaschen und daran eine Inkubation mit 8-Br-cGMP angeschlossen, bevor erneut Noradrenalin appliziert wurde. Das Messprotokoll entsprach somit dem Schema, nach dem auch die Experimente an kultivierten Aortenzellen durchgeführt worden waren, die in Kapitel C I beschrieben wurden. Abbildung C.19 zeigt ein Beispiel für ein solches Experiment.

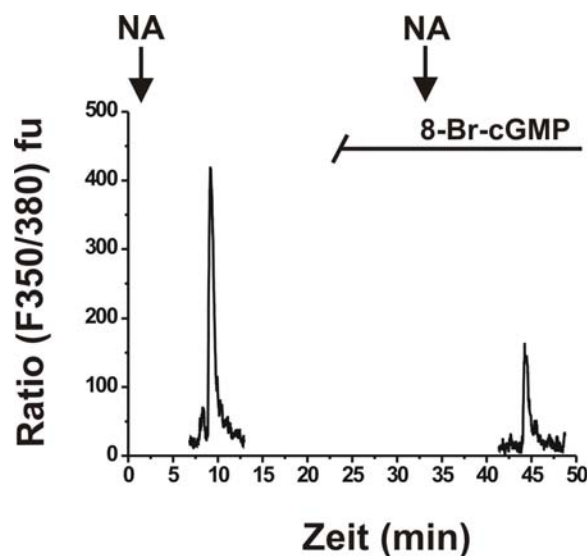
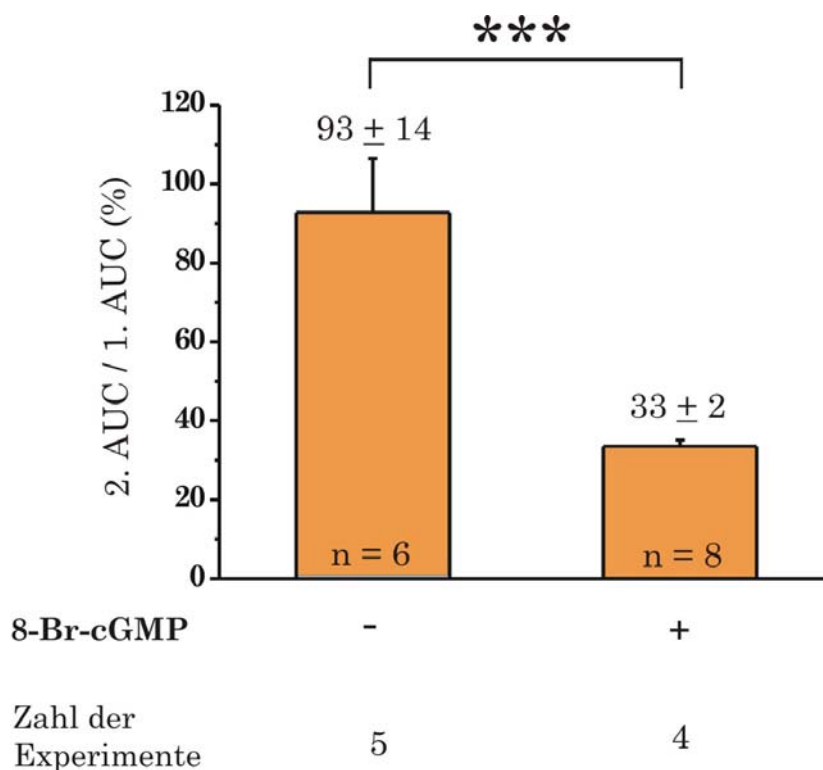


Abb. C.19 Zweimalige Stimulation einer glatten Muskelzelle aus muriner Beinarterie mit Noradrenalin (NA) (Endkonzentration  $0,5 \mu\text{M}$ ) mit 8-Br-cGMP-Inkubation (Endkonzentration  $2 \text{mM}$ ) vor der zweiten NA-Stimulation

fu: fluorescence unit



Die statistische Auswertung erfolgte, indem das Integral des zweiten Transienten eines Experimentes in Relation zum Integral des ersten Transienten gesetzt wurde. Abbildung C.20 zeigt eine graphische Darstellung des Ergebnisses.



**Abb. C.20** Statistische Auswertung der Experimente an glatten Muskelzellen muriner Beinarterien mit Noradrenalin und 8-Br-cGMP

Die Reduktion der Noradrenalin-induzierten Erhöhung der Kalziumkonzentration durch 8-Br-cGMP ist hoch signifikant: \*\*\*  $p < 0,001$ .

AUC: Area under the curve, n: Zahl der Zellen.

Wurde eine Zelle zweimal mit Noradrenalin stimuliert, nahm die Fläche unter dem zweiten Transienten  $93 \pm 14$  % der Fläche unter dem ersten Transienten ein. Bei Zellen, die nach der ersten Stimulation durch Noradrenalin mit 8-Br-cGMP inkubiert wurden, erreichte das Integral des zweiten Transienten nur  $33 \pm 2$  % des ersten Transienten.

Das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP bewirkte in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen von Wildtyp-Mäusen somit eine hochsignifikante Reduktion der Noradrenalin-induzierten Erhöhung der Kalziumkonzentration im Zytosol.

Allgemein ist zu den Experimenten an frisch isolierten VSMCs durch Verdau mit der Kollagenase IV (*Worthington*) festzuhalten, dass bei 12,5 % der untersuchten Zellen durch Noradrenalin ein Kalziumtransient ausgelöst werden konnte.

## D Diskussion

### I. Die Bedeutung von IRAG für die Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration

Bereits die Untersuchungen an der Deletionsmutante IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup> legten die Vermutung nahe, dass IRAG als wichtiges Element des NO/cGMP-Signalweges die zytosolische Kalziumkonzentration mitreguliert [Geiselhöringer *et al.*, 2004b]. Die zugehörigen theoretischen Überlegungen gehen davon aus, dass IRAG nach Phosphorylierung durch die cGKIβ die Offenwahrscheinlichkeit des gemeinsamen Komplexpartners IP<sub>3</sub>RI senkt und dadurch den IP<sub>3</sub>-vermittelten Kalziumeinstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma vermindert (vgl. Kap. A.I.5). Die Deletionsmutante ist charakterisiert durch ein Fehlen des Exons 12 des IRAG-Gens. Dadurch wird ein verkürztes IRAG-Protein exprimiert, dem die Interaktionsstelle des Proteins mit dem IP<sub>3</sub>RI fehlt [Geiselhöringer *et al.*, 2004b]. Dieses verkürzte IRAG-Protein kann in den Zellen der Deletionsmutante aber eventuell andere, bisher unbekannte Funktionen ausüben bzw. aufgrund seiner Strukturänderung neue Interaktionen mit anderen Molekülen eingehen, welche experimentelle Ergebnisse beeinflussen können.

Die Generierung einer IRAG-Knockoutmaus durch Frau Dr. Katja Sigl ermöglichte eine Reihe neuer Experimente zur funktionellen Bedeutung von IRAG. Für die vorliegende Arbeit wurden Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration glatter Muskelzellen der Aorta von IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen und WT-Mäusen durchgeführt, bei denen sich zeigte, dass im Gegensatz zu Zellen von WT-Mäusen in Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse Noradrenalin-induzierte Kalziumtransienten durch 8-Br-cGMP nicht supprimiert werden konnten. Dadurch wurden die Ergebnisse aus den Experimenten mit IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup>-Mäusen eindeutig bestätigt und die These einer physiologisch relevanten Kalziumregulation durch IRAG in glatten Muskelzellen untermauert.

Betrachtet man die Messergebnisse im Detail, stellen sich einige weitere Fragen.

Zum einen fällt auf, dass ohne Zugabe von 8-Br-cGMP der zweite Noradrenalin-induzierte Kalziumtransient im Vergleich zum ersten bei den Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlicher verringert ist als bei denen der WT-Tiere, wobei dieser Effekt statistisch nicht signifikant ist (p=0,29). Es stellt sich die Frage, ob das Fehlen von IRAG den intrazellulären Kalziumhaushalt per se verändert. Auch die alleinige Auswertung der ersten Transienten aller Experimente deutet auf eine derartige Funktion IRAGs hin, da sich zeigte, dass die basale Kalziumkonzentration in den Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse erhöht ist und die Noradrenalin-induzierte Veränderung der Kalziumkonzentration in Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber WT-Zellen deutlich reduziert ist. Diese letzten beiden Ergebnisse lassen sich möglicherweise so interpretieren, dass bei einem Fehlen von IRAG die intrazellulären Kalziumspeicher (vor allem das Sarkoendoplasmatische Retikulum, SR) zugunsten des Zytosols weniger stark gefüllt sind, so dass die Noradrenalin-getriggerte Kalziummobilisation geringer ausfällt. Dies kann allerdings nicht direkt auf ein verändertes Wiederauffüllen der Kalziumspeicher in IRAG<sup>-/-</sup>-Zellen zurückgeführt werden, da in

den Verläufen der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten, insbesondere dem Abfall des Transienten keine Unterschiede zu WT-Zellen festgestellt werden konnten. Sowohl die zeitliche Relation des Transientenabfalls zum Gesamttransienten als auch die maximale Steigung des Abfalls (=minimale Steigung des Gesamttransienten) unterscheiden sich nicht in WT- und IRAG<sup>-/-</sup>-Zellen (vgl. Abb. C7). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang dennoch eine Wirkung auf die Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase SERCA, die unter anderem mit Phospholamban, einem weiteren cGKI $\beta$ -Substrat, kolokalisiert ist und von diesem reguliert wird. Eine direkte funktionelle Verbindung zwischen IRAG und der SERCA ist allerdings recht unwahrscheinlich, da Koller *et al.* zwar zeigten, dass Phospholamban (PLB) in glatten Muskelzellen der Trachea tatsächlich mit dem cGKI $\beta$ -IRAG-IP<sub>3</sub>RI-Makrokomplex am SR assoziiert ist, *diese* PLB-Fraktion sich jedoch im Gegensatz zu etwa 90-95 % des zellulären PLB *nicht* mit der SERCA in einem Komplex befindet und daher vermutlich auch keinen Einfluss auf deren Funktion hat [Koller *et al.*, 2003]. Ein erniedrigter Kalziumfüllungsstand ( $Ca^{2+}$ -load) des SR durch IRAG-PLB-bedingte Hemmung der SERCA erscheint somit unwahrscheinlich.

Allerdings wurden im oben genannten cGKI $\beta$ -Makrokomplex neben PLB auch Zytoskelettproteine wie Calponin und  $\alpha$ -Actin gefunden, die das SR beispielsweise mit der Plasmamembran verknüpfen könnten. Dies brachten Koller *et al.* mit der bekannten Interaktion des IP<sub>3</sub>RI mit TRP (*transient receptor potential*)-Proteinen der Plasmamembran [Kiselyov *et al.*, 1999] im Rahmen des sogenannten *store operated calcium entry* (SOCE) in Verbindung, also einem Kalziumeinstrom, der nach Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher beobachtet wird (s.u.). Es ist durchaus möglich, dass PLB für die Modulation dieser IP<sub>3</sub>RI-TRP Interaktion von Bedeutung ist und bei fehlendem cGKI $\beta$ -IRAG-IP<sub>3</sub>RI-Makrokomplex in IRAG-Knockoutmäusen in seiner Funktionsweise verändert ist. Inwieweit dies allerdings einerseits zu einer Erhöhung der basalen zytosolischen Kalziumkonzentration und zugleich andererseits zu einer verminderten Veränderung der Kalziumkonzentration durch Noradrenalin führen kann, können nur weiterreichende zukünftige Untersuchungen zeigen.

Auch jenseits des speicherabhängigen Kalziumeinstroms ins Zellinnere ist die Interaktion des IP<sub>3</sub>RI mit TRP-Proteinen, im Speziellen mit TRPC3, wichtig für die Regulation der zytosolischen und damit auch der sarkoendoplasmatischen Kalziumkonzentration. Experimente an VSMCs der Ratte zeigten, dass ca. 75% der IP<sub>3</sub>-induzierten Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration unabhängig von der Kalziumfreisetzung aus dem SR ist. Vor diesem Hintergrund entwickelten Xi *et al.* ein Modell, nach dem der IP<sub>3</sub>RI in Abhängigkeit von der IP<sub>3</sub>-Konzentration durch die Aktivierung von TRPC3 einen Kationeneinstrom über die Plasmamembran induziert, der in erster Linie ein Natriumstrom ist und die Depolarisation der Membran bewirkt. Dadurch werden spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, Kalzium strömt ein und die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt [Xi *et al.*, 2008]. Weitere Messungen an Ratten-VSMCs der Aorta ergaben wiederum, dass IP<sub>3</sub>-induzierter Kalziumeinstrom, der durch die Kopplung des IP<sub>3</sub>R mit TRPC1 zustande kommt, sowohl unabhängig von der Entleerung intrazellulärer Speicher als auch von spannungsabhängigen

Kalziumkanälen ist [Tai *et al.*, 2008]. Die hierzu erforderlichen IP<sub>3</sub>RI-abhängigen Mechanismen könnten bei einem Fehlen von IRAG ebenfalls gestört sein – mit oder ohne Beteiligung von PLB. Je nach Zelltyp, TRP-Protein und Versuchsbedingungen wurde IP<sub>3</sub>RI-TRP-Komplexen eine aktivierende [Kiselyov *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 2003] oder inhibitorische [Wang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2003] Wirkung zugesprochen. Dementsprechend sind verschiedene Rollen für IRAG in der Regulation der IP<sub>3</sub>RI-Interaktionen möglich. So ist beispielsweise vorstellbar, dass IRAG ähnlich wie das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP die Bildung eines SOCE-hemmenden Komplexes in WT-Zellen erschwert, in Gegenwart von cGMP diese aber erleichtert. In renalen Mesangiumzellen, einem den glatten Muskelzellen verwandtem Zelltyp, wiesen Wang *et al.* nämlich nach, dass cGK-abhängig phosphoryliertes VASP mit TRPC4 assoziiert ist und dadurch hemmend auf SOCE wirkt. Sie vermuteten, dass das phosphorylierte VASP eine inhibitorische Verknüpfung des IP<sub>3</sub>R mit dem TRPC4 vermittelt [Wang *et al.*, 2007]. In ähnlicher Weise fördern darüber hinaus auch sogenannte Homer-Proteine (ebenfalls über eine EVH1 (*Ena/VASP homology 1*)- Domäne) [Yuan *et al.*, 2003] oder das monomere G-Protein RhoA [Mehta *et al.*, 2003] eine Assoziation des IP<sub>3</sub>R mit TRPC-Proteinen. Letztere wird bei leeren Kalziumspeichern gelöst, wodurch maximaler SOCE erlaubt wird.

Das beobachtete Phänomen der stärkeren Reduktion des zweiten NA-induzierten Kalziumtransienten ohne 8-Br-cGMP-Inkubation in Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zum WT ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,29$ ) und sollte daher nicht überinterpretiert werden. Allerdings fand sich dieser Effekt auch schon bei den Kalziummessungen an IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup>-Mäusen. [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Christensen und Mendelsohn [Christensen *et al.*, 2006] interpretierten die Ergebnisse der damaligen Messungen [Geiselhöringer *et al.*, 2004b] in dem Sinne, dass in den VSMCs der IRAG<sup>Δ12/Δ12</sup>-Mäuse die NA-induzierte Kalziumantwort im Vergleich zu Zellen der WT-Mäuse sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von 8-Br-cGMP deutlich *größer* sei. Somit beurteilten sie die Ergebnisse zwar konträr zu den Daten dieser Arbeit, zogen aber die trotzdem mögliche Schlussfolgerung, dass in glatten Gefäßmuskelzellen von Mäusen mit einem deaktivierten (oder in diesem Fall fehlenden) IRAG-Protein die Noradrenalin-stimulierte Kalziumausschüttung gestört ist und IRAG eventuell bisher unbekannte Funktionen abseits des NO-/cGMP-Signalweges erfüllt. In Versuchen an glatten Muskelzellen aus menschlichen Koronararterien zeigten Christensen und Mendelsohn, dass eine verminderte Expression der cGKI $\alpha$  nach Aktivierung des Thrombinrezeptors zu einer erhöhten Kalziummobilisierung führt und schlossen aus diesem Ergebnis, dass die cGKI $\alpha$  eine basale inhibitorische Wirkung auf die Kalziumfreisetzung habe. Analog lässt sich die Beobachtung dieser Arbeit, dass in IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen die Noradrenalin-induzierte Kalziumausschüttung supprimiert ist, so interpretieren, dass cGKI $\beta$  und IRAG im Gegensatz zur cGKI $\alpha$  eine basale *stimulierende* Rolle auf die Kalziumfreisetzung hätten, in Gegenwart von cGMP aber hemmend wirkten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die von Christensen postulierte inhibitorische Wirkung der cGKI $\alpha$  in den

IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen durch die supprimierte Expression der cGKI $\beta$  (vgl. Kap. C II) stärker zur Geltung kommt und dadurch die Kalziumausschüttung geringer ausfällt.

Ebenfalls interessant ist die Beobachtung, dass bei den Zellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse das Verhältnis des zweiten Noradrenalin-getriggerten Kalziumtransienten zum Kontrolltransienten nach 8-Br-cGMP-Inkubation größer war als ohne. Beruht dieser nicht-signifikante Trend ( $p = 0,52$ ) nicht auf einem beispielsweise streuungsbedingten Artefakt, deutet er darauf hin, dass das cGMP-Analogon in den IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht nur eine verminderte Absenkung der IP<sub>3</sub>-vermittelten Kalziumfreisetzung aus dem SR bewirkt, sondern im Gegenteil die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach noradrenerger Stimulation zusätzlich begünstigt. Eine Diskussion dieser Frage lohnt sich insofern, dass auch in diesem Fall eine ähnliche Tendenz bereits aus den Ergebnissen der Messungen an Zellen der IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Mäuse erkennbar war [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Möglicherweise entsteht dieser Effekt durch eine 8-Br-cGMP-bedingte Aktivierung intrazellulärer PDEs, die dadurch endogenes cGMP (oder cAMP) hydrolysieren, weswegen eine erneute Stimulation der Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Noradrenalin einen größeren Transienten bewirkt als ohne 8-Br-cGMP-Inkubation vor dem zweiten Transienten.

In glatten Muskelzellen findet man PDE1,-3,-4 und -5 (vgl. Kap. A.I.3.1), von denen die PDE5 hier als das aktivste Enzym gilt [Rybalkin *et al.*, 2003]. 8-Br-cGMP kann zwar die PDEs durch Bindung an ihre katalytische Seite bereits bei etwa einem Zehntel der hier verwendeten Konzentration halbmaximal hemmen (vgl. [Beltman *et al.*, 1995], Tabelle 1). Allerdings konnte gezeigt werden, dass cGMP die PDE5 durch Bindung an die nichtkatalytische GAF-Domäne auch aktivieren kann [Rybalkin *et al.*, 2003], was eventuell auch auf das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP zutrifft. Als gesichert gilt, dass nach Stimulation mit 8-Br-cGMP die cGKI die PDE5 phosphoryliert und damit PDE5 aktiviert [Rybalkin *et al.*, 2002]. Eventuell gewinnt dieser Weg bei einem Fehlen von IRAG an Bedeutung, wodurch ein erhöhter NA-induzierter Kalziumtransient erklärt werden könnte.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Klärung der Frage, welche cGKI-Isoform für die Phosphorylierung der PDE5 verantwortlich ist. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivität der cGKI $\alpha$  unter den gegebenen Versuchsbedingungen gegenüber jener der cGKI $\beta$  stärker ins Gewicht fällt als unter physiologischen Bedingungen. Zum einen hat 8-Br-cGMP eine wesentlich höhere Affinität zur  $\alpha$ - als zur  $\beta$ -Isoform [Wolfe *et al.*, 1989], zum anderen ist die cGKI $\beta$  in der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus deutlich schwächer exprimiert als in der WT-Maus (vgl. Kap. C II) und muss außerdem ohne ihr Effektorprotein IRAG agieren.

Ferner gilt es zu bedenken, dass die cGKI $\alpha$  über die Rho-Kinase-vermittelte Stimulation der MLCP auch eine hemmende Dephosphorylierung der PDE5 bewirkt [Rybalkin *et al.*, 2002].

Die vorliegenden Messungen zeigen trotz dieser Detailfragen eindeutig, dass IRAG eine essentielle Rolle in der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration spielt.

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration wird durch verschiedene Signalwege reguliert. Es bleibt Gegenstand der Diskussion, die **Bedeutung des IRAG-vermittelten Anteils** hieran bzw. allgemein die Gewichtung der verschiedenen Mechanismen abzuschätzen. Mit Sicherheit lässt sich diese Frage nicht pauschal beantworten, sondern ist in Hinblick auf Gewebetyp und Versuchsspezies differenziert zu betrachten.

Unter den verschiedenen Mechanismen der cGMP-abhängigen Regulation der Kalziumkonzentration ist die cGKI-abhängige Reduktion der Kalziumkonzentration ein entscheidender Signalweg. Viele Studien zeigten, dass sowohl die **cGKI $\alpha$**  als auch die **cGKI $\beta$**  hierzu beitragen, so dass die **relative Bedeutung** der jeweiligen Isoform unklar ist.

Durch die Generierung von cGKI-Rescuemäusen konnte gezeigt werden, dass die glattmuskelspezifische Ausschaltung einer der beiden Isoformen durch die jeweils andere funktionell beinahe vollständig im Hinblick auf Darm- und Gefäßfunktionen ausgeglichen werden kann [Weber *et al.*, 2007]. Diese Beobachtung war nach den Untersuchungen von Feil und Christensen überraschend [Christensen *et al.*, 2006; Feil *et al.*, 2002], deren Studien trotz der meist stärkeren Proteinexpression der cGKI $\beta$  in glatten Gefäßmuskelzellen im Vergleich zur cGKI $\alpha$  auf eine dominante Rolle der cGKI $\alpha$  hindeuteten. Ursachen der hinreichenden Kompensationsfähigkeit der Isoformen könnten in einer geringer ausgeprägten Substratspezifität der Isozyme *in vivo* im Vergleich zu den *in vitro*-Verhältnissen liegen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der jeweilige Signalweg der allein vorhandenen Isoform ausgleichend an Bedeutung gewinnt und so den Ausfall des anderen Signalweges kompensieren kann [Weber *et al.*, 2007]. Plausibel ist aber auch die Existenz weiterer, z.T. noch unbekannter cGKI-Substrate, die von *beiden* Isoformen phosphoryliert werden [Surks, 2007]. In Frage käme hier beispielsweise das Cystein-reiche LIM-only Protein 4 (CRP4) [Huber *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007]. Zudem kann die vollständige Kompensation der cGKI-Isoformen in den Rescuemäusen durch das veränderte Proteinexpressionsniveau der Kinasen verursacht sein [Surks, 2007].

Es bleibt zu erwähnen, dass sowohl die Beobachtungen der Gruppen um Feil als auch um Christensen durch die Versuchsbedingungen beeinflusst worden sein könnten. Feil *et al.* exprimierten in VSMCs von cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen ein Fusionsprodukt aus einer cGKI-Isoform und dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), welches an den carboxyterminalen Teil von cGKI $\alpha$  bzw. cGKI $\beta$  gebunden wurde [Feil *et al.*, 2002]. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass das cGKI $\beta$ -EGFP-Fusionsprotein gleichmäßig im Zytosol verteilt war, während das cGKI $\alpha$ -EGFP vorwiegend perinukleär, das heißt im Bereich der sarkoendoplasmatischen Retikula, konzentriert war. Geiselhöringer *et al.* hatten jedoch eindeutig demonstriert, dass die cGKI $\beta$  in glatten Gefäßmuskelzellen in einem Komplex mit IRAG und dem IP<sub>3</sub>RI kernnah exprimiert wird [Geiselhöringer *et al.*, 2004a]. Hieraus lässt sich folgern, dass das cGKI $\beta$ -EGFP-Fusionsprotein in VSMC vermutlich nicht in der Lage ist, mit IRAG und dem IP<sub>3</sub>RI physiologisch zu interagieren,

was essentiell ist für die Regulation der IP<sub>3</sub>-vermittelten Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, wie die Ergebnisse von Ammendola et al. zeigten [Ammendola *et al.*, 2001]. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen ist die Interpretation der Ergebnisse von Feil *et al.*, die cGKI $\alpha$  sei die vorherrschende Isoform für der Kalziumregulation glatter Gefäßmuskelzellen, zurückhaltend zu bewerten.

Christensen arbeitete mit einem Modell, das schon a priori die funktionelle Bedeutung der cGKI $\alpha$  gegenüber der cGKI $\beta$  stärker gewichtete: es wurden VSMCs aus humanen Koronarien verwendet, in denen 95% der Gesamt-cGKI von der cGKI $\alpha$  repräsentiert wurden. In diesen Zellen wurden durch die Verwendung von cGKI $\alpha$ -siRNA und flag-cGKI $\beta$  die cGKI $\alpha$  deutlich niedriger exprimiert und die cGKI $\beta$  stark überexprimiert im Vergleich zu den physiologischen Bedingungen. Die Beobachtung, dass eine Suppression der cGKI $\alpha$  zu einer stärkeren Kalziummobilisation nach Aktivierung des Thrombinrezeptors führte, während die Überexpression der cGKI $\beta$  keinerlei Einfluss auf dieses Ergebnis hatte, wurde im Sinne einer dominanten Rolle der cGKI $\alpha$  und einer nur marginalen Bedeutung der cGKI $\beta$  für die Kalziumregulation in VSMCs interpretiert. Hier drängt sich allerdings die Vermutung auf, dass in einer Zelle, in welcher der cGKI $\beta$ -Signalweg per se kaum ausgebildet ist, die alleinige Überexpression der cGKI $\beta$  keine messbare Steigerung des cGKI $\beta$ -Signalweges bewirken kann, wenn die zugehörigen Substratproteine, die für die nachfolgende Signalweiterleitung und -verstärkung essentiell wären, weiterhin kaum vorhanden sind.

Einwandfrei belegt diese Studie dagegen, dass das Verhältnis von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in den glatten Muskelzellen verschiedener Arterien im Hinblick auf die Expression und vermutlich somit auch auf die Funktion stark schwankt, so dass eine allgemeine Aussage über die Relevanz der unterschiedlichen Isoformen ohne Differenzierung bezüglich des Gefäßtyps vermutlich nicht sinnvoll sein kann.

Verschiedene Studien zeigten mögliche Wege auf, über welche die **cGKI** die zytosolische Kalziumkonzentration in Gefäßmuskelzellen regulieren könnte.

Ruth *et al.* demonstrierten, dass die cGKI $\alpha$  die Thrombin-induzierte **IP<sub>3</sub>-Synthese** hemmt [Ruth *et al.*, 1993] und diskutierten in diesem Zusammenhang eine mögliche Phosphorylierung der PLC oder eines G-Proteins. Kurze Zeit später wurde deutlich, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten inhibitorischer, Pertussistoxin (PTX)-sensitiver G-Proteine tatsächlich cGKI $\alpha$ -abhängig phosphoryliert und Agonisten-induzierte Kalziumtransienten dadurch gehemmt werden [Pfeifer *et al.*, 1995]. Ebenso konnte die cGMP-abhängige Phosphorylierung der PLC $\beta$  durch die cGK bestätigt werden [Xia *et al.*, 2001] wie auch eine Hemmung der IP<sub>3</sub>-Synthese in Thrombozyten durch Phosphorylierung des Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptors durch die cGK [Wang *et al.*, 1998]. Ferner stimuliert die cGKI $\alpha$  den Regulator des G-Protein-Signalweges (RGS) 2 zur verstärkten Aktivierung der GTPase, die durch Hydrolyse des G $\alpha$ -gebundenen GTP die Vasokonstriktorwirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unterbricht. Dass auch auf diese Weise die PLC $\beta$ -abhängige IP<sub>3</sub>-Produktion wirkungsvoll gehemmt und eine entsprechende

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration deutlich reduziert wird, belegen zahlreiche *in vivo*-Experimente [Osei-Owusu *et al.*, 2007].

Inwieweit eine Phosphorylierung nicht nur des IP<sub>3</sub>RI-Substrats IRAG, sondern des **IP<sub>3</sub>RI** selbst durch die cGKI ebenfalls kalziumregulierend wirkt, wird kontrovers diskutiert.

Komalavilas und Lincoln schlossen aus Untersuchungen an Aorten-VSMCs der Ratte, dass die cGK sowohl eine cGMP- als auch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>RI *in vivo* vermittelt [Komalavilas *et al.*, 1996]. In gastralen SMCs wurde zudem gezeigt, dass die cGKI $\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>RI am Serin 1755 eine Reduktion der IP<sub>3</sub>-induzierten Kalziumausschüttung aus dem SR bewirkt [Murthy *et al.*, 2003], während eine mögliche Phosphorylierung durch die cGKI $\beta$  in VSMCs allerdings keinen Effekt auf die zytosolische Kalziumkonzentration hat [Ammendola *et al.*, 2001]. Ob in VSMCs auch die cAK-vermittelte Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>RI auf die IP<sub>3</sub>-stimulierte Kalziumfreisetzung inhibitorisch wirkt, wie beispielsweise in Megakaryozyten [Tertyshnikova *et al.*, 1998], ist unklar. Die Gruppe um Wagner kommt auf Grund von Experimenten an Leukozyten mit einem IP<sub>3</sub>R-Nullhintergrund über Jahre hinweg zu konträren Ergebnissen bezüglich einer hemmenden Wirkung der IP<sub>3</sub>R-Phosphorylierung. So postuliert sie, dass die Phosphorylierung des IP<sub>3</sub>RI eine Erhöhung der Rezeptoroffenwahrscheinlichkeit und dadurch eine Potenzierung der IP<sub>3</sub>-abhängigen Kalziumausschüttung bewirkt [Wagner *et al.*, 2008] und *in vivo* ausschließlich durch die cAK verursacht wird [Wagner *et al.*, 2003]. Möglicherweise ist hierbei das Ausbleiben der cGK-vermittelten Phosphorylierung *in vivo* durch das Fehlen akzessorischer Proteine vor dem Nullhintergrund zu erklären.

Die Bedeutung eines funktionell aktiven IP<sub>3</sub>RI für die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen wurde jedenfalls kürzlich durch Versuche an IP<sub>3</sub>RI-defizienten VSMCs hervorgehoben, in denen die Phenylephrin-induzierte Kontraktion massiv gestört war [Zhou *et al.*, 2008a].

Als gesichert gilt ferner die physiologisch relevante Aktivierung des **BK<sub>Ca</sub>-Kanals** in der Plasmamembran glatter Gefäßmuskelzellen durch die cGKI $\alpha$ . Der glattmuskuläre BK<sub>Ca</sub>-Kanal besteht aus einem Tetramer porenbildender  $\alpha$ -Untereinheiten sowie vier akzessorischer  $\beta_1$ -Untereinheiten [Lu *et al.*, 2006] und bewirkt bei Öffnung einen Kaliumausstrom, der die Membran hyperpolarisiert, so dass sich spannungsabhängige Kalziumkanäle der Plasmamembran schließen und eine Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration verhindert wird [Eichhorn *et al.*, 2007].

Der Kanal wird durch Membrandepolarisation [Latorre *et al.*, 2006] oder eine hohe *globale* intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert sowie durch eine transiente *lokale* Kalziumausschüttung durch Ryanodinrezeptoren aus dem gefüllten [Essin *et al.*, 2007] plasmamembrannahen SR. Eine cGMP-abhängige Aktivierung erfolgt beispielsweise durch eine cGMP-vermittelte Erhöhung der Kalziumspark-Frequenz [Porter *et al.*, 1998] oder durch direkte Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit [Fukao M, 1999] durch die cGKI $\alpha$  [Swayze *et al.*, 2001]. Diese Phosphorylierung bewirkt zwar keinerlei Änderung der Leitfähigkeit oder der maximalen



Kanalaktivität, jedoch eine erhöhte Kalziumsensitivität und Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei negativeren Membranpotentialen [Alioua *et al.*, 1998].

Die physiologische Bedeutung eines funktionsfähigen BK<sub>Ca</sub>-Kanals wurde in Untersuchungen an BK<sub>Ca</sub>-Knockoutmäusen (BK<sup>-/-</sup>) deutlich, die einen hypertensiven Phänotyp bei primärem Hyperaldosteronismus und erhöhtem myogenem Gefäßtonus zeigen [Sausbier *et al.*, 2005]. In BK<sup>-/-</sup>-VSMCs können keine transienten hyperpolarisierenden Auswärtströme gefunden werden und die cGMP-abhängige Relaxation der Arterien ist gegenüber WT-Arterien vermindert. Phenylephrin-induzierte Kalziumtransienten können in BK<sup>-/-</sup>-VSMCs weniger stark durch 8-Br-cGMP gehemmt werden als in WT-Zellen. Die dennoch vorhandene leichte Reduktion der 8-Br-cGMP-bedingten Suppression der Kalziumtransienten führen die Autoren auf die fortbestehende Hemmung der IP<sub>3</sub>-vermittelten Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurück. Im Gegensatz hierzu gab es im Rahmen der Kalziummessungen an IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise auf eine fortbestehende 8-Br-cGMP-abhängige Suppression der Kalziumtransienten, etwa durch den BK<sub>Ca</sub>-Kanal.

Eine weitere Studie an BK<sup>-/-</sup>-Mäusen unterstrich die enge Vernetzung der einzelnen tonusregulierenden Signalwege in glatten Muskelzellen. So konnte das unerwartete Ergebnis einer verstärkten betaadrenergen Bronchodilatation und einer verminderten methacholinergen Bronchokonstriktion in BK<sup>-/-</sup>-Mäusen mit der kompensatorischen Überexpression von sGC (x 1,5), cGKI (x 2,3) und besonders IRAG (x 3,5) in trachealen SMCs erklärt werden [Sausbier *et al.*, 2007]. Interessanterweise war die regulatorische Untereinheit der cAK normal exprimiert, so dass die Autoren von einer Kreuzaktivierung der cGKI durch cAMP ausgehen.

Ferner reguliert die cGKI die zytosolische Kalziumkonzentration durch den cGMP-abhängigen, Kalzium-aktivierten Chlorideinstrom, L-Typ-Kalziumkanäle, die intrazelluläre SERCA, den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) sowie die Plasmamembran Kalzium-ATPase (PMCA). Da für diese Mechanismen keine Beteiligung von IRAG nachgewiesen werden konnte, werden sie nicht ausführlicher dargestellt. Abbildung D.1 zeigt allerdings einen Überblick über die Regulation der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration durch den NO/cGMP/cGKI-Signalweg.

Die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern wie Kaveolen oder dem SR, zum Beispiel nach Stimulation mit IP<sub>3</sub> oder Hemmung der SERCA durch Thapsigargin, wird oft gefolgt von einem Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum ins Zytosol. Dieser Strom wird meist als kapazitativer Kalziumeinstrom oder auch **store operated calcium entry** (SOCE) bezeichnet und ist für die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration von nicht zu vernachlässigender Bedeutung, wenngleich die molekulare Identität der einzelnen SOCE-Komponenten weitgehend unklar ist und insbesondere die Kopplung der Speicherentleerung an die Öffnung von Plasmamembrankanälen (SOC) noch viel Klärungsbedarf bereithält. Als mögliche SOCs gelten neben kalziumselektiven Kanälen wie Orai vor allem nichtselektive Kationenkanäle der TRP-Familie, speziell TRPC-Kanäle (*canonical transient receptor potential*),

wobei in VSMCs unter den 7 TRPC-Mitgliedern TRPC1 die vorherrschende Form ist [Leung *et al.*, 2008]. Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, dass ein TRPC1-Knockout in VSMCs keinerlei Einfluss auf SOCE hat, hingegen eine Suppression von STIM1 (*stromal-interacting molecule 1*) SOCE stark beeinträchtigt [Dietrich *et al.*, 2007]. STIM1 fungiert als Kalziumsensor mit eigener Kalziumbindungsdomäne in den intrazellulären Speichern und wird bei Speicherentleerung zur Plasmamembran transloziert [Yuan *et al.*, 2007].

NO beeinflusst SOCE in VSMCs vermutlich nur indirekt, nämlich über die Erhöhung des Kalziumgehaltes der Speicher durch direkte Aktivierung der SERCA [Cohen *et al.*, 1999]. Dennoch konnte in verschiedenen Zelltypen eine inhibitorische cGMP-Wirkung auf TRPC3 und 4 nachgewiesen werden, die durch die cGKI $\alpha$  vermittelt wird und unabhängig von der cGMP-induzierten Hemmung der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern ist.

Neben Wang *et al.*, welche die Bedeutung von cGMP-abhängig phosphoryliertem VASP demonstrierten (s.o.), wiesen Kwan *et al.* zwei bedeutende Wege nach, über welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert wird. In transfizierten HEK-Zellen phosphoryliert die cGKI $\alpha$  TRPC3 an zwei Stellen und hemmt dadurch den speichergesteuerten Kalziumeinstrom durch TRPC3 [Kwan *et al.*, 2004]. Darüber hinaus hemmt die cGKI $\alpha$  aber auch Diacylglycerin (DAG)-vermittelten, SOCE-unabhängigen Kalziumeinstrom durch TRPC3 in HEK-Zellen [Kwan *et al.*, 2006]. Interessanterweise wird die cGKI $\alpha$  zu dieser Aktion durch die Proteinkinase C via Phosphorylierung und somit unabhängig von cGMP aktiviert [Hou *et al.*, 2003].

Da in VSMCs sowohl die Expression von cGKI als auch von TRPC-Proteinen hoch ist und cGK-Phosphorylierungsstellen auch in anderen TRPC-Formen vorhanden sind, sind die genannten Beobachtungen auch im Hinblick auf die cGK-regulierte Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen interessant. Insbesondere für den TRPC6 wurde in VSMCs eine negative Regulation durch den NO-cGMP-cGK-Signalweg nachgewiesen [Takahashi *et al.*, 2008].

Der Einfluss von cGMP auf den Kalziumeinstrom ist allerdings laut Xu *et al.* konzentrationsabhängig [Xu *et al.*, 1994]. Demnach aktiviert cGMP in geringen Konzentrationen den speicherabhängigen Kalziumeinstrom, während es ihn in höheren Konzentrationen hemmt. Von Versuchen an Pankreas-Azinzellen leiteten die Autoren die These ab, dass die NOS-Aktivität durch die Speicherkalziumkonzentration moduliert wird und die resultierende cGMP-Konzentration den Kalziumeinstrom reguliert. Somit wäre cGMP ein diffusionsfähiges Kopplungselement zwischen Speicher und membranassoziierten Kalziumkanälen. Ob dieses Modell auch auf glatte Muskelzellen übertragbar ist, ist eher fraglich.

Die Assoziation von TRPC-Kanälen mit IP<sub>3</sub>Re (s.o.), die Einflussnahme dieser Proteine auf die zytosolische Kalziumkonzentration sowie die Regulierbarkeit der Aktivität mancher TRPC-Kanäle durch die cGKI lassen eine Interaktion des IP<sub>3</sub>R-TRPC-Komplexes oder anderer assoziierter Proteine mit IRAG durchaus plausibel erscheinen. Allerdings basieren die vorliegenden Studien vorwiegend auf Zellmodellen mit der cGKI $\alpha$ , die bekanntermaßen keine Interaktion mit IRAG eingehen kann. Dennoch ist eine Beteiligung von IRAG durch seine Komplexbildung mit dem IP<sub>3</sub>R denkbar.

Die Eigenschaft des IP<sub>3</sub>R, die Offenwahrscheinlichkeit und Aktivität von TRPC-Kanälen zu regulieren, wurde intensiv, aber unter Erzielung kontroverser Ergebnisse beforscht. Ausführliche Untersuchungen mit IP<sub>3</sub>R-Teilstrukturen ergaben, dass die aminoterminal IP<sub>3</sub>-Bindungsdomäne als TRPC3-„Wächter“ dient und Kalziumströme über die Plasmamembran aktivieren kann, während beispielsweise die transmembrane Domäne für eine Inaktivierung des TRPC3-Kanals nötig ist. Über die Vorstellung einer Requirierung IP<sub>3</sub>-gebundener IP<sub>3</sub>Ren für die Aktivierung von Plasmamembrankanälen kann erklärt werden, dass eine Agonisten-induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer effizienteren Aktivierung eines kalziumaktivierten Stromes führt, als dies durch eine bloße Speicherentleerung erreichbar wäre [Kiselyov *et al.*, 1999].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der intrazellulären Kalziumkonzentration via Kationeneinströme in den letzten Jahren erheblich gemehrt werden konnten, dennoch noch viele Fragen, insbesondere bezüglich des regulatorischen Einflusses der cGKI offen sind.

**Abbildung D.1** gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration durch den NO/cGMP/cGK-Signalweg:

Die Synthese von IP<sub>3</sub> wird cGKI-abhängig gehemmt [Ruth *et al.*, 1993], wobei einzelne Mechanismen in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden konnten: die Phosphorylierung des Membranrezeptors (TXA<sub>2</sub>-Rezeptor) [Wang *et al.*, 1998], die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des assoziierten G-Proteins durch die cGKI $\alpha$  [Pfeifer *et al.*, 1995] und die Phosphorylierung der PLC $\beta$  [Xia *et al.*, 2001]. Mehrfach belegt ist zudem die Phosphorylierung von RGS2 in VSMCs durch die cGKI $\alpha$ , wodurch der G-Protein-Signalweg ebenfalls unterbrochen wird [Osei-Owusu *et al.*, 2007].

Die Phosphorylierung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals durch die cGKI $\alpha$  bewirkt eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals [Alioua *et al.*, 1998]. Der vermehrte K<sup>+</sup>-Ausstrom führt zu einer Hyperpolarisierung der Plasmamembran und dadurch zur Schließung spannungsabhängiger L-Typ-Kalziumkanäle (L-Typ Ca<sub>v</sub>). Letztere können wohl auch direkt durch die cGK gehemmt werden [Tewari *et al.*, 1997].

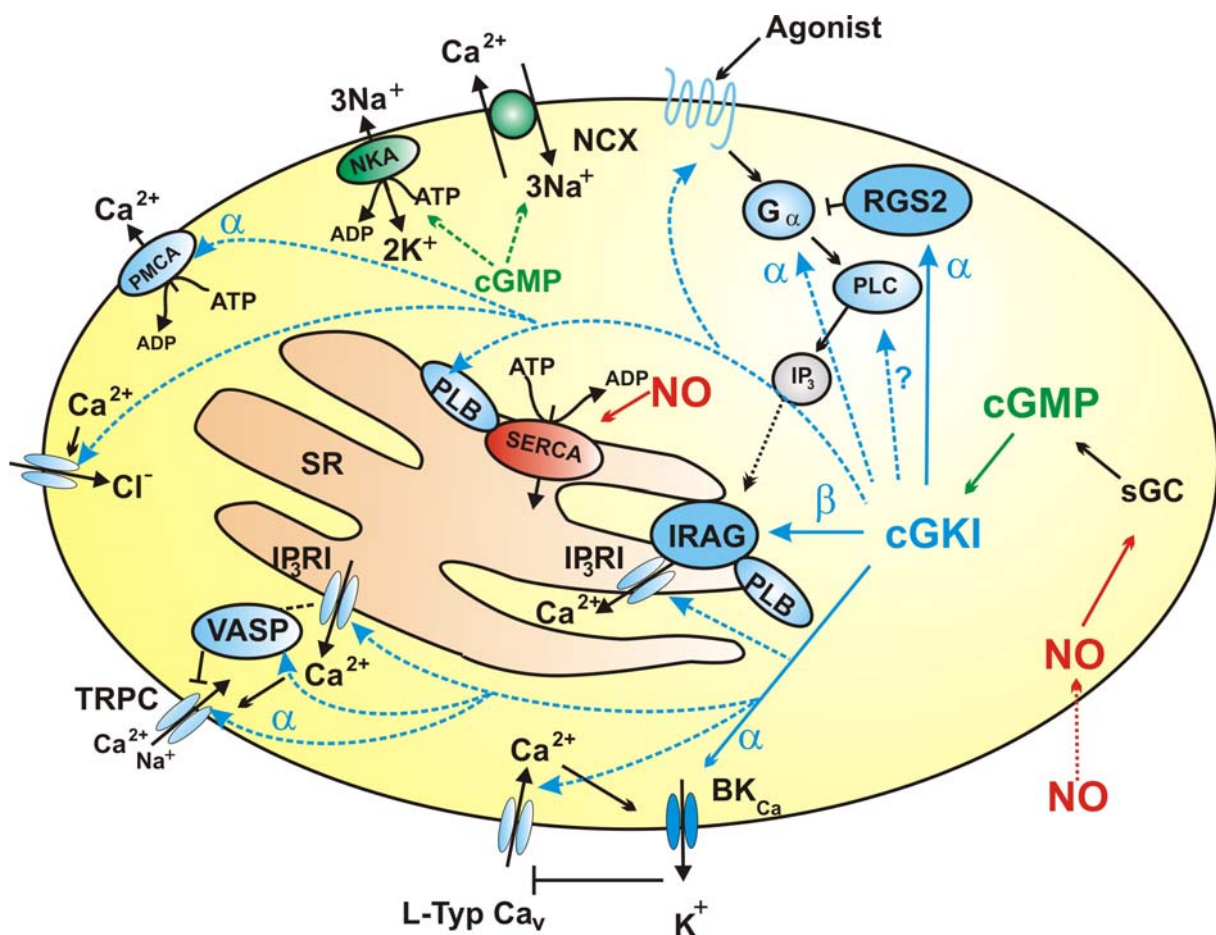
Die Interaktion unspezifischer Kationenkanäle wie TRPC mit VASP und dem IP<sub>3</sub>R ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Für alle drei Proteine konnte eine Phosphorylierung durch die cGKI gezeigt werden, wobei die Bedeutung der einzelnen Prozesse für die Kalziumregulation in VSMCs unklar ist (s.o.).

Die zytosolische Kalziumkonzentration wird möglicherweise auch durch den Einfluss der cGKI auf den kalzium-aktivierten Chloridkanal [Matchkov *et al.*, 2004] sowie die Plasmamembran Kalzium-ATPase [Yoshida *et al.*, 1999] reguliert.

Eine vermehrte Kalziumsekretion über den Natrium-Kalziumaustauscher NCX wird eventuell durch cGMP ohne Beteiligung der cGK bewirkt [Furukawa *et al.*, 1991], wobei hier auch eine

cGMP-abhängige Aktivierung über die Natrium-Kalium-ATPase (NKA) vorgeschlagen wurde [Nishimura, 2006].

Phospholamban (PLB) liegt sowohl in einem Komplex mit IRAG als auch mit der SERCA vor, wobei nur für die SERCA-assoziierte Fraktion eine Phosphorylierung durch die cGKI diskutiert wurde [Raeymaekers *et al.*, 1988]. Die SERCA selbst wird durch NO-abhängige Gluthathiolisierung zu einer schnelleren  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR veranlasst [Cohen *et al.*, 2006].



**Abb. D.1 Modell zur Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration durch den NO/cGMP/cGKI-Signalweg**

Die Abbildung zeigt verschiedene Substrate des NO/cGMP/cGKI-Signalweges in der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration. Durchgezogene Pfeile symbolisieren in der Literatur belegte Wirkmechanismen, gestrichelte Pfeile stehen für vermutete, jedoch in VSMCs nicht belegte Einflüsse. Die griechischen Buchstaben  $\alpha$  und  $\beta$  konkretisieren die cGKI-Isoform, die für den jeweiligen Mechanismus verantwortlich ist. Die gepunkteten Pfeile zeigen die Diffusion von Molekülen. Die cGKI $\beta$  phosphoryliert IRAG, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit des IP<sub>3</sub>R vermindert wird (vgl. Abb. A.5). Die Bedeutung einer direkten IP<sub>3</sub>RI-Phosphorylierung durch die cGKI für die Kalziumregulation ist unklar. Eine ausführliche Erläuterung geht der Abbildung voran.

Die **physiologische Bedeutung der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration** liegt bei glatten Muskelzellen vorwiegend in der Steuerung der Zellmotilität [Zhuang *et al.*, 2005] und des Kontraktionszustandes der Zelle [Webb, 2003].

Die **Zellmotilität** glatter Gefäßmuskelzellen spielt besonders im Zusammenhang mit deren Migration aus der Tunica media in die Tunica intima nach Gefäßschaden oder bei Prozessen wie der Arteriosklerose eine Rolle. Als wichtiger Stimulator der VSMC-Motilität gilt (zumindest bei Langzeitexposition [Zhuang *et al.*, 2008]) Insulin und als dessen Gegenspieler Stickstoffmonoxid. Eine Zellkultur-basierte Studie zeigte, dass auch diese NO-Wirkung in VSMCs über die sGC/cGMP/cGKI-Signalkaskade vermittelt wird, welche über eine Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Aktivierung von Enzymen wie PTP-PEST (*Protein tyrosine phosphatase-prolin, glutamate, serine and threonine*) und letztlich die Hemmung der NADPH-Oxidase bewirkt, die dadurch weniger Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produziert, dem unmittelbaren Stimulus für Migration [Zhuang *et al.*, 2005]. Hierbei wurde ausschließlich der Effekt einer cGKI $\alpha$ -Überexpression untersucht, wobei die Wirkungen von cGKI $\beta$  und IRAG nicht ausgetestet wurden, so dass deren Beteiligung an der NO-vermittelten Regulation der Zellmotilität unklar bleibt.

Für die Regulation des **Muskeltonus** spielt die Variabilität der zytosolischen Kalziumkonzentration eine ganz entscheidende Rolle, da bei erhöhter Kalziumkonzentration die Kalzium-/Calmodulin-abhängige Myosin-Leichte-Kette-Kinase (MLCK) aktiviert wird und mit der Phosphorylierung der leichten Kette des Myosin II den entscheidenden Schritt zur Kontraktion ausführt (vgl. Kap. A II.). Die Relevanz von IRAG für die Hemmung dieses Prozesses lässt sich nicht nur aus den Ergebnissen der Kalziummessungen ableiten, sondern wurde auch durch Kraftmessungen an IRAG<sup>-/-</sup>-Aortenringen belegt [Spießberger, 2007].

Darüber hinaus ist der NO/cGMP/cGKI-Signalweg auch in kalziumunabhängige Mechanismen zur Regulation des Tonus glatter Gefäßmuskelzellen involviert, nämlich zum einen in die sogenannte „Kalziumdesensibilisierung“ des kontraktile Apparats, die durch eine verstärkte Aktivität der MLCP zustande kommt, zum anderen in die HSP20-vermittelte Wirkung auf dünne Filamente (vgl. Kap. A I. 3.4.4). Bei keinem der kalziumunabhängigen Mechanismen gibt es momentan einen Hinweis darauf, dass IRAG daran beteiligt ist. Es lässt sich also festhalten, dass es viele **verschiedene cGKI-abhängige Mechanismen** der Tonusregulation glatter Muskelzellen gibt, wobei nachgewiesen wurde, dass IRAG über eine Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration den kontraktile Apparat beeinflusst, während es für seine Beteiligung an kalziumunabhängigen Prozessen keinen konkreten Hinweis gibt. Die Bedeutung der einzelnen Mechanismen unterscheidet sich je nach Zelltyp, aber auch der Kontraktionsphase erheblich. Während in Gefäßmuskelzellen wohl vor allem die Regulation der Kalziumkonzentration wichtig ist, scheint beispielsweise im Dünndarm die Kalziumsensibilisierung eine herausgehobene Stellung einzunehmen [Hofmann, 2005]. Ferner wird die Initiierung einer Kontraktion in erster Linie durch die Änderung der Kalziumkonzentration hervorgerufen, dagegen ihre Aufrechterhaltung eher durch kalziumunabhängige Wege bewirkt [Murthy *et al.*, 2003]. Auch

unter den verschiedenen Gefäßtypen mit ihren unterschiedlichen Funktionen variiert die Bedeutung der einzelnen Wege [Hofmann *et al.*, 2006].

## II. Die Bedeutung von IRAG für die Expression tonusrelevanter Proteine

Als Beitrag zu dieser Diskussion über die Bedeutung verschiedener relaxierend wirkender Signalwege ist die Analyse der IRAG-abhängigen Expression einiger Proteine in glatten Muskelzellen der Aorta sowie der A. tibialis gedacht, deren Beteiligung an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration bzw. des Kontraktionszustandes bekannt ist.

In den glatten Muskelzellen der untersuchten IRAG<sup>-/-</sup>-Arterien konnte kein IRAG-Protein detektiert werden, was den Erfolg der IRAG-Ablation belegt.

Ferner ist die Expression der **cGKI $\beta$**  in den VSMCs der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu der in WT-Zellen deutlich reduziert. Dieses Ergebnis ist analog zu den Beobachtungen an IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Mäusen [Geiselhöringer *et al.*, 2004b], in denen die Interaktion zwischen IRAG und cGKI $\beta$  gestört ist. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die beobachteten Effekte der Kalziummessungen an glatten Muskelzellen der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht nur durch die IRAG-Defizienz, sondern auch durch die verminderte Expression der cGKI $\beta$  bedingt sind. Da bei Kalziummessungen an VSMCs von cGKI $\alpha$ -Mäusen [Pfeifer *et al.*, 1998] wie bei Zellen von IRAG<sup>-/-</sup>-Tieren die cGMP-hemmende Wirkung auf hormon-induzierte Kalziumtransienten supprimiert ist, ist diese Möglichkeit sicherlich zu diskutieren. Allerdings hemmte 8-Br-cGMP Noradrenalin-induzierte Kalziumtransienten in VSMCs von cGKI $\alpha$ -Rescuemäusen, in denen nur die cGKI $\alpha$ , nicht aber die cGKI $\beta$  in cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen glattmuskelspezifisch wiederhergestellt worden war, in gleichem Maße wie in Wildtypzellen [Weber *et al.*, 2007]. Dieses divergierende Verhalten von IRAG<sup>-/-</sup>- und cGKI $\alpha$ -VSMCs lässt sich auf zwei unterschiedliche Weisen erklären. Zum einen könnte durch das Fehlen von IRAG in IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen ein Mechanismus der Kalziumregulation gestört sein, der in cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäusen intakt ist, was dafür spräche, dass IRAG die zytosolische Kalziumkonzentration auch unabhängig vom bekannten Komplex mit IP<sub>3</sub>R und cGKI $\beta$  regulieren kann, wofür es jedoch bisher keinerlei Hinweis gab. Zum anderen ist anzunehmen, dass die cGMP-abhängige Kalziumregulation in cGKI $\alpha$ -VSMCs deshalb unverändert ist, weil sehr effektive Kompensationsmechanismen existieren. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass diese Mechanismen in IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen, in denen die cGKI $\beta$  ja weiterhin, wenn auch in geringerem Grade vorhanden ist, nicht oder nur gering ausgebildet sind, wodurch das deutlich konträre Verhalten der IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs erklärt werden kann. Ferner ist sicherlich auch denkbar, dass die Messergebnisse durch die Herabregulation der Expression und / oder Aktivität anderer cGKI $\beta$ -Substrate mitbedingt sein können.

Um diese Fragen sicher zu beantworten, sind weitere Versuche an Mäusen nötig, deren cGKI $\beta$  in gleichem Maße wie im WT exprimiert ist, deren IRAG-Gen jedoch ausgeschaltet wurde. Derartige Mäuse könnten durch Verpaarung von cGKI $\beta$ -Rescuemäusen mit der IRAG-defizienten Mauslinie generiert werden

Im Gegensatz zur cGKI $\beta$  ist die **cGKI $\alpha$**  sowohl in VSMCs der WT- als auch der IRAG<sup>-/-</sup>-Mäuse sehr stark exprimiert, wobei auch dies kongruent mit den Befunden der IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>-Mäuse ist [Geiselhöringer *et al.*, 2004b] und die Annahme bestätigt, dass Expression und Funktion von cGKI $\alpha$  und IRAG, welches sich nicht in einem Komplex mit der cGKI $\alpha$  befindet [Geiselhöringer *et al.*, 2004a], in keinem direkten Zusammenhang stehen. Zudem ist es mit den Westernblotergebnissen vereinbar, dass in IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen die cGKI $\alpha$  im Gegensatz zum cGKI $\beta$ /IRAG-Signalweg funktionell kompensatorisch aufgewertet sein könnte, allerdings nicht in dem Maße, dass der Verlust der IRAG-Funktion für die Kalziumregulation vollständig ausgeglichen werden könnte.

Die Expression des **IP $_3$ RI** ist trotz des fehlenden Komplexpartners IRAG in Kontrast zur cGKI $\beta$  durch den IRAG-Knockout offensichtlich nicht wesentlich verändert, so dass davon auszugehen ist, dass ein Wegfall des IP $_3$ RI-cGKI $\beta$ -IRAG-Komplexes bezüglich der Expression des IP $_3$ RI nicht stark ins Gewicht fällt. Auch in der Deletionsmutante IRAG <sup>$\Delta$ 12/ $\Delta$ 12</sup>, in der speziell die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP $_3$ RI zerstört ist, ist der IP $_3$ RI genauso stark exprimiert wie in WT-Zellen [Geiselhöringer *et al.*, 2004b].

Die MLCP-Untereinheit **MYPTI** ist in den IRAG<sup>-/-</sup>-VSMCs ebenfalls unverändert exprimiert, was die Vermutung bestätigt, dass die Mechanismen der cGMP-abhängigen Kalziumdesensibilisierung durch das Fehlen von IRAG nicht beeinflusst werden.

MYPTI ist das zentrale Element der MLCP, welches sowohl die katalytische MLCP-Untereinheit PP-1C $\delta$  als auch das Substrat -meist Myosin- bindet. MYPT1 wird auf Grund seiner zahlreichen Peptidbindungsstellen gelegentlich als interaktive Proteinplattform bezeichnet [Hartshorne Dj, 1999], wobei eine aminoternale Region mit Ankyrin-Repetitionen die entscheidende Rolle spielt [Ito *et al.*, 2004]. Über 42 Aminosäuren seines carboxyterminalen Leuzinzippers interagiert es außerdem beispielsweise mit dem Leuzinzipper der cGKI $\alpha$  [Sharma *et al.*, 2008], und fördert so die Aktivierung der MLCP und die Dephosphorylierung der MLC.

Die Tatsache, dass MYPT1 mit verschiedenen Zielproteinen Bindungen eingeht, lässt die Vermutung zu, dass es neben der Dephosphorylierung von Myosin noch andere Funktionen erfüllt, wodurch auch die verschiedenen Zelllokalisationen in glatten Muskelzellen, nämlich an Filamenten und der Zellmembran, erklärt werden könnten [Hartshorne Dj, 2004]. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung bestärkt, dass in konfluenten Endothelzellen Myosin und MYPT1 nicht kolokalisiert sind und darüber hinaus die Konzentration von MYPT1 etwa das Drei- bis Vierfache der Myosinkonzentration beträgt [Hirano M, 1999].

Da es bis dato keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen **RGS2**- und IRAG-Signalweg gibt, überrascht das Ergebnis nicht, dass RGS2 auch in VSMCs der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus exprimiert ist. RGS2 ist ein plasmamembrannahes Protein, das durch Bindung an G<sub>q</sub> $\alpha$ -Untereinheiten und Aktivierung einer GTPase die G-Protein-vermittelte Wirkung von Vasokonstriktoren in VSMCs hemmt. Seine physiologische Bedeutung zeigen Untersuchungen an den deutlich hypertensiven RGS2<sup>-/-</sup>-Mäusen [Obst *et al.*, 2006]. Bei erhöhter cGMP-Konzentration aktiviert die cGKI $\alpha$  RGS2 durch Phosphorylierung zweier Serine am aminoterminalen Ende, wobei die Interaktion über den Leuzinzipper der cGKI $\alpha$  vermittelt wird [Tang *et al.*, 2003]. Dies bewirkt sowohl eine Verstärkung der RGS2-Bindung an die Plasmamembran als auch der Aktivierung der GTPase, so dass die G<sub>q</sub> $\alpha$ -Aktivität -nicht aber die anderer G $\alpha$ -Untereinheiten- und dadurch auch der Vasokonstriktoreffekt stärker gehemmt werden. Auf diese Weise ist RGS2 entscheidend an der cGMP-vermittelten Hemmung der IP<sub>3</sub>-induzierten Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und des kapazitativen Kalziumeinstroms beteiligt.

Durchaus bemerkenswert ist der Unterschied im Expressionsgrad von RGS2 in Muskelzellen der Aorta und der Beinarterien in den hier gezeigten Westernblot-Untersuchungen. In den IRAG-defizienten VSMCs der A. tibialis ist gegenüber den Aorta-VSMCs ein wesentlich höherer RGS2-Gehalt zu detektieren. Für die WT-Zellen kann dies an Hand der vorliegenden Daten auf Grund unterschiedlichen Proteingehaltes (vgl. Ladungskontrolle  $\beta$ -Actin) nicht eindeutig belegt werden, wurde jedoch in anderen Messergebnissen von Frau Dr. K. Sigl gefunden (vgl. Abb. C.10).

Dies deutet auf eine unterschiedliche Bedeutung von RGS2 in verschiedenen Gefäßtypen hin. Tatsächlich wird in der Literatur eine abweichende RGS2-Funktion in glatten Muskelzellen der Aorta im Vergleich zu Widerstandsgefäßen beschrieben. Während Aortenringe von RGS2<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Phenylephrin mit einer übermäßigen Kontraktion reagieren [Tang *et al.*, 2003], fällt die Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion von mesenterialen Widerstandsgefäßen etwa gleich stark aus wie in entsprechenden WT-Gefäßen [Sun *et al.*, 2005]. Daher muss man von Unterschieden in den Kontraktions- und Relaxationsmechanismen in Aorta und Widerstandsgefäßen ausgehen, wobei die unterschiedliche Wirkung von RGS2 auf die Muskeltonusregulation von Aorta und Widerstandsgefäßen nicht auf einer abweichenden Kalziumregulation zu beruhen scheint [Sun *et al.*, 2005].

### **III. Etablierung einer Methode zur Kalziummessung in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen**

Die Kalziummessungen an kultivierten Muskelzellen der murinen Aorta bestätigen die Bedeutung von IRAG für die cGMP-abhängige Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration. Um die Messbedingungen den physiologischen Verhältnissen *in vivo* noch stärker anzupassen, wurde eine Methode entwickelt, mit der auch an frisch isolierten Muskelzellen Kalziummessungen bei erfolgreicher Stimulation des  $\alpha$ -adrenergen sowie des



NO/cGMP-Signalweges durchgeführt werden können. Zudem wurden nun auch Zellen kleinerer Gefäße isoliert, deren Kontraktionszustand für die Regulation des Blutdruckes des Gesamtorganismus relevanter ist als der der Aortenzellen.

Die Untersuchung der cGMP/cGK-Signalkaskade in **kultivierten** VSMCs hat sich insofern als **problematisch** erwiesen, dass mit zunehmender Zahl der Passagen die Expression der cGKI und kontraktile Proteine wie der Myosin-Schwere-Kette, Calponin und  $\alpha$ -Actin abnimmt [Brophy *et al.*, 2002]. Hiermit geht eine Dedifferenzierung der Myozyten einher, die einen synthetischen, nicht-kontraktile Phänotyp ausbilden. Zwar wurde kürzlich gezeigt, dass Expression und Aktivität der cGKI in VSMCs nach der Kultivierung bis zur etwa 5. Passage noch konstant sind, jedoch wurde auch deutlich, dass sich die Wirkung der cGKI, beispielsweise auf die Adhäsion der Zellen, zwischen frisch kultivierten und subkultivierten Zellen durchaus unterscheidet [Weinmeister *et al.*, 2008], was auf eine veränderte Substratzusammensetzung bzw. eine stärkere Aktivierung anderer, konkurrierender Signalwege schließen lässt.

Cawley *et al.* wiesen zudem bereits vor der ersten Passage eine leichte Reduktion der cGK-Expression in kultivierten Ratten-VSMCs nach [Cawley *et al.*, 2007]. Auch Westernblotuntersuchungen von Frau Dr. K. Sigl ergaben, dass der IP<sub>3</sub>RI, die cGKI sowie speziell die Isoform cGKI $\beta$ , RGS2, RhoA, MYPT1 und insbesondere IRAG in murinen Aorten-VSMCs deutlich geringer exprimiert sind als in frisch isoliertem Aortengewebe (vgl. Abb. C.11).

Auf Grund dieser veränderten „Enzym/Proteinkomposition“ [Felbel *et al.*, 1988] in kultivierten Zellen erscheint die Möglichkeit der Kalziummessung in frisch isolierten VSMCs erstrebenswert.

Wie in den Kapiteln B und C ausführlich dargestellt wird, wurden die Zellen der Beinarterien zunächst mit den gleichen Enzymen isoliert, mit welchen die Isolation der Aortenzellen vor Kultivierung erfolgte. Mit diesen Zellen wurden innerhalb von maximal 2,5 Stunden Kalziummessungen durchgeführt.

Hierbei belegte die erfolgreiche Stimulation der frisch isolierten Muskelzellen mit **Koffein** (10 mM) die Vitalität der Zellen und die Integrität der Kalziumhomöostase. Koffein bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus dem SR durch Sensibilisierung des Ryanodinrezeptor 2 für Kalzium, das heißt durch die Senkung der Schwelle der luminalen Kalziumkonzentration im SR, ab der die Ryanodinrezeptoren aktiviert werden [Kong *et al.*, 2008]. Die wiederholte Gabe von Koffein induzierte Kalziumtransienten von etwa gleichbleibender Größe, was darauf hindeutet, dass die Kalziumspeicher dabei nur teilweise entleert oder nach der Kalziumfreisetzung wieder ausreichend gefüllt wurden.

Auch die Anhebung der zytosolischen Kalziumkonzentration durch Erhöhung der extrazellulären **Kaliumkonzentration** zeigt, dass die Zellen vital und grundlegende Mechanismen der Kalziumhomöostase intakt waren.

Auf die Exposition zum PLC-Aktivator **m-3M3FBS** reagierten die frisch isolierten Muskelzellen nach einer Latenz von ca. 3 bis 4 Minuten mit einem deutlichen Anstieg der zytosolischen

Kalziumkonzentration. Dieses Ergebnis lässt sich in dem Sinne interpretieren, dass der adrenerge Signalweg trotz mangelnder Aktivierbarkeit der Membranrezeptoren und unter Umgehung der G<sub>q</sub>-Proteine durchaus intakt war und somit durch Aktivierung der PLC die IP<sub>3</sub>-Produktion angeregt und die Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern induziert werden konnte. Die relativ lange Verzögerung der Kalziumreaktion nach Zugabe des *m*-3M3FBS - für den adrenergen Signalweg eher untypisch- war auch in anderen Zelltypen beobachtet und zum Anlass genommen worden, den kausalen Zusammenhang der kalziummodulierenden Wirkung der Chemikalie mit der PLC-Aktivierung in Frage zu stellen [Krjukova *et al.*, 2004]. Während die Gruppe um Kukkonen von einer höchstens schwachen und deutlich späteren Wirkung des *m*-3M3FBS als PLC-Aktivator im Vergleich zur Kalziumantwort ausgeht [Krjukova *et al.*, 2004], beschreiben Horowitz *et al.* *m*-3M3FBS als potenten Induktor der Phospholipase C-β und führen Wirkungsfluktuationen und Verzögerungen in der Kalziumreaktion auf die Aktivierung konkurrierender Mechanismen durch *m*-3M3FBS zurück [Horowitz *et al.*, 2005]. Die Integrität und Stimulierbarkeit der Signalkaskade ab dem Moment der PLC-Aktivierung kann auf Grund der vorliegenden Experimente demnach als wahrscheinlich angesehen werden, wird jedoch nicht zweifelsfrei belegt.

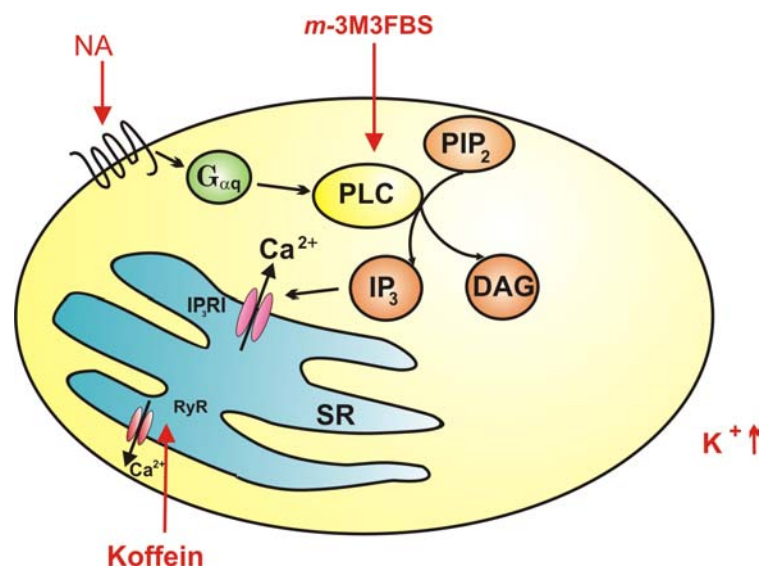
Die Experimente demonstrieren zudem, dass i) die Stimulation der Kalziumfreisetzung durch *m*-3M3FBS nicht reversibel ist, sondern die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Erreichen eines Peaks auf ein Niveau abfällt, das über der basalen Konzentration liegt, ii) nach Auswaschen der applizierten Substanz durch erneute Zugabe des *m*-3M3FBS in den Zellen kein weiterer Anstieg der Kalziumkonzentration bewirkt werden kann und iii) nach Applikation der Substanz ein großer Teil der Zellen nach einigen Minuten abstirbt. Von einem Absterben der Zellen wurde hierbei ausgegangen, wenn bei einer Zelle ein vollständiger Verlust der Fluoreszenz bzw. ein exzessiver Anstieg der Kalziumkonzentration der Zelle ohne Erreichen eines neuen „Steady State“ beobachtet wurde.

Die Ursache für diesen raschen Zelltod ist unklar, zumal die verwendete Konzentration von 40 μM vergleichbar ist mit den Konzentrationen, in denen *m*-3M3FBS bisher verwendet wurde (5-100 μM). Von den bislang 18 Veröffentlichungen, in denen eine Verwendung von *m*-3M3FBS beschrieben wird [Bae *et al.*, 2003; Bagayogo *et al.*, 2009; Clapp *et al.*, 2006; Diaz Anel, 2007; Fioravanti *et al.*, 2008; Hattori *et al.*, 2007; Horowitz *et al.*, 2005; Jajoo *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2008; Krjukova *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2005; McNally *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008], werden in einer einzigen Experimente mit *m*-3M3FBS an frisch isolierten, nicht-kultivierten Gewebszellen vorgestellt [Clapp *et al.*, 2006]. Auch in dieser Arbeit wurden Kalziummessungen durchgeführt und bezeichnenderweise unterschiedliche Antworten der (murinen Geschmacks-)Zellen auf den PLC-Aktivator beobachtet: So zeigte sich in manchen Zellen nach Ausbildung eines Kalziumtransienten eine Rückkehr auf das basale Kalziumniveau, während in anderen dieses nicht mehr erreicht wurde und ein Teil der Zellen durch die *m*-3M3FBS-Applikation effektiv

getötet wurde. Möglicherweise sind insbesondere frisch isolierte Zellen anfällig gegenüber Wirkungsschwankungen oder noch unbekannte Nebeneffekte dieser neuen Substanz.

Weitere Untersuchungen belegen, dass *m*-3M3FBS nach 12- bis 24-stündiger Inkubation in diversen Tumorzelllinien unter anderem durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration Apoptose induzieren können [Jung *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2005]. Ob ein ähnlicher Mechanismus bereits in den hier verwendeten Zellen zum Tragen kommt und den vorzeitigen Zelltod bewirkt, ist auf Grund der sehr divergierenden zeitlichen Dimensionen äußerst fraglich.

Die Diskussion zeigt jedoch, dass es derzeit keinen zuverlässigen direkten und reversiblen Aktivator der PLC zu geben scheint, so dass zur Erforschung der Modulation des  $\alpha$ -adrenergen Signalweges durch die NO/cGMP-Signalkaskade die Stimulation der Membranrezeptoren unerlässlich ist und in diesem Fall die Isolation der Zellen optimiert werden musste.



**Abb. D.2 Verschiedene Versuche der Stimulation einer Kalziumfreisetzung aus dem SR einer Gefäßmuskelzelle, die mit Hilfe der Kollagenase F isoliert wurde**

Das Bild zeigt zusammenfassend die Ansatzpunkte der verschiedenen verwendeten Substanzen. Noradrenalin (NA) bindet an einen transmembranären Rezeptor und aktiviert über dieses G-Protein (G<sub>αq</sub>)-vermittelt die Phospholipase C (PLC). *m*-3M3FBS stimuliert dagegen die PLC direkt unter Umgehung eines zusätzlichen Rezeptors. Die PLC katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphoinositolbiphosphat (PIP<sub>2</sub>). IP<sub>3</sub> stimuliert die Kalzium-(Ca<sup>2+</sup>)-Freisetzung aus dem Sarkoendoplasmatischen Retikulum (SR) durch den IP<sub>3</sub>-Rezeptor I (IP<sub>3</sub>RI). Koffein erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors (RyR) und bewirkt dadurch ebenfalls eine vermehrte Freisetzung von Kalzium ins Zytosol. Auch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration (K<sup>+</sup>) führt durch Depolarisation der Zelle zur Anhebung der zytosolischen Kalziumkonzentration.

Während glatte Muskelzellen der Beinarterie, welche unter Einsatz der **Kollagenase F (Sigma)** isoliert worden waren, aber ohne vorangegangene Kultivierung für die Kalziummessungen verwendet wurden, nicht auf Adrenozeptoragonisten ansprachen, konnten die *kultivierten* VSMCs, die mit den gleichen Enzymlysungen verdaut worden waren, mit Noradrenalin stimuliert

werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass während des Enzymverdaus die G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren ihre Funktionalität verlieren und diese in der Zeit der Kultivierung -vermutlich durch Resynthese der Rezeptoren- regeneriert werden kann. Dass die fehlende Erregbarkeit der frisch isolierten Zellen wahrscheinlich durch funktionell inaktivierte Rezeptoren bedingt ist, jedoch wohl nicht durch Defunktionalität späterer Effektoren der Signalkaskade, belegen die Experimente mit dem membranpermeablen PLC-Aktivator *m-3M3FBS*, der die Phospholipase auch in den frisch isolierten Zellen intrazellulär aktivieren konnte und dadurch einen messbaren Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkte. Denkbar wäre theoretisch auch eine verminderte Aktivität der G-Proteine, die sich im Signalweg zwischen Rezeptor und PLC befinden. Da die verwendeten Enzyme aber während der Organinkubation im Enzympad zunächst die frei zugänglichen extrazellulären Proteine proteolysieren, ist anzunehmen, dass die membranständigen Proteine bevorzugt vor den intrazellulären abgebaut werden.

Die Theorie einer Inaktivierung der Membranrezeptoren durch die Isolation mit der Kollagenase F, wird ferner durch die Beobachtung gestützt, dass beim Verdau mit der **Kollagenase IV (Worthington)** ebendiese Rezeptoren durchaus stimuliert werden konnten. Die Kollagenase IV wird ebenfalls von dem Bakterium *Clostridium histolyticum* produziert, ist aber für eine geringere tryptische Aktivität bekannt und wird zur Isolation von Zellen oder Zellverbänden verwendet, bei denen eine Integrität der Membranproteine und -rezeptoren wichtig ist [Worthington, 1993]. Traditionell wird sie daher für die Isolation von Langerhans'schen Zellen des Pankreas benutzt, welche in diabetische Tiere transplantiert werden, um dort in Abhängigkeit der Glukosekonzentration im Blut adäquat Insulin zu sezernieren. Diese Kollagenase wird außerdem beispielsweise für gezielte Untersuchungen der Endothelinrezeptoren frisch isolierter, afferenter Arteriolen benötigt [Fellner *et al.*, 2007].

Offensichtlich war die Verwendung des Trypsininhibitors nicht ausreichend, um die starke Wirkung der Kollagenase F auf die Membranrezeptoren abzuschwächen, ohne die Isolationsfähigkeit der einzelnen Muskelzellen zu beeinträchtigen.

Durch die Verwendung der Kollagenase IV von Worthington konnten somit erfolgreich catecholaminresponsive glatte Muskelzellen isoliert werden, an denen ohne vorangegangene Kultivierung Kalziummessungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durchgeführt werden konnten.

Dennoch sind die Möglichkeiten dieser Methode begrenzt. Zum einen dadurch, dass bei Messungen an frisch isolierten Zellen für ein Experiment relativ wenige Zellen zur Verfügung stehen, wie ein Vergleich der Zellzahl direkt nach Isolation und nach einigen Tagen exponentieller Vermehrung in Kultur nahe legt, und zum anderen, da das Überleben der frisch isolierten Zellen im Verlauf der Experimente beeinträchtigt sowie das Ansprechen der Zellen auf Noradrenalin trotz des vorsichtigen Verdaus mit 12,5 % relativ gering ist.

Die Robustheit der Zellen wird sicherlich durch ihre Lösung aus dem Zellverband und der daraus resultierenden Unterbrechung der interzellulären Kommunikationsfähigkeit am stärksten beeinträchtigt und kann in einer Zellkultur durch Ausbildung von Zellausläufern (vgl. Abb. C.1) und fokale Adhäsionen etwas kompensiert werden. In der vorgestellten Experimentenreihe wurde die Vitalität der Zellen vermutlich auch durch die wiederholten Temperaturwechsel mit der Isolation bei 34°C, Zwischenlagerung auf Eis und Kalziummessung bei RT reduziert. Eine mögliche toxische Wirkung von Fura-2-AM oder 8-Br-cGMP in den verwendeten Konzentrationen lässt sich darüber hinaus in der Literatur allerdings nicht nachvollziehen. Zudem ist zwar davon auszugehen, dass die Kollagenase IV die Adrenorezeptoren weniger beeinträchtigt als die Kollagenase F, aber dennoch ein Teil der Rezeptoren während der Zellisolation kollagenasebedingt inaktiviert wird.

Die recht geringe Ansprechrate der frisch isolierten Muskelzellen auf die Aktivierung der Adrenorezeptoren kann möglicherweise auch durch eine Kontamination mit Fibroblasten der Adventitia (der äußersten Gefäßwandschicht, [Che *et al.*, 2008]) mitverursacht sein [Cawley *et al.*, 2007]. Die Differenzierung zwischen glatten Muskelzellen und Fibroblasten ist rein optisch nicht sicher möglich, weswegen derzeit verschiedene Markerproteine untersucht werden, unter denen sich vermutlich SM-MHC (glattmuskelspezifische Myosin-Schwere-Kette) bzw. unter Umständen FSP-1 (fibroblast-spezifisches Protein) als am zielführendsten erweisen werden [Stevens *et al.*, 2008].

Trotz dieser Einschränkungen gilt es zu betonen, dass mit dieser Methode ein Modell etabliert wurde, das den Verhältnissen im lebenden Organismus durch Umgehung der veränderten Proteinregulation bei Kultivierung in gewisser Weise näher kommt.

Der Vergleich der Ergebnisse der Kalziummessungen an kultivierten VSMCs der Aorta mit denen an frisch isolierten Muskelzellen der Beinarterien der Maus zeigt, dass die Reduktion der Noradrenalin-induzierten Kalziumfreisetzung durch 8-Br-cGMP in den frisch isolierten Zellen deutlich stärker ist.

Angesichts der eher kleinen Zellzahl sollte dieses Ergebnis nicht überbewertet werden. Dennoch erscheint die Frage überlegenswert, ob es sich auf die unterschiedliche Zellpräparation zurückführen lässt oder möglicherweise durch den Gefäßtyp bedingt ist. Ein Vergleich mit zuvor beschriebenen Experimenten nach gleichem Protokoll hilft hier nur bedingt weiter: in verschiedenen Veröffentlichungen werden NA-induzierte Kalziumtransienten in kultivierten VSMCs der murinen WT-Aorta vor und nach Inkubation mit 8-Br-cGMP (1 mM) gezeigt. Die Integrale der Transienten nach 8-Br-cBMP-Gabe betragen hier 35 [Pfeifer *et al.*, 1998], ca. 49 [Wörner, 2006], ca. 53 [Geiselhöringer *et al.*, 2004b] und 70 % [Sigl, 2004] derer der Transienten vor Zugabe des cGMP-Analogen, so dass zwar eine signifikante, aber quantitativ sehr variable Reduktion der Kalziumkonzentration durch 8-Br-cGMP konstatiert werden kann. Ähnliche Kalziummessungen mit Adrenorezeptorstimulation an frisch isolierten VSMCs werden sehr viel

seltener beschrieben. In frisch isolierten Muskelzellen der Aorta konnten Phenylephrin-induzierte Transienten durch 8-Br-cGMP auf 35 % vermindert werden [Sausbier *et al.*, 2005], wobei hier die divergierende Rezeptoraffinität von Phenylephrin und NA zu beachten ist [Starke, 2005]. Zusammenfassend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich dennoch die Tendenz ableiten, dass in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen 8-Br-cGMP möglicherweise eine stärkere inhibierende Wirkung auf die Adrenorezeptor-stimulierte Kalziumfreisetzung hat als in kultivierten Zellen. Die unterschiedliche Ausbildung von responsiblen Adrenorezeptoren in kultivierten und frisch isolierten Zellen zeigt, dass während der Kultivierung der Zellen wichtige Signalproteine nachsynthetisiert werden, die in frisch isolierten Zellen ihre Funktionalität verloren haben. Unter Umständen bezieht sich dies auch auf Proteine der Signalwege, die dem cGK-Weg entgegenwirken.

Zu beachten ist aber auch, dass sich die Aorta von kleineren Gefäßen sowohl in ihrer Funktion und ihrer Bedeutung für den Blutdruck als auch in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheidet, wie z.B. der Vergleich der RGS2-Expression in Aorta und A. tibialis zeigt (vgl. Kap. D II). Dies lässt vermuten, dass cGMP-abhängige Kalziumregulationsmechanismen dieser verschiedenen Zelltypen divergieren, so dass eine stärkere Wirkung von 8-Br-cGMP auf die Noradrenalin-induzierte Kalziumfreisetzung in Muskelzellen der A. tibialis zu erklären wäre. Für die Kalziummessungen im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Zellen der distalen A. femoralis verwendet, da bei einer strikten Beschränkung auf die A. tibialis die Zellausbeute zu gering gewesen wäre (vgl. ähnliche Erfahrungen von [Sausbier *et al.*, 2000]). Dass sich dennoch tendenziell ein stärkerer Effekt des cGMP-Analogons auf diese Zellen zeigt, spricht umso mehr für eine wichtige Bedeutung der cGMP-Signalwege in kleineren Arterien.

## IV. Ausblick

IRAG ist für die Vermittlung der cGMP-Wirkung auf Kalziumsignale in glatten Muskelzellen und Thrombozyten von herausragender Bedeutung. Mit der Generierung der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus wurde ein wichtiges Modell entwickelt, um die Kenntnisse über die Funktionen dieses Proteins auf zellulärer Ebene sowie für einzelne Organsysteme wie z.B. den Gastrointestinaltrakt oder das Gefäßsystem zu vertiefen.

Gerade durch Kalziummessungen in frisch isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der A. tibialis könnten mögliche Einflüsse von IRAG auf die Blutdruckregulation unter Umgehung eventueller systemischer Kompensationsmechanismen untersucht werden. Die A. tibialis wurde als gut zugängliches Gefäß mehrfach als Modell für Widerstandsgefäße verwendet [Sausbier *et al.*, 2000], auch wenn ein Vergleich mit tatsächlichen Widerstandsgefäßen in der Mikrozirkulation des Musculus cremaster darauf hindeutet, dass sich zumindest bezüglich der Azetylcholin-induzierten Vasodilatation die A. tibialis eher wie die Aorta und nicht wie Arteriolen verhält [Koeppen *et al.*, 2004]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen jedoch sowohl in Bezug auf die unterschiedliche RGS2-Expression in Aorta und A. tibialis als auch auf die cGMP-abhängige Kalziumregulation dafür, dass sich beide Gefäße in strukturellen und funktionellen

Eigenschaften durchaus deutlich voneinander unterscheiden. Um mögliche Effekte von IRAG auf die Kalziumregulation in Widerstandsgefäßen zu untersuchen, könnten daher Kalziummessungen an frisch isolierten VSMCs der Beinarterie der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus durchgeführt werden.

Kalziummessungen an isolierten Einzelzellen bieten die Möglichkeit, zellinterne Prozesse unter Minimierung äußerer Einflüsse und interzellulärer Interaktionen beobachten zu können. Allerdings beinhaltet gerade die Verwendung frisch isolierter Zellen die Problematik einer geringen Zahl an vitalen messbaren Zellen, so dass immer wieder diskutiert wurde, ob nicht Messungen an Zellpopulationen von ca. 10<sup>7</sup> Zellen repräsentativere Ergebnisse liefern als Messungen an relativ wenigen einzelnen Zellen [Meinecke *et al.*, 1994]. In diesem Sinne wurden beispielsweise auch Kalziummessungen an Aortenringen durchgeführt [Lalli *et al.*, 1999].

Die zukünftige Entwicklung wird zeigen, inwieweit IRAG als therapeutisches Zielprotein genutzt werden kann. Während die cGKI bereits in der Therapie von kolorektal metastasierenden Karzinomen einen wichtigen potentiellen Angriffspunkt darstellt [Kwon *et al.*, 2008; Soh *et al.*, 2008], könnte IRAG beispielsweise für die pharmakologische Behandlung der arteriellen Hypertonie oder der Atherosklerose relevant werden.

## E Zusammenfassung

Die Stimulation adrenerger Rezeptoren bewirkt in glatten Gefäßmuskelzellen unter anderem durch die Produktion von  $IP_3$  und Stimulation des  $IP_3R$  die Freisetzung von Kalzium aus dem SR. Dadurch wird die zytosolische Kalziumkonzentration vorübergehend angehoben. Dieses Kalziumsignal führt zu einer Aktivierung der MLCK, die durch Phosphorylierung von Myosin die Kontraktion der Muskelzelle initiiert. Es ist allgemein akzeptiert, dass der NO/cGMP-Signalweg diese adrenerge Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration antagonisiert, indem endotheliales NO die muskuläre Guanylatzyklase (sGC) zur cGMP-Generierung anregt, wodurch letztlich die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) aktiviert wird. Während mehrere Substrate der cGKI $\alpha$ -Isoform bekannt sind, ist derzeit nur ein selektiver Wirkungsweg der cGKI $\beta$  in glatten Gefäßmuskelzellen bekannt. Hierbei handelt es sich um den Komplex aus cGKI $\beta$ ,  $IP_3RI$  und IRAG, welcher am SR lokalisiert ist. Bei Aktivierung durch cGMP phosphoryliert die cGKI $\beta$  das ca. 125-130 kDa große Protein IRAG, wodurch die über den intrazellulären Kalziumkanal  $IP_3R$  vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem SR gehemmt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Kalziummessungen an primär kultivierten glatten Muskelzellen der murinen Aorta unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 gezeigt werden, dass Noradrenalin-induzierte Kalziumtransienten nur in Wildtyp-Zellen, nicht jedoch in Zellen der kürzlich entwickelten IRAG-Knockout (IRAG<sup>-/-</sup>)-Maus durch das zellpermeable cGMP-Analogon 8-Br-cGMP reduziert werden können. Dadurch wurden frühere Untersuchungen an der Deletionmutante IRAG <sup>$\Delta 12/\Delta 12$</sup> -einer Maus, in der die Interaktionsstelle von IRAG mit dem  $IP_3R$  fehlt- bestätigt. Zudem wurde demonstriert, dass die Noradrenalin-induzierte Kalziumfreisetzung in IRAG<sup>-/-</sup>-Mäusen per se gestört ist. Eine Westernblotanalyse ergab, dass in glatten Muskelzellen aus Aorta und Beinarterien der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus IRAG überhaupt nicht und die cGKI $\beta$  im Vergleich zu Wildtypzellen nur vermindert exprimiert wird, während beispielsweise die cGKI $\alpha$  in gleichen Mengen nachweisbar ist. Interessanterweise wurde darüber hinaus deutlich, dass das cGKI $\alpha$ -Substrat RGS2 unabhängig vom Genotyp in Aortenzellen schwächer exprimiert ist als in Zellen der A. tibialis. Dadurch wird die Überlegung gestützt, dass die Bedeutung cGMP-abhängiger Signalkaskaden in arteriellen Muskelzellen in Abhängigkeit der Gefäßgröße variiert.

Schließlich wurde eine Methode entwickelt, mit der Noradrenalin-responsive glatte Muskelzellen kleinerer Arterien isoliert und *ohne* vorangehende Kultivierung Messungen der zytosolischen Kalziumkonzentration mit Fura-2 durchgeführt werden können, so dass Kultivierungs-bedingte Veränderungen wie z.B. Dedifferenzierung der Zellen und Änderungen der zellulären Proteinexpression umgangen werden und ein physiologischeres Modell zur Verfügung steht. Durch die Verwendung kleinerer Blutgefäße wie der A. tibialis wird zudem der Fokus auf Gefäße gerichtet, denen eine größere Rolle in der Blutdruckregulation zukommt als der Aorta, so dass Phänomene untersucht werden können, die für die Gesamtzirkulation des Organismus von Bedeutung sind.



Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass im Rahmen dieser Arbeit durch erstmalige Kalziummessungen an murinen VSMCs der IRAG<sup>-/-</sup>-Maus die essentielle Bedeutung des cGKIβ-Substrates IRAG für die Kalziumregulation in glatten Gefäßmuskelzellen bestätigt werden konnte und zudem eine Methode entwickelt wurde, mit der auch an frisch isolierten Gefäßmuskelzellen die Einflüsse der adrenergen- und cGMP-abhängigen Signalwege auf die zytosolische Kalziumkonzentration untersucht werden können.

# F Anhang

## I. Literaturverzeichnis

- [1] **Aicher, A., Heeschen, C., Feil, S., Hofmann, F., Mendelsohn, M.E., Feil, R. and Dimmeler, S.**, cGMP-dependent protein kinase I is crucial for angiogenesis and postnatal vasculogenesis, *PLoS ONE*, 4 (2009) e4879.
- [2] **Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. and Toro, L.**, The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo, *J Biol Chem*, 273 (1998) 32950-6.
- [3] **Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F. and Schlossmann, J.**, 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 (2001) 24153-9.
- [4] **Andrews, K.L., Triggle, C.R. and Ellis, A.**, NO and the vasculature: where does it come from and what does it do?, *Heart Fail Rev*, 7 (2002) 423-45.
- [5] **Antl, M., Von Bruhl, M.L., Eiglsperger, C., Werner, M., Konrad, I., Kocher, T., Wilm, M., Hofmann, F., Massberg, S. and Schlossmann, J.**, IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation, *Blood*, 109 (2007) 552-9.
- [6] **Bae, Y.S., Lee, T.G., Park, J.C., Hur, J.H., Kim, Y., Heo, K., Kwak, J.Y., Suh, P.G. and Ryu, S.H.**, Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity, *Mol Pharmacol*, 63 (2003) 1043-50.
- [7] **Bagayogo, I.P. and Dreyfus, C.F.**, Regulated release of BDNF by cortical oligodendrocytes is mediated through metabotropic glutamate receptors and the PLC pathway, *ASN Neuro*, 1 (2009).
- [8] **Beall, A.C., Kato, K., Goldenring, J.R., Rasmussen, H. and Brophy, C.M.**, Cyclic nucleotide-dependent vasorelaxation is associated with the phosphorylation of a small heat shock-related protein, *J Biol Chem*, 272 (1997) 11283-7.
- [9] **Beltman, J., Becker, D.E., Butt, E., Jensen, G.S., Rybalkin, S.D., Jastorff, B. and Beavo, J.A.**, Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic GMP analogs: topology of the catalytic domains, *Mol Pharmacol*, 47 (1995) 330-9.
- [10] **Bernhard, D.**, Die Funktion des cGMP-Kinase Substrates IRAG und der Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I im vaskulären System, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München* (2007).
- [11] **Biel, M. and Michalakis, S.**, Function and dysfunction of CNG channels: insights from channelopathies and mouse models, *Mol Neurobiol*, 35 (2007) 266-77.
- [12] **Birschmann, I. and Walter, U.**, Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase, *Acta Biochimica Polonica*, 51 (2004) 397-404.
- [13] **Bonnevier J, F.R., Somlyo Ap, Somlyo Av, Arner A.**, Modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice., *J Biol Chem*, 279 (2004) 5146-51.

- [14] **Brophy, C.M., Woodrum, D.A., Pollock, J., Dickinson, M., Komalavilas, P., Cornwell, T.L. and Lincoln, T.M.**, cGMP-dependent protein kinase expression restores contractile function in cultured vascular smooth muscle cells, *J Vasc Res*, 39 (2002) 95-103.
- [15] **Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L.G., Sickmann, A., Meyer, H.E., Lohmann, S.M. and Schmidt, H.H.**, Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases, *J Biol Chem*, 275 (2000) 5179-87.
- [16] **Butt, E., Immler, D., Meyer, H.E., Kotlyarov, A., Laass, K. and Gaestel, M.**, Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants, *J Biol Chem*, 276 (2001) 7108-13.
- [17] **Casteel, D.E., Boss, G.R. and Pilz, R.B.**, Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I $\beta$  and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif, *J Biol Chem*, 280 (2005) 38211-8.
- [18] **Casteel, D.E., Zhang, T., Zhuang, S. and Pilz, R.B.**, cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity, *Cell signal*, 20 (2008) 1392-9.
- [19] **Cawley, S.M., Sawyer, C.L., Brunelle, K.F., Van Der Vliet, A. and Dostmann, W.R.**, Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells, *Cell signal*, 19 (2007) 1023-33.
- [20] **Che, Z.Q., Gao, P.J., Shen, W.L., Fan, C.L., Liu, J.J. and Zhu, D.L.**, Angiotensin II-stimulated collagen synthesis in aortic adventitial fibroblasts is mediated by connective tissue growth factor, *Hypertens Res*, 31 (2008) 1233-40.
- [21] **Chen, L., Daum, G., Chitale, K., Coats, S.A., Bowen-Pope, D.F., Eigenthaler, M., Thumati, N.R., Walter, U. and Clowes, A.W.**, Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (2004) 1403-8.
- [22] **Cheng, K.T., Chan, F.L., Huang, Y., Chan, W.Y. and Yao, X.**, Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channel (CNGA2) in vascular tissues, *Histochem Cell Biol*, 120 (2003) 475-81.
- [23] **Cheng, K.T., Leung, Y.K., Shen, B., Kwok, Y.C., Wong, C.O., Kwan, H.Y., Man, Y.B., Ma, X., Huang, Y. and Yao, X.**, CNGA2 channels mediate adenosine-induced Ca<sup>2+</sup> influx in vascular endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (2008) 913-8.
- [24] **Choudhury, N., Khromov, A.S., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V.**, Telokin mediates Ca<sup>2+</sup>-desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle, *J Muscle Res Cell Motil*, 25 (2004) 657-65.
- [25] **Christensen, E.N. and Mendelsohn, M.E.**, Cyclic GMP-dependent protein kinase I $\alpha$  inhibits thrombin receptor-mediated calcium mobilization in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 281 (2006) 8409-16.
- [26] **Clapp, T.R., Medler, K.F., Damak, S., Margolskee, R.F. and Kinnamon, S.C.**, Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25, *BMC Biol*, 4 (2006) 7.
- [27] **Cohen, R.A. and Adachi, T.**, Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase, *Trends Cardiovasc Med*, 16 (2006) 109-14.

- [28] **Cohen, R.A., Weisbrod, R.M., Gericke, M., Yaghoubi, M., Bierl, C. and Bolotina, V.M.**, Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx, *Circ Res*, 84 (1999) 210-9.
- [29] **Derbyshire, E.R. and Marletta, M.A.**, Butyl isocyanide as a probe of the activation mechanism of soluble guanylate cyclase. Investigating the role of non-heme nitric oxide, *J Biol Chem*, 282 (2007) 35741-8.
- [30] **Di Cesare Mannelli, L., Nistri, S., Mazzetti, L., Bani, D., Feil, R. and Failli, P.**, Altered nitric oxide calcium responsiveness of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats depends on low expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase type I, *J Hypertens* (2009).
- [31] **Diaz Anel, A.M.**, Phospholipase C beta3 is a key component in the Gbetagamma/PKCeta/PKD-mediated regulation of trans-Golgi network to plasma membrane transport, *Biochem J*, 406 (2007) 157-65.
- [32] **Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos Y Schnitzler, M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovska, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L. and Gudermann, T.**, Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1, *Pflugers Arch*, 455 (2007) 465-77.
- [33] **Dimopoulos, G.J., Semba, S., Kitazawa, K., Eto, M. and Kitazawa, T.**, Ca<sup>2+</sup>-dependent rapid Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in arterial smooth muscle, *Circ Res*, 100 (2007) 121-9.
- [34] **Eichhorn, B. and Dobrev, D.**, Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 376 (2007) 145-55.
- [35] **Essin, K., Welling, A., Hofmann, F., Luft, F.C., Gollasch, M. and Moosmang, S.**, Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate Ca<sup>2+</sup> sparks in murine arterial smooth muscle cells, *J Physiol*, 584 (2007) 205-19.
- [36] **Evgenov, O.V., Pacher, P., Schmidt, P.M., Hasko, G., Schmidt, H.H. and Stasch, J.P.**, NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential, *Nat Rev Drug Discov*, 5 (2006) 755-68.
- [37] **Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S. and Hofmann, F.**, Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms, *Circ Res*, 90 (2002) 1080-6.
- [38] **Feil, R., Hartmann, J., Luo, C., Wolfsgruber, W., Schilling, K., Feil, S., Barski, J.J., Meyer, M., Konnerth, A., De Zeeuw, C.I. and Hofmann, F.**, Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I, *J Cell Biol*, 163 (2003) 295-302.
- [39] **Felbel, J., Trockur, B., Ecker, T., Landgraf, W. and Hofmann, F.**, Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea, *J Biol Chem*, 263 (1988) 16764-71.
- [40] **Fellner, S.K. and Arendshorst, W.**, Endothelin-A and -B receptors, superoxide, and Ca<sup>2+</sup> signaling in afferent arterioles, *Am J Physiol Renal Physiol*, 292 (2007) F175-84.
- [41] **Fioravanti, B., De Felice, M., Stucky, C.L., Medler, K.A., Luo, M.C., Gardell, L.R., Ibrahim, M., Malan, T.P., Jr., Yamamura, H.I., Ossipov, M.H., King, T., Lai, J., Porreca, F. and Vanderah, T.W.**, Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor

- is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists, *J Neurosci*, 28 (2008) 11593-602.
- [42] **Fleming, I.**, Brain in the brawn: the neuronal nitric oxide synthase as a regulator of myogenic tone, *Circ Res*, 93 (2003) 586-8.
- [43] **Fleming, I. and Busse, R.**, Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (2003) R1-12.
- [44] **Förstermann, U.**, Pharmakologie des cardiovasulären Systems - die Blutgefäße - Behandlung von Hypertonie und Hypotonie. In K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann and K. Starke (Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Vol. 9. Auflage*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2005, pp. 449-83.
- [45] **Förstermann, U. and Munzel, T.**, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, *Circulation*, 113 (2006) 1708-14.
- [46] **Francis, S.H. and Corbin, J.D.**, Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action, *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36 (1999) 275-328.
- [47] **Frei, E., Huster, M., Smital, P., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Wegener, J.W.**, Calcium-dependent and Calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2009).
- [48] **Fritsch, R.M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhöringer, A., Hofmann, F. and Allescher, H.D.**, 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 (2004) 12551-9.
- [49] **Fukao M, M.H., Britton Fc, Kenyon JI, Horowitz B, Keef Kd**, Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072, *J Biol Chem*, 274 (1999) 10927-35.
- [50] **Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y. and Shigekawa, M.**, Cyclic GMP stimulates Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture, *J Biol Chem*, 266 (1991) 12337-41.
- [51] **Gambaryan, S., Butt, E., Marcus, K., Glazova, M., Palmetshofer, A., Guillon, G. and Smolenski, A.**, cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene, *J Biol Chem*, 278 (2003) 29640-8.
- [52] **Gamm, D.M., Barthel, L.K., Raymond, P.A. and Uhler, M.D.**, Localization of cGMP-dependent protein kinase isoforms in mouse eye, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (2000) 2766-73.
- [53] **Ganitkevich, V., Hasse, V. and Pfitzer, G.**, Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent regulation of smooth muscle contraction, *J Muscle Res Cell Motil*, 23 (2002) 47-52.
- [54] **Geiselhöringer, A.**, Interaktion und Gewebeverteilung von Komponenten des cGMP-Kinase Signalweges, *Dissertation an der Technischen Universität München Institut für Pharmakologie und Toxikologie* (2002).
- [55] **Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. and Schlossmann, J.**, Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues, *FEBS Lett*, 575 (2004a) 19-22.

- [56] **Geiselhöringer, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Wörner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. and Schlossmann, J.**, IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase, *Embo J*, 23 (2004b) 4222-31.
- [57] **Görg, A. and Westermeier, R.**, *Proteinanalytik - Elektrophoretische Verfahren*, Heidelberg - Berlin, 1998, 218-52 pp.
- [58] **Gros, R., Afroze, T., You, X.M., Kabir, G., Van Wert, R., Kalair, W., Hoque, A.E., Mungrue, I.N. and Husain, M.**, Plasma membrane calcium ATPase overexpression in arterial smooth muscle increases vasomotor responsiveness and blood pressure, *Circ Res*, 93 (2003) 614-21.
- [59] **Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.**, A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem*, 260 (1985) 3440-50.
- [60] **Hartshorne Dj, H.K.**, Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase, *Mol Cell Biochem*, 190 (1999) 79-84.
- [61] **Hartshorne Dj, I.M., Erdodi F**, Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase., *J Biol Chem*, 279 (2004) 37211-4.
- [62] **Hattori, T. and Wang, P.L.**, Calcium antagonists cause dry mouth by inhibiting resting saliva secretion, *Life Sci*, 81 (2007) 683-90.
- [63] **Herring, B.P., El-Mounayri, O., Gallagher, P.J., Yin, F. and Zhou, J.**, Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues, *Am J Physiol Cell Physiol*, 291 (2006) C817-27.
- [64] **Hirano, K.**, Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle, *J Pharmacol Sci*, 104 (2007) 109-15.
- [65] **Hirano M, N.N., Hirano K, Nishimura J, Hartshorne Dj, Kanaide H**, Expression, subcellular localization, and cloning of the 130-kDa regulatory subunit of myosin phosphatase in porcine aortic endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 245 (1999) 490-6.
- [66] **Hoffmeister, M., Riha, P., Neumuller, O., Danielewski, O., Schultess, J. and Smolenski, A.P.**, Cyclic nucleotide-dependent protein kinases inhibit binding of 14-3-3 to the GTPase-activating protein Rap1GAP2 in platelets, *J Biol Chem*, 283 (2008) 2297-306.
- [67] **Hofmann, F.**, The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases, *J Biol Chem*, 280 (2005) 1-4.
- [68] **Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. and Schlossmann, J.**, Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion, *Physiol Rev*, 86 (2006) 1-23.
- [69] **Horowitz, L.F., Hirdes, W., Suh, B.C., Hilgemann, D.W., Mackie, K. and Hille, B.**, Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca<sup>2+</sup> requirement, and regulation of M current, *J Gen Physiol*, 126 (2005) 243-62.
- [70] **Hou, Y., Lascola, J., Dulin, N.O., Ye, R.D. and Browning, D.D.**, Activation of cGMP-dependent protein kinase by protein kinase C, *J Biol Chem*, 278 (2003) 16706-12.
- [71] **Hou, Y., Wong, E., Martin, J., Schoenlein, P.V., Dostmann, W.R. and Browning, D.D.**, A role for cyclic-GMP dependent protein kinase in anoikis, *Cell signal*, 18 (2006) 882-8.

- [72] **Huber, A., Neuhuber, W.L., Klugbauer, N., Ruth, P. and Allescher, H.D.**, Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle, *J Biol Chem*, 275 (2000) 5504-11.
- [73] **Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. and Hartshorne, D.J.**, Myosin phosphatase: structure, regulation and function, *Mol Cell Biochem*, 259 (2004) 197-209.
- [74] **Jaggar, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J. and Nelson, M.T.**, Calcium sparks in smooth muscle, *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 (2000) C235-56.
- [75] **Jajoo, S., Mukherjea, D., Brewer, G.J. and Ramkumar, V.**, Pertussis toxin B-oligomer suppresses human immunodeficiency virus-1 Tat-induced neuronal apoptosis through feedback inhibition of phospholipase C-beta by protein kinase C, *Neuroscience*, 151 (2008) 525-32.
- [76] **Jansen, S., Arning, J., Kemken, D., Dulcks, T. and Beyersmann, D.**, Phospholipase C activator 2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzene-sulfonamide decays under ultraviolet light and shows strong self-fluorescence, *Anal Biochem*, 330 (2004) 353-5.
- [77] **Jung, E.M., Lee, T.J., Park, J.W., Bae, Y.S., Kim, S.H., Choi, Y.H. and Kwon, T.K.**, The novel phospholipase C activator, m-3M3FBS, induces apoptosis in tumor cells through caspase activation, down-regulation of XIAP and intracellular calcium signaling, *Apoptosis*, 13 (2008) 133-45.
- [78] **Kass, D.A., Takimoto, E., Nagayama, T. and Champion, H.C.**, Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling, *Cardiovasc Res*, 75 (2007) 303-14.
- [79] **Kaupp, U.B. and Seifert, R.**, Cyclic nucleotide-gated ion channels, *Physiol Rev*, 82 (2002) 769-824.
- [80] **Kawasaki, Y., Kugimiya, F., Chikuda, H., Kamekura, S., Ikeda, T., Kawamura, N., Saito, T., Shinoda, Y., Higashikawa, A., Yano, F., Ogasawara, T., Ogata, N., Hoshi, K., Hofmann, F., Woodgett, J.R., Nakamura, K., Chung, U.I. and Kawaguchi, H.**, Phosphorylation of GSK-3beta by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes, *J Clin Invest* (2008).
- [81] **Kazerounian, S., Pitari, G.M., Ruiz-Stewart, I., Schulz, S. and Waldman, S.A.**, Nitric oxide activation of soluble guanylyl cyclase reveals high and low affinity sites that mediate allosteric inhibition by calcium, *Biochemistry*, 41 (2002) 3396-404.
- [82] **Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F.**, Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies, *Eur J Biochem*, 208 (1992) 467-73.
- [83] **Khromov, A.S., Wang, H., Choudhury, N., Mcduffie, M., Herring, B.P., Nakamoto, R., Owens, G.K., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V.**, Smooth muscle of telokin-deficient mice exhibits increased sensitivity to Ca<sup>2+</sup> and decreased cGMP-induced relaxation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 2440-5.
- [84] **Kim, B.J., Lee, J.H., Jun, J.Y., Chang, I.Y., So, I. and Kim, K.W.**, Vasoactive intestinal polypeptide inhibits pacemaker activity via the nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway in the interstitial cells of Cajal of the murine small intestine, *Mol Cells*, 21 (2006) 337-42.
- [85] **Kiselyov, K., Mignery, G.A., Zhu, M.X. and Muallem, S.**, The N-terminal domain of the IP<sub>3</sub> receptor gates store-operated hTrp<sub>3</sub> channels, *Mol Cell*, 4 (1999) 423-9.
- [86] **Kleber, H.S.D.S.W.**, Biochemisches Praktikum: Methoden für Studium, Praxis, Forschung; mit 84 Tabellen, *Gustav Fischer Verlag, Jena*, 5. Auflage (1997) 21-139.

- [87] **Kleppisch, T., Wolfsgruber, W., Feil, S., Allmann, R., Wotjak, C.T., Goebbels, S., Nave, K.A., Hofmann, F. and Feil, R.**, Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory, *J Neurosci*, 23 (2003) 6005-12.
- [88] **Koeppen, M., Feil, R., Siegl, D., Feil, S., Hofmann, F., Pohl, U. and De Wit, C.**, cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo, *Hypertension*, 44 (2004) 952-5.
- [89] **Koesling, D., Mullershausen, F., Lange, A., Friebe, A., Mergia, E., Wagner, C. and Russwurm, M.**, Negative feedback in NO/cGMP signalling, *Biochem Soc Trans*, 33 (2005) 1119-22.
- [90] **Koller, A., Schlossmann, J., Ashman, K., Uttenweiler-Joseph, S., Ruth, P. and Hofmann, F.**, Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex, *Biochem Biophys Res Commun*, 300 (2003) 155-60.
- [91] **Komalavilas, P. and Lincoln, T.M.**, Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta, *J Biol Chem*, 271 (1996) 21933-8.
- [92] **Komalavilas, P., Penn, R.B., Flynn, C.R., Thresher, J., Lopes, L.B., Furnish, E.J., Guo, M., Pallero, M.A., Murphy-Ullrich, J.E. and Brophy, C.M.**, The small heat shock-related protein, HSP20, is a cAMP-dependent protein kinase substrate that is involved in airway smooth muscle relaxation, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294 (2008) L69-78.
- [93] **Kong, H., Jones, P.P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H.J. and Chen, S.R.**, Caffeine induces Ca<sup>2+</sup> release by reducing the threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of the ryanodine receptor, *Biochem J*, 414 (2008) 441-52.
- [94] **Krizanova O, O.K.**, The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor--transcriptional regulation and modulation by phosphorylation, *Gen Physiol Biophys*, 22 (2003) 295-311.
- [95] **Krjukova, J., Holmqvist, T., Danis, A.S., Akerman, K.E. and Kukkonen, J.P.**, Phospholipase C activator m-3M3FBS affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis independently of phospholipase C activation, *Br J Pharmacol*, 143 (2004) 3-7.
- [96] **Kubes, P., Suzuki, M. and Granger, D.N.**, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (1991) 4651-5.
- [97] **Kusumawidjaja, G., Kayed, H., Giese, N., Bauer, A., Erkan, M., Giese, T., Hoheise, J.D., Friess, H. and Kleeff, J.**, Basic transcription factor 3 (BTF3) regulates transcription of tumor-associated genes in pancreatic cancer cells, *Cancer Biol Ther*, 6 (2007) 367-76.
- [98] **Kwan, H.Y., Huang, Y. and Yao, X.**, Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 2625-30.
- [99] **Kwan, H.Y., Huang, Y. and Yao, X.**, Protein kinase C can inhibit TRPC3 channels indirectly via stimulating protein kinase G, *J Cell Physiol*, 207 (2006) 315-21.
- [100] **Kwon, I.K., Schoenlein, P.V., Delk, J., Liu, K., Thangaraju, M., Dulin, N.O., Ganapathy, V., Berger, F.G. and Browning, D.D.**, Expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in metastatic colon carcinoma cells blocks tumor angiogenesis, *Cancer*, 112 (2008) 1462-70.



- [101] **Laemmli, U.K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-5.
- [102] **Lalli, M.J., Shimizu, S., Sutliff, R.L., Kranias, E.G. and Paul, R.J.**,  $[Ca^{2+}]_i$  homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice, *Am J Physiol*, 277 (1999) H963-70.
- [103] **Latorre, R. and Brauchi, S.**, Large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (BK) channel: activation by  $Ca^{2+}$  and voltage, *Biol Res*, 39 (2006) 385-401.
- [104] **Lee, Y.N., Lee, H.Y., Kim, J.S., Park, C., Choi, Y.H., Lee, T.G., Ryu, S.H., Kwak, J.Y. and Bae, Y.S.**, The novel phospholipase C activator, m-3M3FBS, induces monocytic leukemia cell apoptosis, *Cancer Lett*, 222 (2005) 227-35.
- [105] **Leung, F.P., Yung, L.M., Yao, X., Laher, I. and Huang, Y.**, Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle, *Br J Pharmacol*, 153 (2008) 846-57.
- [106] **Li, L., Hutchins, B.I. and Kalil, K.**, Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms, *J Neurosci*, 29 (2009) 5873-83.
- [107] **Li, Z., Zhang, G., Feil, R., Han, J. and Du, X.**, Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin  $\alpha IIb \beta 3$ , *Blood*, 107 (2006) 965-72.
- [108] **Li, Z., Zhang, G., Marjanovic, J.A., Ruan, C. and Du, X.**, A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem*, 279 (2004) 42469-75.
- [109] **Lin, C.H., Liu, M.C., Lin, M.S., Lin, P.L., Chen, Y.H., Chen, C.T., Chen, I.M. and Tsai, M.C.**, Effects of a new isoquinolinone derivative on induction of action potential bursts in central snail neuron, *Pharmacology*, 75 (2005) 98-110.
- [110] **Lincoln, T.M.**, Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions?, *Circ Res*, 100 (2007) 10-2.
- [111] **Liu, V.W. and Huang, P.L.**, Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice, *Cardiovasc Res*, 77 (2008) 19-29.
- [112] **Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. and De Jonge, H.R.**, Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases, *Trends Biochem Sci*, 22 (1997) 307-12.
- [113] **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265-75.
- [114] **Lu, R., Alioua, A., Kumar, Y., Eghbali, M., Stefani, E. and Toro, L.**, MaxiK channel partners: physiological impact, *J Physiol*, 570 (2006) 65-72.
- [115] **Lukowski, R., Weinmeister, P., Bernhard, D., Feil, S., Gotthardt, M., Herz, J., Massberg, S., Zerneck, A., Weber, C., Hofmann, F. and Feil, R.**, Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (2008) 1244-50.
- [116] **Macmillan-Crow, L.A. and Lincoln, T.M.**, High-affinity binding and localization of the cyclic GMP-dependent protein kinase with the intermediate filament protein vimentin, *Biochemistry*, 33 (1994) 8035-43.
- [117] **Markert, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H.R., Jarchau, T. and Lohmann, S.M.**, Endogenous expression of type II

- cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J Clin Invest*, 96 (1995) 822-30.
- [118] **Martinez, S.E., Beavo, J.A. and Hol, W.G.**, GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides, *Mol Interv*, 2 (2002) 317-23.
- [119] **Massberg, S., Gruner, S., Konrad, I., Garcia Arguinzonis, M.I., Eigenthaler, M., Hemler, K., Kersting, J., Schulz, C., Muller, I., Besta, F., Nieswandt, B., Heinzmann, U., Walter, U. and Gawaz, M.**, Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice, *Blood*, 103 (2004) 136-42.
- [120] **Matchkov, V.V., Aalkjaer, C. and Nilsson, H.**, A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth-muscle cells from rat mesenteric resistance arteries, *J Gen Physiol*, 123 (2004) 121-34.
- [121] **McNally, J.S., Saxena, A., Cai, H., Dikalov, S. and Harrison, D.G.**, Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005) 1623-8.
- [122] **Mehta, D., Ahmmed, G.U., Paria, B.C., Holinstat, M., Voyno-Yasenetskaya, T., Tiruppathi, C., Minshall, R.D. and Malik, A.B.**, RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca<sup>2+</sup> entry. Role in signaling increased endothelial permeability, *J Biol Chem*, 278 (2003) 33492-500.
- [123] **Meinecke, M., Geiger, J., Butt, E., Sandberg, M., Jahnsen, T., Chakraborty, T., Walter, U., Jarchau, T. and Lohmann, S.M.**, 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 (1994) 283-90.
- [124] **Mendizabal, V.E., Poblete, I., Lomniczi, A., Rettori, V., Huidobro-Toro, J.P. and Adler-Graschinsky, E.**, Nitric oxide synthase-independent release of nitric oxide induced by KCl in the perfused mesenteric bed of the rat, *Eur J Pharmacol*, 409 (2000) 85-91.
- [125] **Mitchell, J.A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L. and Harrington, L.S.**, Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium, *Exp Physiol*, 93 (2008) 141-7.
- [126] **Miyazawa, T., Ogawa, Y., Chusho, H., Yasoda, A., Tamura, N., Komatsu, Y., Pfeifer, A., Hofmann, F. and Nakao, K.**, Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification, *Endocrinology*, 143 (2002) 3604-10.
- [127] **Moncada, S. and Higgs, E.A.**, The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1 (2006) S193-201.
- [128] **Murthy, K.S. and Zhou, H.**, Selective phosphorylation of the IP<sub>3</sub>R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284 (2003) G221-30.
- [129] **Nakamura, K., Koga, Y., Sakai, H., Homma, K. and Ikebe, M.**, cGMP-dependent relaxation of smooth muscle is coupled with the change in the phosphorylation of myosin phosphatase, *Circ Res*, 101 (2007) 712-22.
- [130] **Nam, J.H., Lee, H.S., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Lee, S.W., Kim, H.Y., Kim, S.J. and Earm, Y.E.**, Mechanosensitive activation of K<sup>+</sup> channel via phospholipase C-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in B lymphocytes, *J Physiol*, 582 (2007) 977-90.

- [131] **Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J. and Lederer, W.J.**, Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks, *Science*, 270 (1995) 633-7.
- [132] **Nikolaev, V.O., Gambaryan, S., Engelhardt, S., Walter, U. and Lohse, M.J.**, Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis, *J Biol Chem*, 280 (2005) 1716-9.
- [133] **Nishimura, J.**, Topics on the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in the vasodilator-induced vasorelaxation, *J Pharmacol Sci*, 102 (2006) 27-31.
- [134] **Obst, M., Tank, J., Plehm, R., Blumer, K.J., Diedrich, A., Jordan, J., Luft, F.C. and Gross, V.**, NO-dependent blood pressure regulation in RGS2-deficient mice, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290 (2006) R1012-9.
- [135] **Omori, K. and Kotera, J.**, Overview of PDEs and their regulation, *Circ Res*, 100 (2007) 309-27.
- [136] **Osei-Owusu, P., Sun, X., Drenan, R.M., Steinberg, T.H. and Blumer, K.J.**, Regulation of RGS2 and second messenger signaling in vascular smooth muscle cells by cGMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem*, 282 (2007) 31656-65.
- [137] **Paul, C., Schoberl, F., Weinmeister, P., Micale, V., Wotjak, C.T., Hofmann, F. and Kleppisch, T.**, Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation, *J Neurosci*, 28 (2008) 14202-12.
- [138] **Persson, K., Pandita, R.K., Aszodi, A., Ahmad, M., Pfeifer, A., Fassler, R. and Andersson, K.E.**, Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279 (2000) R1112-20.
- [139] **Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. and Fassler, R.**, Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II, *Science*, 274 (1996) 2082-6.
- [140] **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.**, Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice, *Embo J*, 17 (1998) 3045-51.
- [141] **Pfeifer, A., Nurnberg, B., Kamm, S., Uhde, M., Schultz, G., Ruth, P. and Hofmann, F.**, Cyclic GMP-dependent protein kinase blocks pertussis toxin-sensitive hormone receptor signaling pathways in Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem*, 270 (1995) 9052-9.
- [142] **Porter, V.A., Bonev, A.D., Knot, H.J., Heppner, T.J., Stevenson, A.S., Kleppisch, T., Lederer, W.J. and Nelson, M.T.**, Frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides, *Am J Physiol*, 274 (1998) C1346-55.
- [143] **Potter, L.R., Abbey-Hosch, S. and Dickey, D.M.**, Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocr Rev*, 27 (2006) 47-72.
- [144] **Poulos, T.L.**, Soluble guanylate cyclase, *Curr Opin Struct Biol*, 16 (2006) 736-43.

- [145] **Pyriochou, A., Vassilakopoulos, T., Zhou, Z. and Papapetropoulos, A.**, cGMP-dependent and -independent angiogenesis-related properties of nitric oxide, *Life Sci*, 81 (2007a) 1549-54.
- [146] **Pyriochou, A., Zhou, Z., Koika, V., Petrou, C., Cordopatis, P., Sessa, W.C. and Papapetropoulos, A.**, The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway, *J Cell Physiol*, 211 (2007b) 197-204.
- [147] **Raeymaekers, L., Hofmann, F. and Casteels, R.**, Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle, *Biochem J*, 252 (1988) 269-73.
- [148] **Rao, J.N., Liu, L., Zou, T., Marasa, B.S., Boneva, D., Wang, S.R., Malone, D.L., Turner, D.J. and Wang, J.Y.**, Polyamines are required for phospholipase C-gamma1 expression promoting intestinal epithelial restitution after wounding, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292 (2007) G335-43.
- [149] **Reid, H.M. and Kinsella, B.T.**, The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for nitric oxide-mediated desensitization. Independent modulation of Tp alpha signaling by nitric oxide and prostacyclin, *J Biol Chem*, 278 (2003) 51190-202.
- [150] **Rembold, C.M., Foster, D.B., Strauss, J.D., Wingard, C.J. and Eyk, J.E.**, cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid artery, *J Physiol*, 524 Pt 3 (2000) 865-78.
- [151] **Russwurm, M. and Koesling, D.**, NO activation of guanylyl cyclase, *Embo J*, 23 (2004) 4443-50.
- [152] **Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. and Hofmann, F.**, 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 (1993) 2623-7.
- [153] **Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Feil, R., Hofmann, F. and Beavo, J.A.**, Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 277 (2002) 3310-7.
- [154] **Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E. and Beavo, J.A.**, Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function, *Circ Res*, 93 (2003) 280-91.
- [155] **Salinthon, S., Tyagi, M. and Gerthoffer, W.T.**, Small heat shock proteins in smooth muscle, *Pharmacol Ther*, 119 (2008) 44-54.
- [156] **Sanders, K.M.**, Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles, *J Appl Physiol*, 91 (2001) 1438-49.
- [157] **Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X.B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C.A., Abdullah, U., Krippeit-Drews, P., Feil, R., Hofmann, F., Knaus, H.G., Kenyon, C., Shipston, M.J., Storm, J.F., Neuhuber, W., Korth, M., Schubert, R., Gollasch, M. and Ruth, P.**, Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice, *Circulation*, 112 (2005) 60-8.
- [158] **Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. and Hofmann, F.**, Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation, *Circ Res*, 87 (2000) 825-30.

- [159] **Sausbier, M., Zhou, X.B., Beier, C., Sausbier, U., Wolpers, D., Maget, S., Martin, C., Dietrich, A., Ressmeyer, A.R., Renz, H., Schlossmann, J., Hofmann, F., Neuhuber, W., Gudermann, T., Uhlig, S., Korth, M. and Ruth, P.**, Reduced rather than enhanced cholinergic airway constriction in mice with ablation of the large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, *FASEB J*, 21 (2007) 812-22.
- [160] **Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. and Loirand, G.**, Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle, *J Biol Chem*, 275 (2000) 21722-9.
- [161] **Schleicher, M. and Sessa, W.C.**, Are the mechanisms for NO-dependent vascular remodeling different from vasorelaxation in vivo?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (2008) 1207-8.
- [162] **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.**, Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ , *Nature*, 404 (2000) 197-201.
- [163] **Schmidt, H., Werner, M., Heppenstall, P.A., Henning, M., More, M.I., Kuhbandner, S., Lewin, G.R., Hofmann, F., Feil, R. and Rathjen, F.G.**, cGMP-mediated signaling via cGKI $\alpha$  is required for the guidance and connectivity of sensory axons, *J Cell Biol*, 159 (2002) 489-98.
- [164] **Schmidtke, A., Gao, W., Sausbier, M., Rauhmeier, I., Sausbier, U., Niederberger, E., Scholich, K., Huber, A., Neuhuber, W., Allescher, H.D., Hofmann, F., Tegeder, I., Ruth, P. and Geisslinger, G.**, Cysteine-rich protein 2, a novel downstream effector of cGMP/cGMP-dependent protein kinase I-mediated persistent inflammatory pain, *J Neurosci*, 28 (2008) 1320-30.
- [165] **Schröder, F., Klein, G., Fiedler, B., Bastein, M., Schnasse, N., Hillmer, A., Ames, S., Gambaryan, S., Drexler, H., Walter, U., Lohmann, S.M. and Wollert, K.C.**, Single L-type Ca(2+) channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKG I transgenic mice, *Cardiovasc Res*, 60 (2003) 268-77.
- [166] **Schütz, W. and Eschenhagen, T.**, Pharmakologie des kardiovaskulären Systems - das Herz. In K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann and K. Starke (Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Vol. 9. Auflage*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2005, pp. 401-48.
- [167] **Sharma, A.K., Zhou, G.P., Kupferman, J., Surks, H.K., Christensen, E.N., Chou, J.J., Mendelsohn, M.E. and Rigby, A.C.**, Probing the interaction between the coiled coil leucine zipper of cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$  and the C terminus of the myosin binding subunit of the myosin light chain phosphatase., *J Biol Chem*, 283 (2008) 32860-9.
- [168] **Shaughnessy, J.D., Jr., Largaespada, D.A., Tian, E., Fletcher, C.F., Cho, B.C., Vyas, P., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G.**, Mrvi1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1, *Oncogene*, 18 (1999) 2069-84.
- [169] **Sigl, K.**, Regulation des zytosolischen Kalziums durch IRAG, *Dissertation an der Technischen Universität München Institut für Pharmakologie und Toxikologie* (2004).
- [170] **Smith, J.A., Reed, R.B., Francis, S.H., Grimes, K. and Corbin, J.D.**, Distinguishing the roles of the two different cGMP-binding sites for modulating phosphorylation of

- exogenous substrate (heterophosphorylation) and autophosphorylation of cGMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem*, 275 (2000) 154-8.
- [171] **Smolenski, A., Burkhardt, A.M., Eigenthaler, M., Butt, E., Gambaryan, S., Lohmann, S.M. and Walter, U.**, Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 358 (1998) 134-9.
- [172] **Soh, J.W., Kazi, J.U., Li, H., Thompson, W.J. and Weinstein, I.B.**, Celecoxib-induced growth inhibition in SW480 colon cancer cells is associated with activation of protein kinase G, *Mol Carcinog*, 47 (2008) 519-25.
- [173] **Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V.**, Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase, *Physiol Rev*, 83 (2003) 1325-58.
- [174] **Spießberger, B.**, Renovaskuläre Analyse von IRAG, *Diplomarbeit. Angefertigt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München* (2007).
- [175] **Spiessberger, B., Bernhard, D., Herrmann, S., Feil, S., Werner, C., Lupp, P.B. and Hofmann, F.**, cGMP-dependent protein kinase II and aldosterone secretion, *Febs J*, 276 (2009) 1007-13.
- [176] **Starke, K.**, Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme - Pharmakotherapie des Asthma bronchiale - Doping. In K. Aktories, U. Förstermann, H. F. and K. Starke (Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Vol. 9. Auflage*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2005, pp. 173-211.
- [177] **Stasch, J.P., Schmidt, P.M., Nedvetsky, P.I., Nedvetskaya, T.Y., H, S.A., Meurer, S., Deile, M., Taye, A., Knorr, A., Lapp, H., Müller, H., Turgay, Y., Rothkegel, C., Tersteegen, A., Kemp-Harper, B., Müller-Esterl, W. and Schmidt, H.H.**, Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels, *J Clin Invest*, 116 (2006) 2552-61.
- [178] **Stevens, T., Phan, S., Frid, M.G., Alvarez, D., Herzog, E. and Stenmark, K.R.**, Lung vascular cell heterogeneity: endothelium, smooth muscle, and fibroblasts, *Proc Am Thorac Soc*, 5 (2008) 783-91.
- [179] **Sugiura, T., Nakanishi, H. and Roberts, J.D., Jr.**, Proteolytic processing of cGMP-dependent protein kinase I mediates nuclear cGMP signaling in vascular smooth muscle cells, *Circ Res*, 103 (2008) 53-60.
- [180] **Sun, X., Kaltenbronn, K.M., Steinberg, T.H. and Blumer, K.J.**, RGS2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling, *Mol Pharmacol*, 67 (2005) 631-9.
- [181] **Surks, H.K.**, cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms, *Circ Res*, 101 (2007) 1078-80.
- [182] **Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M. and Mendelsohn, M.E.**, Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$ , *Science*, 286 (1999) 1583-7.
- [183] **Swayze, R.D. and Braun, A.P.**, A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K<sup>+</sup> channels by sodium nitroprusside and cGMP, *J Biol Chem*, 276 (2001) 19729-37.

- [184] **Tai, K., Hamaide, M.C., Debaix, H., Gailly, P., Wibo, M. and Morel, N.**, Agonist-evoked calcium entry in vascular smooth muscle cells requires IP<sub>3</sub> receptor-mediated activation of TRPC1, *Eur J Pharmacol*, 583 (2008) 135-47.
- [185] **Takahashi, S., Lin, H., Geshi, N., Mori, Y., Kawarabayashi, Y., Takami, N., Mori, M.X., Honda, A. and Inoue, R.**, Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6, *J Physiol*, 586 (2008) 4209-23.
- [186] **Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. and Mendelsohn, M.E.**, Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure, *Nat Med*, 9 (2003) 1506-12.
- [187] **Tertyshnikova, S. and Fein, A.**, Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 1613-7.
- [188] **Tewari, K. and Simard, J.M.**, Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca<sup>2+</sup> channel availability in basilar artery smooth muscle cells, *Pflugers Arch*, 433 (1997) 304-11.
- [189] **Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M. and De Jonge, H.R.**, Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 1466-71.
- [190] **Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. and Kurtz, A.**, Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression, *J Clin Invest*, 102 (1998) 1576-82.
- [191] **Wagner, L.E., 2nd, Li, W.H. and Yule, D.I.**, Phosphorylation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cyclic nucleotide-dependent protein kinases: a mutational analysis of the functionally important sites in the S2<sup>+</sup> and S2<sup>-</sup> splice variants, *J Biol Chem*, 278 (2003) 45811-7.
- [192] **Wagner, L.E., Joseph, S.K. and Yule, D.I.**, Regulation of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel activity by protein kinase A phosphorylation, *J Physiol* (2008).
- [193] **Waldkirch, E., Uckert, S., Sigl, K., Imkamp, F., Langnaese, K., Richter, K., Jonas, U., Sohn, M., Stief, C., Wolf, G. and Hedlund, P.**, Expression and distribution of cyclic GMP-dependent protein kinase-1 isoforms in human penile erectile tissue, *J Sex Med*, 5 (2008) 536-43.
- [194] **Wall, M.E., Francis, S.H., Corbin, J.D., Grimes, K., Richie-Jannetta, R., Kotera, J., Macdonald, B.A., Gibson, R.R. and Trewhella, J.**, Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 2380-5.
- [195] **Wang, G.R., Zhu, Y., Halushka, P.V., Lincoln, T.M. and Mendelsohn, M.E.**, Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 4888-93.
- [196] **Wang, X., Pluznick, J.L., Settles, D.C. and Sansom, S.C.**, Association of VASP with TRPC4 in PKG-mediated inhibition of the store-operated calcium response in mesangial cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, 293 (2007) F1768-76.

- [197] **Webb, R.C.**, Smooth muscle contraction and relaxation, *Adv Physiol Educ*, 27 (2003) 201-6.
- [198] **Weber, S., Bernhard, D., Lukowski, R., Weinmeister, P., Wörner, R., Wegener, J.W., Valtcheva, N., Feil, S., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Feil, R.**, Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme, *Circ Res*, 101 (2007) 1096-103.
- [199] **Wegener, J.W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F. and Feil, R.**, cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium, *Circ Res*, 90 (2002) 18-20.
- [200] **Weinmeister, P., Lukowski, R., Linder, S., Traidl-Hoffmann, C., Hengst, L., Hofmann, F. and Feil, R.**, cGMP-dependent Protein Kinase I Promotes Adhesion of Primary Vascular Smooth Muscle Cells, *Mol Biol Cell* (2008).
- [201] **Werner, C., Raivich, G., Cowen, M., Strekalova, T., Sillaber, I., Buters, J.T., Spanagel, R. and Hofmann, F.**, Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol, *Eur J Neurosci*, 20 (2004) 3498-506.
- [202] **Werner, M.E., Meredith, A.L., Aldrich, R.W. and Nelson, M.T.**, Hypercontractility and impaired sildenafil relaxations in the BKCa channel deletion model of erectile dysfunction, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295 (2008) R181-8.
- [203] **Wolfe, L., Corbin, J.D. and Francis, S.H.**, Characterization of a novel isozyme of cGMP-dependent protein kinase from bovine aorta, *J Biol Chem*, 264 (1989) 7734-41.
- [204] **Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F. and Feil, R.**, A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 13519-24.
- [205] **Wooldridge, A.A., Macdonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hartshorne, D.J. and Haystead, T.A.**, Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides, *J Biol Chem*, 279 (2004) 34496-504.
- [206] **Wörner, R.**, Mechanismen der cGMP-induzierten Relaxation der Mauseaorta, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München* (2006).
- [207] **Wörner, R., Lukowski, R., Hofmann, F. and Wegener, J.W.**, cGMP signals mainly through cAMP kinase in permeabilized murine aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292 (2007) H237-44.
- [208] **Worthington, B.C.**, Collagenase. *Worthington Enzyme Manual*, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, 1993.
- [209] **Xi, Q., Adebisi, A., Zhao, G., Chapman, K.E., Waters, C.M., Hassid, A. and Jaggar, J.H.**, IP<sub>3</sub> constricts cerebral arteries via IP<sub>3</sub> receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release, *Circ Res*, 102 (2008) 1118-26.
- [210] **Xia, C., Bao, Z., Yue, C., Sanborn, B.M. and Liu, M.**, Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases, *J Biol Chem*, 276 (2001) 19770-7.
- [211] **Xu, H.L., Gavriluk, V., Wolde, H.M., Baughman, V.L. and Pelligrino, D.A.**, Regulation of rat pial arteriolar smooth muscle relaxation in vivo through multidrug



- resistance protein 5-mediated cGMP efflux, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (2004) H2020-7.
- [212] **Xu, X., Star, R.A., Tortorici, G. and Muallem, S.**, Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca<sup>2+</sup> influx, *J Biol Chem*, 269 (1994) 12645-53.
- [213] **Yamahara, K., Itoh, H., Chun, T.H., Ogawa, Y., Yamashita, J., Sawada, N., Fukunaga, Y., Sone, M., Yurugi-Kobayashi, T., Miyashita, K., Tsujimoto, H., Kook, H., Feil, R., Garbers, D.L., Hofmann, F. and Nakao, K.**, Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 3404-9.
- [214] **Yoshida, Y., Toyosato, A., Islam, M.O., Koga, T., Fujita, S. and Imai, S.**, Stimulation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> -pump ATPase of vascular smooth muscle by cGMP-dependent protein kinase: functional reconstitution with purified proteins, *Mol Cell Biochem*, 190 (1999) 157-67.
- [215] **Yuan, J.P., Kiselyov, K., Shin, D.M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S.H., Dehoff, M.H., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Muallem, S. and Worley, P.F.**, Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP<sub>3</sub> receptors, *Cell*, 114 (2003) 777-89.
- [216] **Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F. and Muallem, S.**, STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels, *Nat Cell Biol*, 9 (2007) 636-45.
- [217] **Yuasa, K., Michibata, H., Omori, K. and Yanaka, N.**, A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T, *J Biol Chem*, 274 (1999) 37429-34.
- [218] **Yuasa, K., Omori, K. and Yanaka, N.**, Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase Ialpha, *J Biol Chem*, 275 (2000) 4897-905.
- [219] **Zhang, B. and Ma, J.X.**, SERPINA3K prevents oxidative stress induced necrotic cell death by inhibiting calcium overload, *PLoS One*, 3 (2008) e4077.
- [220] **Zhang, T., Zhuang, S., Casteel, D.E., Looney, D.J., Boss, G.R. and Pilz, R.B.**, A cysteine-rich LIM-only protein mediates regulation of smooth muscle-specific gene expression by cGMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem*, 282 (2007) 33367-80.
- [221] **Zhou, H., Nakamura, T., Matsumoto, N., Hisatsune, C., Mizutani, A., Iesaki, T., Daida, H. and Mikoshiba, K.**, Predominant role of type 1 IP<sub>3</sub> receptor in aortic vascular muscle contraction, *Biochem Biophys Res Commun*, 369 (2008a) 213-9.
- [222] **Zhou, Z., Sayed, N., Pyriochou, A., Roussos, C., Fulton, D., Beuve, A. and Papapetropoulos, A.**, Protein kinase g phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (2008b) 1803-10.
- [223] **Zhuang, D., Ceacareanu, A.C., Ceacareanu, B. and Hassid, A.**, Essential role of protein kinase G and decreased cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> levels in NO-induced inhibition of rat aortic smooth muscle cell motility, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288 (2005) H1859-66.
- [224] **Zhuang, D., Pu, Q., Ceacareanu, B., Chang, Y., Dixit, M. and Hassid, A.**, Chronic insulin treatment amplifies PDGF-induced motility in differentiated aortic smooth muscle cells by suppressing the expression and function of PTP1B, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2008).

## **II. Danksagung**

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. J. Schlossmann für die interessante Themenstellung und die umfassende Betreuung und Diskussionsbereitschaft während der Entstehung dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanke ich mich zudem bei Herrn Prof. F. Hofmann, dass ich diese Arbeit an seinem Institut durchführen konnte, seine spontane Hilfsbereitschaft und für die Impulse, die er mir für die Arbeit gab.

Ein besonderes Dankeschön gebührt außerdem Frau Dr. K. Sigl für die intensive Betreuung in allen Phasen der Entstehung der vorliegenden Arbeit und die Überlassung ihrer Westernblot-Ergebnisse.

Frau Beate Spießberger und Herrn Dr. Pascal Weinmeister bin ich äußerst dankbar für die unschätzbare Unterstützung bei der Laborarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch für viele interessante Diskussionen, Anregungen und Tipps bei Herrn Dr. Dominik Bernhard, Herrn Dr. Robert Lukowski, Frau Dr. Maria Huster, Herrn PD Dr. Jörg Wegener, Frau Dr. Veronika Leiss, Herrn PD Dr. S. Moosmang, Frau PD Dr. A. Welling, Frau Elisabeth Schinner und Frau Meike Miller.

Herzlichen Dank schulde ich meiner Familie für ihre große Unterstützung weit über meine Ausbildung hinaus.