

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund.....	1
1.2	Kalzium und seine Aufgaben	2
1.3	Die kalmodulinabhängige Plasmamembran-Kalzium-ATPase.....	4
1.3.1	Nomenklatur	4
1.3.2	Gene	4
1.3.3	Struktur	5
1.3.4	Gewebeverteilung während der Entwicklung und im adulten Organismus.....	7
1.3.5	Funktion der einzelnen Domänen	8
1.3.6	Alternatives Splicing.....	9
1.3.6.1	Regulation des Splicing	9
1.3.6.2	Splice-Stelle A	9
1.3.6.3	Splice-Stelle B	10
1.3.6.4	Splice-Stelle C	10
1.3.7	Lokalisation der PMCA in der Zelle.....	13
1.4	Erstellung einer transgenen Mauslinie	14
1.4.1	Transgen und Promotor.....	14
1.4.2	Generierung der transgenen Mauslinie	15
1.5	Die NO-Synthase	15
2	Fragestellung	17
3	Methoden	18
3.1	Nachweis des Transgens auf Ebene der Erbsubstanz	18
3.1.1	Gewinnung von DNA	18
3.1.2	Photometrische Mengenbestimmung.....	18
3.1.3	Erstellung einer radioaktiv markierten Sonde.....	18
3.1.4	Southern-Blot-Analyse	20
3.2	Nachweis des Transgens auf Ebene der RNA.....	22
3.2.1	Isolierung von RNA aus Gewebe	22
3.2.2	Analyse mittels RT-PCR	23
3.3	Nachweis der Translationsprodukte des Transgens	24
3.3.1	Analyse der Proteine in Gewebelysaten	24
3.3.1.1	Isolierung von Proteinextrakten aus Gewebe	24
3.3.1.2	Messung der erzielten Proteinkonzentrationen.....	25
3.3.1.3	Anreicherung kalmodulinbindender Proteine.....	25
3.3.1.4	Western-Blot-Analyse	26
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen	28
3.3.2.1	Herstellung von Gefrierschnitten.....	28
3.3.2.2	Färbung der Gewebeschnitte	28
3.3.3	Nachweis der physikalischen Interaktion zweier Proteine	29
3.3.3.1	Gewinnung von Proteinextrakten	29
3.3.3.2	Kopräzipitation zweier Proteine	30
3.4	Funktionelle Versuche an isolierten Aortenringen	30
3.4.1	Gewinnung der Aortenringe	30
3.4.2	Kontraktions- bzw. Relaxationsversuche.....	31
3.4.3	Statistische Auswertung.....	32
4	Ergebnisse.....	33

4.1 Nachweis des integrierten Transgen	33
4.2 Nachweis der Transkription des Transgens	33
4.3 Nachweis des Translationsprodukts	35
4.3.1 Proteinnachweis aus Zellextrakten	35
4.3.2 Lokalisationsnachweis der PMCA in glatten Gefäßmuskelzellen	36
4.3.3 Nachweis der physikalischen Interaktion von PMCA und nNOS	39
4.4 Funktionelle Untersuchungen an isolierten Aortenringen	40
4.4.1 Endothelabhängige Relaxation	40
4.4.2 Endothelunabhängige Relaxation	41
4.4.3 Kontraktion in KCl-Lösung	41
5 Diskussion	46
5.1 Das transgene Modell	46
5.2 Transgen und Promotor	47
5.3 Lokalisation der PMCA in der Zelle	49
5.4 PMCA und NOS	50
5.5 Regulation des Gefäßmuskeltonus bei hPMCA4b-überexprimierenden Mäusen	50
5.5.1 Die relevanten Proteine in der Muskelzelle	50
5.5.2 Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen	52
6 Zusammenfassung	55
7 Literaturverzeichnis	57
8 Anhang	65
Abkürzungsverzeichnis	65
Lösungen und Puffer	65
Chemikalien, Fertigkits	67
Gerätschaften, Materialien	68

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Der arterielle Blutdruck wird durch den totalen peripheren Widerstand und das Flussvolumen definiert. Dabei entspricht der mittlere Blutdruck dem Produkt dieser beiden Größen (Flussvolumen ausgedrückt als Herzsekundenvolumen). Der wichtigere Parameter ist dabei der durch den Gefäßmuskeltonus definierte totale periphere Widerstand. Nach dem Gesetz von Poiseuille, das näherungsweise zur Berechnung des Mitteldrucks verwendet werden kann, ist dieser abhängig von der vierten Potenz des Gefäßradius. Neben diesen beiden Faktoren hat auch das intravasale Blutvolumen und dessen Regulation durch die Ausscheidung über die Nieren Einfluss auf den Blutdruck. Dieser Parameter ist vor allem bei jungen Hypertonikern von Bedeutung. Dagegen tritt nach länger bestehender Hochdruckkrankheit der Einfluss des totalen peripheren Widerstands durch Adaptions- und Gegenregulationsvorgänge gegen das erhöhte Herzzeitvolumen und konsekutiv stattfindende Umbauvorgänge der Gefäßwand zunehmend in den Vordergrund [1-6]. Eine Sonderform stellt dabei der beim alten Patienten auftretende systolische Bluthochdruck dar, der durch eine Abnahme der elastischen Windkesselfunktion der Aorta entsteht (siehe Lehrbücher der Pathophysiologie).

Laut WHO-Kriterien besteht eine arterielle Hypertonie ab Blutdruckwerten von systolisch/diastolisch 140/90 (WHO, Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks e.V. – Deutsche Hypertoniegesellschaft 1999), während Werte über systolisch/diastolisch 129/84 als hochnormal angesehen werden. Über 90% der diagnostizierten Hypertoniefälle werden als essentiell klassifiziert, d.h. eine Ursache ist nicht bekannt. Noch nicht näher definierte genetische Ursachen spielen dabei eine Rolle, wie aus der Zwillingforschung bekannt ist [7]. Diskutiert werden Faktoren wie eine gestörte Natrium- und H₂O-Ausscheidung über die Nieren, veränderte sympathische Aktivität sowie Veränderungen im Renin-Angiotensinsystem. Auch Umweltfaktoren wie erhöhter Streß oder fehlende körperliche Aktivität prädisponieren zur Manifestation einer arteriellen Hypertonie (Übersicht in Harrison, „Principles of Internal Medicine“, 15th Edition S. 1414-1417; Lehrbücher der Inneren Medizin).

Häufig bietet sich bei Hypertonikern eine komplexe Symptomkombination, das sogenannte metabolische Syndrom, das durch arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie, gestörte Glukosetoleranz, abdominelle Adipositas und Hyperurikämie charakterisiert ist [8]. Man geht heute von einer multifaktoriellen Genese der Bluthochdruckkrankheit aus. Insgesamt können nur weniger als 10% aller Hypertoniker als sekundäre Hypertoniker klassifiziert und so einer ursächlichen Therapie zugeführt werden [9, 10].

Arterielle Hypertonie ist ein wesentlicher Risikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen, die in den Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken der westlichen Länder die vorderen Plätze einnehmen [11-13]. Dazu gehören Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz sowie die zerebrale Ischämie. Die Bluthochdruckerkrankung stellt somit neben den Leiden, die sie für den Betroffenen mit sich bringt, auch aus volkswirtschaftlicher Sicht eine relevante Größe dar. Diese Tatsachen machen es erforderlich, sich intensiv mit möglichen Einflussgrößen auf die Entstehung einer Hypertonie zu beschäftigen.

Das Gefäßsystem des menschlichen Organismus stellt ein geschlossenes System dar. Alle Gefäße mit Ausnahme der Kapillaren weisen einen dreischichtigen Aufbau auf (Intima, Media, Adventitia). Die glatten Gefäßmuskulzellen liegen dabei in der Media und bestimmen zusammen mit den elastischen und kollagenen Fasernetzen das mechanische Verhalten der Gefäßwand und damit den für die Höhe des Blutdrucks ausschlaggebenden peripheren Widerstand.

1.2 Kalzium und seine Aufgaben

Das Kalziumion ist ein wichtiger Bestandteil des intra- und extrazellulären Milieus. Dabei findet sich eine physiologische Kalziumkonzentration von $2,20-2,65 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ im Serum. Kalzium liegt zu etwa gleichen Teilen als freies Ion bzw. gebunden an Serumproteine vor. Intrazellulär beträgt die Konzentration $10^{-8}-10^{-7} \text{ mol/l}$. Unter anderem spielt Kalzium eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsprozessen aller Art auf zellulärem und subzellulärem Niveau sowie in Gewebeverbänden. Zu diesem Zweck verändert sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und initiiert oder verändert

indirekt zelluläre Prozesse, wie Kontraktion-Relaxation und Exozytose von präsynaptischen Vesikeln, oder beeinflusst die Aktivität diverser Enzyme über verschiedene kalziumabhängige regulatorische Agentien.

Die Grundlage des Kontraktionsvorgangs in glatten Muskelzellen ist, wie in anderen Myozyten auch, die Interaktion von Aktin und Myosin. Die Myosinköpfe heften sich dabei an die Aktinfilamente an und knicken unter Hydrolyse von ATP gerichtet ab. Dabei verschieben sie die Aktinfilamente, die an Strukturen des Zytoskeletts bzw. an Anheftungsstellen der Zellmembran befestigt sind, in einer Weise, dass die Zelle kontrahiert.

Voraussetzung für diesen Mechanismus ist eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über 10^{-7} mol/l. Kalzium bindet dann an Kalmodulin, und dieser Komplex aktiviert die Myosinkinase. Diese überträgt eine Phosphatgruppe von ATP auf die regulatorische leichte Kette des Myosin und ermöglicht so dessen Interaktion mit Aktin. Wie oben beschrieben resultiert aus der anschließenden Hydrolyse des ATP ein Bewegungseffekt (vgl. Lehrbücher der Physiologie).

Damit diese Mechanismen ablaufen können, müssen die jeweiligen Ca^{2+} -Konzentrationen und -Gradienten von Intra- und Extrazellulärraum bzw. Zellkompartimenten sehr genau kontrolliert werden. Dies wird durch spannungsabhängige oder ligandengesteuerte Kalziumkanäle sowie durch einige Dutzend verschiedene Kalzium aktiv transportierende Proteine gewährleistet, die durch alternatives *splicing* aus unterschiedlichen Genen entstehen.

Darunter befinden sich drei verschiedene sarco(endo)plasmatische Ca^{2+} -ATPasen (SERCA 1-3) und vier Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA 1-4) (Übersicht in [14]). Während die biochemische Struktur der PMCA, die Verteilung während der Entwicklung und im adulten Organismus sowie ihr Verhalten in isolierten Zellen Bestandteil umfassender Forschungsprojekte war, finden sich noch Defizite im Bereich der physiologischen Funktion *in vivo*.

1.3 Die kalmodulinabhängige Plasmamembran-Kalzium-ATPase

1.3.1 Nomenklatur

Die Plasmamembran-Kalzium-Pumpe, das Protein, das in dieser Arbeit untersucht werden soll, ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das erstmals 1966 in Erythrozyten beschrieben wurde [15]. Seine Bezeichnung setzt sich aus verschiedenen Buchstaben und Ziffern zusammen.

Ein Kleinbuchstabe vor dem abgekürzten Proteinnamen „PMCA“ zeigt die Spezies an. So steht z.B. „h“ für *human*, „r“ für *rat* oder „m“ für *mouse* (z.B. hPMCA).

Eine nachgestellte Ziffer bezeichnet die Isoform. Dabei erhielt die erste in voller Länge publizierte PMCA-cDNA die Ziffer 1, die im folgenden entdeckten Isoformen die jeweils nächsthöhere Ziffer (Bsp. hPMCA4) [16, 17] (Übersicht in [18]). Bis heute sind vier verschiedene menschliche Isoformen der PMCA bekannt.

Ein weiterer nachgestellter Kleinbuchstabe benennt die Splicevariante, wobei die Buchstaben vom Beginn des Alphabets die zeitlich früher entdeckten Spliceformen des C-Terminus kennzeichnen und diejenigen vom Ende des Alphabets die Formen des N-Terminus [19-21] (z.B. hPMCA4b). Diese Nomenklatur wurde nach der Entdeckung alternativer Splicevarianten der PMCA eingeführt [22, 23].

Diese Systematik der verschiedenen Isoformen ist auch heute noch weitverbreitet, obwohl ein alternatives System propagiert wurde [24]. In diesem wird der nachgestellte Kleinbuchstabe durch einen Großbuchstaben ersetzt, der für eine der drei möglichen Splicestellen des Proteins (A,B,C) steht. Diesem folgt eine römische Ziffer, die das/die translatierten Exon(s) bezeichnen (z.B. hPMCA4CI).

1.3.2 Gene

Man kennt heute vier Gene, die die menschliche Plasmamembran-Kalzium-ATPase kodieren.

Isoform	Originalliteratur	Genort
PMCA1	Verma et al.1988 [17] Shull und Greeb 1988 [16]	12q21-12q23
PMCA2	Heim et al.1992 [25] Shull und Greeb 1988 [16]	3q25-3q26
PMCA3	Brown et al. 1996 [26] Greeb und Shull 1989 [22]	Xq28
PMCA4	Strehler et al. 1989 [23] Keeton und Shull 1995 [27]	1q25-1q32

Tabelle 1: PMCA-Isoformen mit bekannter cDNA sowie Originalliteratur. Zusätzlich sind die Genloci angegeben.

Es existieren somit vier Isoformen dieses Proteins, die aber durch alternatives Splicing eine noch weitergehende Differenzierung erfahren.

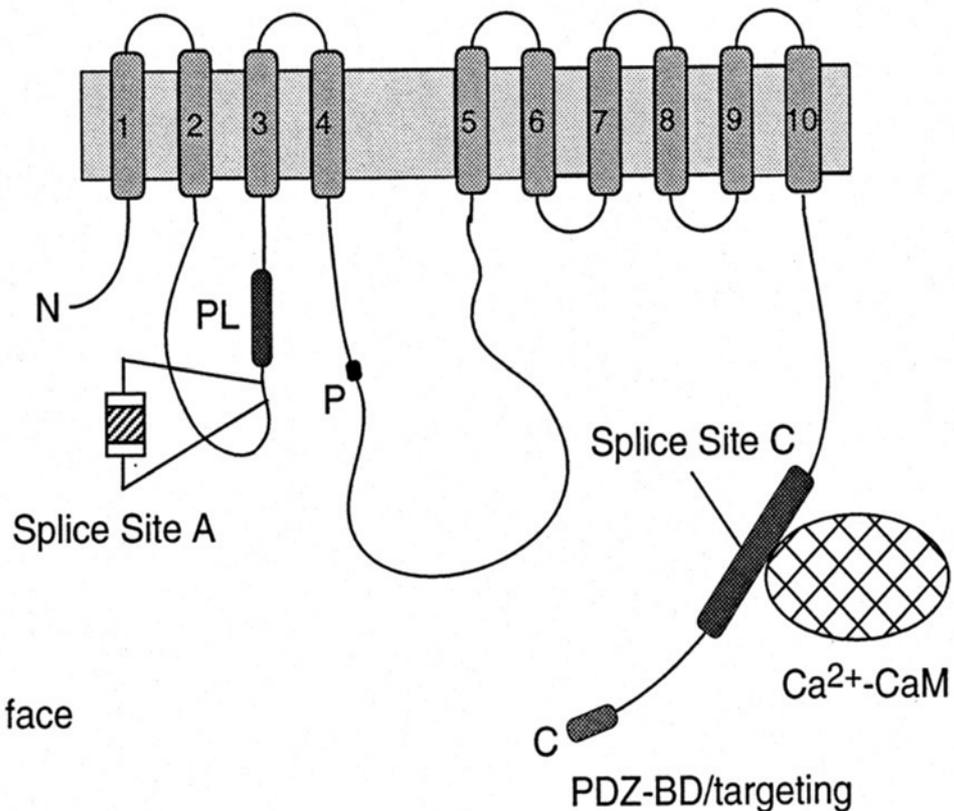
Drei unterschiedliche Sequenzen sind Angriffspunkt der Splicisomen. Die erste liegt innerhalb des Abschnitts, der für die erste intrazelluläre Schleife kodiert, die zweite nahe dem späteren C-Terminus [21, 28]. Die dritte Splicestelle liegt innerhalb der für das C-terminale Ende kodierenden Region.

1.3.3 Struktur

Die PMCA gehört zu den primären Ionentransportern vom P-Typ. Diese Gruppe von Transportproteinen ist dadurch charakterisiert, dass sie während des Reaktionszyklus einen Aspartylphosphat-Intermediärzustand durchlaufen [29-31].

Die PMCA selber besteht aus zehn Transmembrandomänen, wobei sowohl N- als auch C-Terminus im Zytosol liegen. Außerdem bildet sie zwei zytoplasmische Schleifen zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 sowie 4 und 5 [24, 32, 33] (vgl. Abb. 1).

Extracellular face



Cytosolic face

Abbildung 1 [18]: Skizze der Struktur der b-Varianten der PMCA. Die PMCA verfügt über zehn Transmembrandomänen, N- und C-Terminus liegen im Zytosol, ebenso wie die beiden großen Sequenzen zwischen Transmembrandomäne 2 und 3 sowie 4 und 5.

Die erste Schleife, die die sogenannte *transduction domain* beinhaltet, scheint eine Rolle während der Konformationsänderungen im Transportzyklus zu spielen. Auf dem zweiten großen intrazellulären Segment befinden sich das katalytische Zentrum und die ATP-Bindungsstelle der Pumpe. Zusätzlich findet sich hier der Aspartylrest, der während des katalytischen Vorgangs phosphoryliert wird. Der lange C-Terminus verfügt über Abschnitte, die für die Regulation der Proteinaktivität ausschlaggebend sind (Übersicht in [18]).

1.3.4 Gewebeverteilung während der Entwicklung und im adulten Organismus

Die Verteilung der PMCA-Isoformen während der Entwicklung ist bisher relativ spärlich untersucht worden. Trotzdem ist es bezüglich des potentiellen Beitrags, den sie zur Entwicklung einzelner Organsysteme liefert, interessant, sich einige vorliegende Erkenntnisse zu vergegenwärtigen.

So liegt zum Beispiel eine Studie vor, die die Verteilung im Mäuseembryo zwischen Tag 9,5 und 18,5 untersucht [34]. Dabei fiel auf, dass die PMCA1 während des gesamten Beobachtungszeitraums ubiquitär exprimiert wird. Alle anderen Isoformen wurden erstmals um Tag 12,5 gesehen und zeigten jeweils unterschiedliche Verteilungsmuster im weiteren Verlauf der Entwicklung. PMCA2 wurde dabei ausschließlich im zentralen Nervensystem gefunden. War die dritte Isoform der Pumpe im frühen Beobachtungszeitraum noch weit verbreitet, so war sie später hauptsächlich im ZNS, bestimmten Skelettmuskeln und in der Lunge zu finden, was eher der räumlich begrenzten Verteilung im adulten Organismus entspricht. PMCA4, die in adulten humanen Geweben ubiquitär zu finden ist, konnte während der Entwicklung der Maus nur in geringerem Maße nachgewiesen werden.

Beim adulten Organismus wird PMCA1, aber auch PMCA4 in nahezu allen Organsystemen in mehr oder weniger großen Mengen exprimiert. Dagegen erweist sich die Verteilung der beiden anderen Pumpenformen als sehr viel spezifischer. Sie finden sich vor allem im Gehirn, das generell über die größte Vielfalt an Isoformen bzw. Splicevarianten verfügt, und im quergestreiften Muskelgewebe. Sie scheinen somit organspezifische Funktionen zu erfüllen. So findet sich die PMCA2 z.B. in großer Zahl in Purkinjezellen [35, 36] und in Zellen des Innenohres. PMCA2-defiziente Mäuse zeigen verlangsamtes Wachstum, schwere Gleichgewichtsstörungen und sind taub [37]. Daraus läßt sich schließen, dass die einzelnen Isoformen durchaus spezifische Aufgaben erfüllen und ihr Ausfall nicht unbedingt durch andere ersetzt werden kann.

1.3.5 Funktion der einzelnen Domänen

Die Regulation der Aktivität der Pumpe erfolgt auf verschiedene Weise. Ein regulatorisches Agens ist Kalziumkalmodulin (CaM). Dieses Molekül bindet an eine Sequenz, die Bestandteil des zytosolischen C-Terminus des Proteins ist [38]. Diese stellt eine inhibitorische Einheit dar, die intramolekulare Interaktionen mit zwei verschiedenen Regionen der PMCA eingeht. Die eine liegt auf der ersten zytosolischen Schleife und die andere innerhalb des katalytischen Zentrums [39-41]. In Abwesenheit von CaM scheint die katalytische Einheit blockiert und die Pumpe somit inaktiv zu sein. Steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration und damit auch die des Kalziumkalmodulin, so wird diese Inhibition aufgehoben und die Pumpe in einen hohen Aktivitätszustand versetzt.

Außerdem kann der C-Terminus der PMCA durch die Proteinkinasen A und C phosphoryliert werden [24, 33, 42-44], was genauso einen potentiell regulatorischen Mechanismus darstellt wie dessen Interaktion mit PDZ-Domänen [45]. Das Protein kann sich – vermittelt durch Kalmodulin – auch zu Di- oder Oligomeren zusammenlagern, was ebenfalls zu einer Aktivierung führt [46-48].

Die stärksten Stimulatoren der PMCA sind aber saure Phospholipide [49, 50] mit durchaus unterschiedlich starker Beeinflussung verschiedener Isoformen. Für diese bestehen zwei Bindungsstellen: eine, die in Verbindung zur Kalmodulinbindungsstelle steht, und eine zweite separat auf der ersten intrazellulären Schleife [51-53]. Der Mechanismus dieser Interaktionen ist noch nicht geklärt.

Weitere Möglichkeiten einer differenzierten Regulation der Kalzium-ATPase ergeben sich daraus, dass das primäre Transkriptionsprodukt nach alternativem *splicing* in fertige Proteine translatiert wird, die an bestimmten Stellen unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Diese differente Primärstruktur beeinflusst auch einige der oben genannten für die Aktivitätsregulation wichtigen Bereiche.

1.3.6 Alternatives Splicing

1.3.6.1 Regulation des Splicing

Obwohl über die Regulationsmechanismen der Expression von einzelnen Isoformen oder Splicevarianten der PMCA in verschiedenen Geweben noch wenig bekannt ist, gibt es Hinweise dafür, dass diese eine wichtige Rolle spielen. So kommen wie oben erwähnt bestimmte Formen nur in bestimmten Geweben vor, und von den ubiquitär exprimierten PMCA1 und 4 unterscheiden sich die Splicemuster verschiedener Organe. Wachstums- und Differenzierungsfaktoren scheinen dabei eine Rolle zu spielen. So ist möglicherweise Myogenin, ein Differenzierungsfaktor des Muskelgewebes, für das Splicemuster der Isoform 1 in kontraktilen Zellen verantwortlich. Ähnliche Zusammenhänge zwischen Wachstumsfaktor und gewebespezifischer Verteilung lassen die durch *nerve growth factor* ausgelösten Ergebnisse in Phaeochromozytomzellen vermuten [54].

Andere Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration direkt oder indirekt (z.B. über Calcineurin) die Expressionsrate bestimmter PMCA-Formen steuern kann [55, 56]. Speziell für glatte Gefäßmuskelzellen wurde ein Abfall der PMCA-Menge durch c-myb ausgelöst [57], und auch Glucokortikoide scheinen potentiell regulatorische Funktion zu haben [58]. Solche Regulationsmechanismen sind wichtig, damit jede Zelle mit den passenden Splicevarianten ausgestattet ist, denn unterschiedliches *splicing* resultiert in unterschiedlichen Funktionsvariablen des Proteins.

1.3.6.2 Splice-Stelle A

Hierbei handelt es sich um ein Exon von etwa 40 Basenpaaren, bei der PMCA2 finden sich sogar drei verschiedene Exone [25], die potentiell aus dem Primärtranskript ausgeschnitten werden können [20, 27, 59, 60]. Das entsprechende Exon kodiert für einen Teil des Proteins auf der ersten zytosolischen Schleife, die in engem Kontakt zu der Bindungsstelle für Phospholipide und einem anderen Abschnitt steht, der in die inhibitorische Funktion des C-Terminus eingebunden zu sein scheint [41].

Unterschiedliche Aminosäuresequenzen könnten so diese für die Regulation der Proteinaktivität wichtigen Bereiche verändern.

So liegt eine Studie vor, die alle drei Spliceformen der PMCA2b mit der Isoform 4x/b bezüglich ATPase-Aktivität vergleicht [61]. Dabei zeigte sich, dass in bestimmten Zelllinien alle 2b-Formen eine höhere ATPase-Aktivität als die 4b-Form hatten. Außerdem war die Affinität zu Kalmodulin erhöht. Eine Sequenz, an die sich die erste Splicestelle direkt anschließt, zeigt eine der Konsensussequenz für die Assoziation von G-Protein-Untereinheiten ähnliche Aminosäurefolge. Somit könnte durch alternatives *splicing* eventuell auch diese regulatorische Interaktion beeinflusst werden (Übersicht in [18]). Die verschiedenen Sequenzen einer jeden Isoform scheinen eine unterschiedliche Interaktion mit regulatorischen Agentien zu bewirken. Unlängst konnte für PMCA2 gezeigt werden, dass unterschiedliche a-Splicevarianten offensichtlich eine Bedeutung für das *targeting* in polarisierten Zellen besitzen [62].

1.3.6.3 Splice-Stelle B

Eine zweite potentielle Splicestelle mit einem Exon von rund 100 Basenpaaren wurde innerhalb der C-terminalen Region der PMCA postuliert [21, 63]. Im weiteren Verlauf ergaben sich allerdings Zweifel, ob es sich bei der Variante, bei der die entsprechenden Aminosäuren fehlen, nicht um ein fehlerhaftes Produkt handelt. So wurde diese Form in den meisten Kontrollversuchen nicht mehr nachgewiesen [19, 20, 64].

Schwerer wiegt jedoch, dass ein Fehlen des betreffenden Exons das fertige Protein – wie man es sich heute vorstellt – bis in die Tertiärstruktur grundlegend verändern würde. Die zehnte Transmembrandomäne würde fehlen, so dass der mit diversen vor allem regulatorischen Funktionen behaftete C-terminale Teil im Extrazellulärraum zu liegen käme und somit seine Funktion wohl nicht mehr erfüllen könnte [18]. Heute zweifelt man an einer physiologischen Form der PMCA, die ohne diesen Teil existiert.

1.3.6.4 Splice-Stelle C

Die dritte Splicestelle, ebenfalls auf dem C-terminalen Teil des Primärtranskripts gelegen, ermöglicht eine größere Vielfalt an Sekundärtranskripten [19, 20].

Diese Variationsmöglichkeit ist besonders interessant, da die Lage der Sequenz, die Unterschiede aufweist, in enger Verbindung zu wichtigen regulatorischen Teilabschnitten des Proteins steht. So befindet sie sich z.B. in jeder der vier Isoformen direkt vor der Bindungsstelle für Kalmodulin, die dann selbst aufgrund verschiedener Leseraster Unterschiede aufweist [17, 38].

Für PMCA1 ließ sich beispielsweise zeigen, dass die Affinität der einzelnen Splicevarianten zu Ca^{2+} -Kalmodulin bei jeweils unterschiedlichen pH-Werten verschieden ist. Damit haben sie auch ihr Aktivitätsmaximum in unterschiedlichem Milieu [65]. Für PMCA4a und b konnte gezeigt werden, dass die Bindungsdomäne für Kalmodulin unterschiedliche Sequenzen aufweist [66, 67]. Es stellte sich heraus, dass die Varianten des Proteins unterschiedliche Affinität zu diesem Interaktionspartner besitzen und somit auch der Ca^{2+} -Umsatz der a-Variante niedriger ist [68, 69]. Dieser Zusammenhang fand sich auch für PMCA2a/b, so dass er möglicherweise ein generelles Prinzip der a/b-Varianten darstellt [70]. Bei PMCA4a/b sah man außerdem unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten in der Interaktion mit Kalmodulin. So dauert sowohl dessen Assoziation als auch Dissoziation bei der b-Form sehr viel länger als bei der a-Form. Das schnellere Ansprechen der a-Form auf regulatorische Reize könnte auch ein Grund dafür sein, dass diese vor allem in Zellen gefunden wird, die schnell auf Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration reagieren müssen, z.B. Muskel- und Nervenzellen. Weiterhin besitzt die a-Form eine höhere Basalaktivität, was sie weniger kalmodulinabhängig macht als die b-Form und somit eine Anpassung an ähnliche Verhältnisse darstellen könnte [67, 69, 71]. Über eine noch höhere Kalmodulinaffinität verfügen sowohl a- als auch b-Formen der PMCA2. Dies läßt darauf schließen, dass diese unter physiologischen Bedingungen ständig aktiviert ist [71]. Ähnliches zeigte sich bei der Untersuchung einer f-Spliceform, in diesem Fall der PMCA3f. Hier ist der COOH-Terminus vorzeitig abgebrochen und die zweite Hälfte der Kalmodulinbindungsstelle durch eine komplett andere Sequenz ersetzt. Dadurch ist die Affinität für dieses sehr gering, und es konnte gezeigt werden, dass diese Form kaum abhängig von Kalmodulinstimulation ist. Wieder läßt das gehäufte Vorkommen dieser Variante in Skelettmuskelzellen auf eine spezifische Anpassung an die schnell wechselnden Ca^{2+} -Konzentrationen in diesen Zellen schließen [72].

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Aktivität der Ca^{2+} -Pumpen scheint durch Phosphorylierung gegeben, was sowohl direkt als auch indirekt über eine Änderung der Interaktion mit Kalmodulin geschehen kann. Vor allem Proteinkinase A und C scheinen dafür verantwortlich zu sein. Die Phosphorylierung findet vermutlich hauptsächlich an Aminosäuren des C-terminalen Abschnitts statt (z.B. Tyr 1176) [33, 42, 73, 74]. Daraus leiten sich wieder verschiedene Möglichkeiten der Regulation der einzelnen Spliceformen ab, da diese über unterschiedliche Sequenzen in diesen Bereichen verfügen.

PKA kann z.B. in bestimmten Geweben PMCA1b aktivieren [75]. Auch die Phosphokinase C phosphoryliert Aminosäuren in der C-terminalen Region der PMCA [76, 77]. Diese liegen in dem für die Autoinhibition wichtigen Bereich. Durch Phosphorylierung erhöht sich die Pumpleistung des Proteins unabhängig von Kalmodulinstimulation [76, 78]. Während die PMCA4b ein gutes Substrat darstellt, werden die b-Varianten der Isoformen 2 und 3 nur relativ schlecht phosphoryliert [79]. Auch in dieser Beziehung bieten die verschiedenen Splicevarianten also die Möglichkeit zur unterschiedlichen Beeinflussung durch ein regulatorisches Agens.

Eine Eigenschaft der PMCA4b, die sie für dieses Projekt favorisiert, ist, dass sie, wie andere b-Spliceformen auch, über eine C-terminale Aminosäuresequenz verfügt, die es ihr ermöglicht, an PDZ-Domänen zu binden. Dabei handelt es sich um eine Bindungsmöglichkeit, die unterschiedliche Proteine in die Lage versetzt, miteinander in Interaktion zu treten. So konnte dies z.B. für PMCA4b und verschiedene membranständige Guanylatzyklasen (MAGUK) gezeigt werden [45]. Auch die NO-Synthase verfügt über eine solche Domäne und kann folglich potentiell mit der PMCA in Interaktion treten. Die a-Spliceformen besitzen diese Fähigkeit nicht. Mittels PDZ-Domänen können membranständige Proteine auch im Zytoskelett verankert werden. Sie sind möglicherweise auch dafür verantwortlich, dass die PMCA sich vor allem in bestimmten Zellkompartimenten, den Caveolae, befindet [80, 81].

Mit Hilfe der MAGUKs, die oft verschiedene PDZ-Domänen und andere Interaktionssequenzen besitzen, können größere Proteinkomplexe entstehen, die z.B. Membranproteine mit solchen von Signaltransduktionswegen o.ä. verbinden [82-84]. So können auch PMCA und NOS (s.u.), die sich beide gehäuft in Caveolae in enger räumlicher Beziehung befinden [85], miteinander in Kontakt treten [86]. Weiterhin

könnten sich PMCA-Moleküle mittels ihrer PDZ-Domänen zu Di- oder Polymeren verbinden, was zu einer kalmodulinunabhängigen Aktivierung führen würde (s.o.).

Es wird interessant sein zu erfahren, welche anderen Proteine mit der PMCA über diese PDZ-Domänen in Kontakt treten können und welche neuen Funktionen sie durch solche Interaktionen übernehmen kann. Die oben angeführten Möglichkeiten des alternativen *splicing* ermöglichen es der PMCA, sich spezifisch an die Gegebenheiten in den verschiedenen Geweben anzupassen.

1.3.7 Lokalisation der PMCA in der Zelle

Caveolae sind der Ort der Zellmembranen, in denen sich PMCA vor allem findet. Ihre Konzentration ist hier 18 bis 25 mal größer als in anderen Membranabschnitten [80]. Caveolae sind membranständige Zellkompartimente. Die Zellmembran stülpt sich tropfenartig ins Zytoplasma ein und formt diese für diverse Regulationsprozesse innerhalb der Zelle verantwortlichen Loci. Die Invaginationen sind reich an Glykolipiden und Cholesterol, das für die Integrität dieser Strukturen wichtig ist. Ein integrales Membranprotein, das Caveolae charakterisiert, ist Caveolin [81]. Es ist in der Lage, mit wichtigen Signaltransduktionsmolekülen wie z.B. Tyrosinkinasen, G-Proteinen und auch NOS zu interagieren und kann so eventuell die Fortleitung von Signalen beeinflussen. Caveolae sind reichlich ausgestattet mit Proteinen, die Rezeptorfunktion haben oder in die intrazelluläre Signalweitergabe und deren Modulation eingebunden sind [87-89]. Dazu gehören auch diverse Moleküle, die an der Regulation des intrazellulären Kalziums teilhaben. So sind in relaxierten glatten Muskelzellen diese Kompartimente reich an Ca^{2+} , das während der Kontraktion ins Zytoplasma verschoben werden kann [81]. Es ist den Caveolae also möglich ein Mikromilieu zu schaffen, das sich von dem des restlichen Zytoplasmas unterscheidet.

1.4 Erstellung einer transgenen Mauslinie

Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit stellt eine transgene Mauslinie dar, d.h. eine Mauslinie, in deren Genom eine artifizielle DNA-Sequenz integriert wurde.

1.4.1 Transgen und Promotor

In diesem Fall handelt es sich bei dem Transgen um ein die humane Isoform 4b der Plasmamembran-Kalzium-ATPase enthaltendes Konstrukt. Das Protein soll im Tiermodell in glatten Muskelzellen überexprimiert werden und wurde deshalb unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors (zur Verfügung gestellt von M. S. Parmacek, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-4283, USA) ins Mausgenom integriert. Das SM22 α Gen und sein Promotor befinden sich beim Menschen auf dem Chromosom 11 [90]. Das Genprodukt SM22 α ist spezifisch für glatte Muskelzellen bestimmter Gewebe, während der Embryonalentwicklung wird es kurzzeitig auch in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert [91]. Das Gen wird also postnatal nur im glatten Muskel exprimiert [92]. SM22 α -mRNA wurde in Uterus, Gastrointestinaltrakt und in Gefäßmuskelzellen der Aorta und in geringerer Konzentration auch in Lunge, Niere, Herz und Skelettmuskel nachgewiesen. In den beiden letztgenannten Geweben fand sich SM22 α lediglich in den Blutgefäßen. [91].

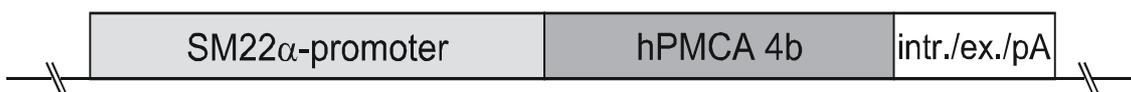


Abbildung 2: Skizze der zur Erstellung der transgenen Mauslinien verwendeten Gensequenz. Die hPMCA4b-cDNA wurde unter Kontrolle des glattmuskelspezifischen SM22 α -Promotors gestellt. Der cDNA folgt eine Intron/Exon-Struktur und das polyA-Signal des SV40 Vektors.

1.4.2 Generierung der transgenen Mauslinie

Das Transgenkonstrukt, bestehend aus dem Promotor, der hPMCA4b-cDNA und einer SV40-PolyA-Sequenz, wurde zur Erstellung der transgenen Mauslinien aus dem Vektor ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde es in den Pronukleus von fertilen Mauseizellen injiziert. Aus diesen entstanden die transgenen Tiere, die durch Rückkreuzung mit C57/Bl6-Mäusen die transgenen Linien begründeten.

1.5 Die NO-Synthase

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion von PMCA und NO-Synthase (NOS) näher zu beleuchten. Die NOS setzt in einer zweischrittigen Reaktion das Substrat L-Arginin über das stabile Intermediärprodukt N ω -hydroxy-L-arginin in Stickstoffmonoxid und L-Citrullin um [93-95]. NO aktiviert die Guanylatzyklase, die zyklisches GMP produziert. Dieses aktiviert wiederum Folgeproteine, z.B. die Proteinkinase C, die im Gefäßsystem eine Vasodilatation vermitteln [96]. Daneben hat NO in hohen Konzentrationen eine direkte zytotoxische Potenz.

Drei Isoformen der NOS im Organismus sind heute bekannt: die neuronale NOS (Typ I, nNOS), die erstmalig im zentralen Nervengewebe, im folgenden aber auch im Skelettmuskel und in glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben wurde, und die endotheliale NOS (Typ III, eNOS), die sich in Endothelzellen des Gefäßsystems findet (Übersicht in [85]). Als dritte Isoform tritt eine zytokininduzierbare NO-Synthase (iNOS) in Zellen des Immunsystems auf.

Die Aufgaben der verschiedenen Isoformen und ihres physiologisch wirksamen Produkts NO sind entsprechend ihrer vorwiegenden Lokalisation unterschiedlich. Dazu gehören bestimmte Aufgaben in der Neurotransmission, die Regulation des Gefäßmuskeltonus sowie Beteiligung an der Immunabwehr (Übersicht in [93, 97-99]).

Alle Isoenzyme haben einen dreiteiligen Aufbau gemeinsam [100]. N-terminal ist das katalytische Oxygenasezentrum gelegen, das Häm und den Kofaktor Tetrahydrobiopterin bindet und gleichzeitig die Bindungsstelle für das Substrat L-Arginin darstellt. C-terminal liegt die reduzierende Einheit. Hier werden Elektronen von NADPH über Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-Adenindinukleotid (FAD) auf

Häm im katalytischen Zentrum übertragen. Dazwischen liegt der dritte Teil des Enzyms, die Kalmodulin-Bindungsstelle, die die Elektronenübertragung zwischen der reduzierenden und der oxygenierenden Domäne reguliert [95, 101].

Neben Inhibitoren der NO-Synthase – dies sind Imidazol oder Aminoguanidin [100] – kennt man bestimmte Moleküle, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen können. So ist die Bildung eines Dimers aus zwei Einzelproteinen für die volle Aktivität notwendig [101]. Durch Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels wird die konstitutive NOS aktiviert. Dies geschieht durch die Bindung von Kalziumkalmodulin [102].

Es wurde gezeigt, dass die beiden konstitutiven exprimierten Isoformen der NOS mit bestimmten Isoformen des Proteins Caveolin in der Zelle kolokalisiert sind. Dabei findet sich eNOS mit Caveolin-1 (Cav-1) unter anderem im Endothel von Gefäßen. nNOS findet sich hier nicht. Diese Isoform wurde dagegen zusammen mit Caveolin-3 (Cav-3) und auch Caveolin-1 (Cav-1) z.B. in den glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen [85]. Dies zeigt einerseits die Lokalisation der NOS in der Zelle, nämlich die oben schon erwähnten speziellen Membrankompartimente, die Caveolae. Auf der anderen Seite hemmt Caveolin die NO-Produktion [103], solange es allosterisch an die NOS gebunden ist. Diese Bindung kann zumindest bei der endothelialen Isoform durch Kalmodulin gelöst werden [102, 104].

nNOS konnte als Bestandteil eines in Caveolae lokalisierten Multiproteinkomplexes identifiziert werden. In diesem Komplex gehen die einzelnen Proteine Bindungen über PDZ-Domänen – die NOS besitzt eine solche – direkt oder mittels Linkerproteinen ein [105-107]. B-Isoformen der PMCA können, wie oben bereits erwähnt, solche PDZ-Domänen binden. Eine direkte Interaktion von nNOS und hPMCA4b konnte unlängst nachgewiesen werden [86].

2 Fragestellung

In den letzten Jahren wurde die Hypothese entwickelt, dass die PMCA für die Variation der intrazellulären Kalziumkonzentration, die für die Kontraktions-/Relaxationsvorgänge von Muskelzellen notwendig ist, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr scheint sie eine wichtige Funktion in bestimmten Signaltransduktionsmechanismen zu besitzen sowie in Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge von Zellverbänden und Geweben involviert zu sein [54, 108]. Die PMCA besitzt eine C-terminale Sequenz, mit der sie PDZ-Domänen binden kann [45, 109, 110]. Unlängst wurde ein weiteres Beispiel einer so vermittelten Interaktion beschrieben. Die PMCA interagiert mit nNOS und kann so deren Aktivität regulieren [86]. Diese Arbeit befaßt sich damit, ein *in vivo*-Modell für Auswirkungen der hPMCA4b im Organismus zu entwickeln und funktionelle Schlüsse bezüglich des glattmuskulären Gefäßmuskeltonus und dessen Auswirkungen auf den Blutdruck zu ziehen.

3 Methoden

3.1 Nachweis des Transgens auf Ebene der Erbsubstanz

3.1.1 Gewinnung von DNA

Um nachzuweisen, ob ein bestimmtes Tier aus der Zucht transgen bezüglich der Plasmamembran-Kalzium-ATPase ist, mußte die PMCA-Gensequenz im Erbgut der jeweiligen Maus nachgewiesen werden. Dafür wurde reine DNA benötigt. Dazu wurde ein zirka einen Zentimeter langes Stück der Schwanzspitze jeder Maus verwendet und das entsprechende Tier mit einer Ohrmarke gekennzeichnet. Das Gewebestück wurde anschließend mittels Proteinase K verdaut, bis es sich gänzlich aufgelöst hatte. Danach wurde daraus mit Hilfe des *DNeasy Tissue Kit* der Firma Qiagen DNA isoliert (siehe Anleitung des Herstellers).

3.1.2 Photometrische Mengenbestimmung

Die photometrische Mengenbestimmung wurde im Spektrophotometer im ultravioletten Licht bei 260 und 280 nm Wellenlänge durchgeführt. Dazu wurden jeweils 98 µl destilliertes Wasser mit 2 µl des DNA-Eluats versetzt und gegen einen Leerwert gemessen. Aus der Absorption kann die Menge DNA pro Volumen errechnet werden.

3.1.3 Erstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Als Grundlage für die Sonde diente das Plasmid PTZ18U/PSG35, in welches bereits die cDNA der humanen Plasmamembran-Kalzium-ATPase 4b mit Hilfe eines Phagen transfiziert worden war. Bei einem Plasmid handelt es sich um einen kreisförmigen Bestandteil des Erbguts von Bakterien. Bakterien mit diesem Plasmid waren in unserem Labor als Glycerinkultur vorhanden.

Mittels einer ausgeglühten Pipette wurden Bakterien aus der Glycerinkultur entnommen und in ein steriles Nährmedium verbracht. Dieses wurde über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert, die neu entstandene Kultur für 30 min bei 3700 U/min zentrifugiert

und der Überstand verworfen. Aus dem Zentrifugat wurde das Plasmid mit dem *Nucleobond PC 500*-Elutionskit der Firma Machery-Nagel eluiert (siehe Anleitung des Herstellers), anschließend im Verhältnis 3:7 in Isopropanol aufgenommen und 20 min bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert. Das Isopropanol wurde abgesaugt und das Plasmid mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die Menge des aufgereinigten Plasmids wurde photometrisch bestimmt (s.o.).

Um die PMCA-cDNA aus dem isolierten Plasmid auszuschneiden, wurden zwei Restriktionsenzyme verwendet, die spezifisch am 3'- und 5'- Ende des gesuchten DNA-Abschnitts schneiden. Diese lassen sich aus der zum jeweiligen Plasmid gehörenden Plasmidkarte ersehen. In diesem Fall handelte es sich um die Enzyme *EcoRI* und *BamHI*. Diese wurden mit dem für die Enzymaktivität optimalen Puffer (nach Angaben des Herstellers) und dem Substrat (etwa 30 µg DNA) bei 37 °C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Vorher wurde der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 200 µl aufgefüllt.

Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen, das 0,003% Ethidiumbromid enthielt, und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Als Puffer wurde TAE und zum Größenvergleich ein 1Kb-Leiter benutzt. Anschließend wurden die zwei unterschiedlich großen DNA-Stücke im ultravioletten Licht sichtbar gemacht und das der Größe nach der hPMCA4b-cDNA entsprechende aus dem Gel herausgetrennt und gewogen. Die Plasmid-DNA wurde dann mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus dem Gel gewonnen (Verfahren siehe Angaben des Herstellers) und die erzielte Konzentration photometrisch bestimmt (s.o.).

Die hierbei erhaltene hPMCA4b-cDNA mußte radioaktiv markiert werden, um im Southern-Blot-Verfahren als Sonde zu dienen. Dazu wurde die DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und in destilliertem Wasser mit dGTP, dCTP und dTTP sowie DNA-Lösungspuffer, Puffer, Primer und Enzym des *Multiprime DNA labeling system* der Firma Amersham gemischt (siehe zugehöriges Protokoll). α -³²P dATP komplettierte den Ansatz. Dieser wurde bei 37 °C für etwa 30 min inkubiert. Anschließend wurde die jetzt radioaktiv markierte Sonde mittels einer bei Roche-Diagnostics erworbenen Gelfiltrationssäule von den restlichen Bestandteilen des Ansatzes getrennt. Dazu wurde dieser auf die Säule gegeben und mit 500 µl TAE-Puffer eluiert. Zur Prüfung der Aktivität der Sonde wurde 1 µl des Eluats auf DEAE-Zellulose gegeben und in einem

Szintillationszähler in 5 ml *Emulsifer-Safe*, einem Scintillationscocktail der Firma Packard, gemessen. Aus dem Ergebnis läßt sich die spezifische Aktivität pro Volumen Eluat berechnen.

3.1.4 Southern-Blot-Analyse

Im Southern Blot kann das nachzuweisende Gen über eine radioaktiv markierte Sonde, die in ihrer Basensequenz mit Teilen des Gens übereinstimmt, detektiert werden. Um die Gensequenz später nachweisen zu können, muß die gesamte DNA zunächst zerkleinert und die heterogenen Fragmente anschließend der Größe nach aufgetrennt werden. Zur Zerkleinerung der Erbsubstanz werden sogenannte Restriktionsendonukleasen verwendet. Es handelt sich dabei um bakterielle Enzyme, die bestimmte aufeinanderfolgende Basenpaare in den DNA-Strängen erkennen und spezifisch an diesen Stellen schneiden. Man wählt zwei verschiedene Nukleasen so aus, dass man dieselben zum Ausschneiden der cDNA, die das Transgen darstellt und als Vorlage für die Sonde dient, und zur Fragmentierung des Untersuchungsmaterials verwendet. Somit ist gewährleistet, dass die Sonde das potentiell ins Genom aufgenommene Transgen erkennen und sich anlagern kann. Die in der Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente werden auf eine Membran transferiert. Diese wird zusammen mit der radioaktiv markierten Sonde inkubiert und so das Transgen durch Hybridisierung der komplementären Sequenzen nachgewiesen.

Zum Zerkleinern der DNA-Ketten wurden die kommerziell erwerblichen Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI* verwendet. In für die Aktivität der beiden Enzyme optimalem Puffer und bei optimaler Temperatur (nach Angaben des Herstellers) wurden diese zusammen mit dem zu untersuchenden Material für etwa zwei Stunden inkubiert. Für den Ansatz wurden gleiche Mengen an DNA eingesetzt und nach Zugabe der restlichen Reagenzien mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

Anschließend wurden die Proben in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel mit 0,003% Ethidiumbromid in TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit DNA-Gelladepuffer versetzt und so auf das Gel geladen. Zum Größenvergleich diente ein 1Kb-Leiter. Nach der Auftrennung wurde das Gel im ultravioletten Licht zur Dokumentation fotografiert. Im nächsten Schritt wurde das

Gel 15 min in 0,25 molarer Salzsäure depuriniert und darauffolgend 30 min in 0,4 molarer Natronlauge denaturiert.

Zum Blotten wurde das Gel kurz in 20*SSC equilibriert und auf zwei Lagen Whatman-Filterpapier platziert, die mit einem Reservoir mit 20*SSC kommunizierten. Auf das Gel wurden eine Nitrozellulosemembran, die zuvor ebenfalls kurz in 20*SSC equilibriert wurde, und zwei weitere Lagen Whatman-Papier gelegt. Der ganze Aufbau wurde mit ausreichend Zellstoff bedeckt und mit einem Gewicht belastet. Das Gel wurde vom Reservoir mit Parafilm abgetrennt, so dass der Blot ausschließlich über das Filterpapier erfolgen konnte. Der Blot fand über Nacht statt, anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet. Im Folgenden wurden die auf die Membran übertragenen DNA-Fragmente mittels *UV-crosslinking* auf dieser fixiert.

Um unspezifische Bindungen der Sonde zu verhindern, wurde die Membran als nächstes mit 500 µl denaturierter Heringssperma-DNA für etwa eine Stunde bei 42 °C im Rotierer prähybridisiert. Dazu wurde ein Puffer aus 5*SSPE, 5*Denhardts Reagenz und 0,5% SDS im Verhältnis 1:1 mit Formamid gemischt. Zur Detektion der gesuchten DNA-Teile wurde dann die Membran mit der erstellten Sonde, die vorher bei 95 °C denaturiert worden war, im selben Puffer bei derselben Temperatur über Nacht ebenfalls rotierend inkubiert.

Anschließend wurde die Membran in 2*SSC zweimal kurz und dann mindestens 15 min bei 42 °C gewaschen. Weiterhin wurde ein weiterer Waschvorgang von mindestens 20 min Dauer bei derselben Temperatur in 0,2*SSC durchgeführt. Jetzt wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschlagen und mit einem X-Ray-Retina-Röntgenfilm in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Filme wurden nach sechs Stunden, einem und drei Tagen entwickelt.

Mit diesem Verfahren ließen sich Tiere, die das Transgen homozygot bzw. heterozygot in ihrem Genom aufwiesen, von solchen, die es nicht in die Erbsubstanz integriert hatten, differenzieren.

3.2 Nachweis des Transgens auf Ebene der RNA

3.2.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

Erster Schritt auf dem Weg vom Gen zum funktionsfähigen Protein ist die Transkription des DNA-Codes in mRNA. Erst der Nachweis von mRNA zeigt, dass das entsprechende Gen, das als Bestandteil der Erbsubstanz in allen Zellen eines Organismus vorhanden ist, auch potentiell exprimiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb verschiedene Gewebe der als transgen nachgewiesenen Tiere auf das Vorkommen von hPMCA4b-mRNA untersucht.

Dazu wurden verschiedene Organe und Gewebe von Mäusen, die unmittelbar vorher getötet worden waren, präpariert und entnommen. Sie wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Gewinnung reiner RNA wurde das Gewebe in Trizol, einem monophasischen Reagenz aus Phenol und Guanidinisothiozyanat, das Zellen und Zellstrukturen zerstört, RNA aber unversehrt belässt, in einem Glas-Homogenisator zerkleinert. Es wurde etwa 1ml Trizol-Reagenz pro 100 mg Gewebe eingesetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von rund 5 min wurden 0,2 ml Chloroform pro ml Trizolreagenz zugegeben und der Ansatz nach einer erneuten kurzen Inkubationszeit bei 12000g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Zentrifugation separierte das Gemisch in eine organische und eine wässrige Phase. RNA löst sich ausschließlich in letzterer, so dass mit dieser weitergearbeitet wurde.

Zur Präzipitation der RNA aus der Lösung wurden 0,5ml Isopropanol pro ml Trizolreagenz zugegeben und das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 min Dauer bei 12000 g und 4 °C. Die RNA war jetzt als Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierte RNA mit 75%igem Alkohol gewaschen. Dazu wurde 1ml Ethanol pro ml ursprünglich verwendetem Trizolreagenz eingesetzt und nach 5-minütiger Zentrifugation bei 7500 g und 4 °C wieder abgesaugt. Die RNA wurde dann luftgetrocknet und in RNase-freies Wasser aufgenommen. Ein DNase-Verdau schloss eine Verunreinigung der RNA-Proben mit genomischer DNA aus.

3.2.2 Analyse mittels RT-PCR

Nach der photometrischen Mengenbestimmung (Methodik wie zur DNA-Bestimmung) fand der Nachweis der mRNA durch die RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) statt. Die reverse Transkriptase, ein Enzym, das in der Natur in Retroviren vorkommt, ist in der Lage, RNA retrograd in die entsprechende cDNA-Sequenz umzuwandeln. Diese wird dann durch die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dazu muß sie zuerst bei 95 °C denaturiert werden. Anschließend synthetisieren spezielle Enzyme zu den jetzt einsträngigen DNA-Molekülen den jeweiligen komplementären Gegenstrang. Sie benötigen dazu Oligonukleotide, typischerweise etwa 20 Basen lang, die bereits an den nach der Denaturierung einzeln vorliegenden DNA-Strängen gebunden haben. Diese sogenannten Primer, die kommerziell nach dem Wunsch des Bestellers hergestellt werden, wählt man so, dass sie möglichst ein Intron des entsprechenden Gens überspannen, um eine Amplifikation von genomischer DNA-Verunreinigung zu verhindern. Für die hPMCA4b wurden Primer folgender Basensequenz verwendet: *sense*: GGC TCC CTG AGT GTA CTC CC; *antisense*: CCT GAT GAC GGT GCT CAT TG. Danach werden die neu entstandenen doppelsträngigen DNA-Produkte erneut denaturiert und der Vorgang wiederholt sich. Zum Synthetisieren der DNA sind spezielle Polymerasen notwendig, die die hohe Denaturierungstemperatur von 95 °C unbeschadet überstehen. Deshalb werden hierzu Enzyme verwendet, die natürlicherweise in Bakterien vorkommen, die durch ihren Lebensraum in heißen Quellen an solche Temperaturen adaptiert sind (*Thermus aquaticus*, Pfu-Pol u.a.). Während die Polymerasen für eine optimale Syntheseaktivität eine Temperatur von 72 °C benötigen, erfolgt die Hybridisation von Primern und Einzelstrang-DNA bei Temperaturen, die je nach Primerstruktur unterschiedlich sind. Ein Zusammenlagern zweier bereits fertig synthetisierter einzelsträngiger DNA-Moleküle wird dabei durch einen großen Überschuß an Primern verhindert. So kann allein durch Wechsel der Reaktionstemperatur beliebig viel DNA einer vorgegebenen Sequenz amplifiziert werden.

Zur Analyse wurde der *One Step RT-PCR Kit* der Firma Qiagen verwendet. Nach den Angaben des Herstellers wurde ein Reaktionsansatz gemischt. Dabei wurden von jedem

Gewebe etwa 10 µg gereinigte RNA eingesetzt und der Ansatz mit destilliertem Wasser auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt.

Für die Amplifikation wurde die PCR-Maschine folgendermaßen programmiert: in einem initialen 30-minütigen Schritt bei 50 °C wurde die RNA von der reversen Transkriptase mit Hilfe von *random-Primern* in DNA umgeschrieben. Es folgte eine Temperaturerhöhung auf 95 °C für 15 min, die die reverse Transkriptase zerstörte. Jetzt schloß sich eine normale PCR an, in der sich der Zyklus 94 °C über 30 sek, 50 °C über 30 sek und 72 °C über 1 min 28 mal wiederholte. Daran schloß sich ein finaler Schritt von 10 min bei 72 °C an. Die amplifizierte DNA wurde auf 4 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Um das Ergebnis später kontrollieren zu können, wurden eine Positiv- und eine Negativprobe in derselben Reaktion mitamplifiziert. Die gewonnene DNA wurde anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel, das 0,003% Ethidiumbromid enthielt, in TAE-Puffer elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Zur Verifizierung der Größe der DNA wurde ein 1Kb-Marker im elektrischen Feld mit aufgetrennt. Im ultravioletten Licht konnten die Banden sichtbar gemacht und so eine Aussage getroffen werden, in welchen Geweben ursprünglich hPMCA4b-mRNA vorhanden war.

3.3 Nachweis der Translationsprodukte des Transgens

3.3.1 Analyse der Proteine in Gewebelysaten

3.3.1.1 Isolierung von Proteinextrakten aus Gewebe

DNA hat keinen und RNA nur bedingt direkten Einfluss auf physiologische oder auch pathologische Vorgänge in Zellen, Gewebeverbänden oder im Gesamtorganismus. Dazu müssen aus dem Erbgut erst Proteine entstehen, die aus Aminosäuren zusammengesetzt sind und deren Bauvorlage DNA und mRNA darstellen. Deren Nukleotidsequenz wird von speziellen Enzymen in die Aminosäurenstruktur des Proteins umgeschrieben. Voraussetzung dafür, dass ein Gen potentiell Einfluss auf zelluläre Vorgänge nehmen kann, ist also dessen Exprimierung als Protein. Dabei kann ein Protein ubiquitär oder nur in bestimmten Zellen bzw. unter bestimmten Voraussetzungen exprimiert werden.

In diesem Fall interessierten aufgrund der Konzeption des Transgens glatte Muskelzellen.

Zum Nachweis der humanen PMCA4b wurden deshalb erneut wie zur Gewinnung von RNA verschiedene Organe der transgenen Tiere präpariert und entnommen (s.o.). Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Organe wurden anschließend mit einem Glasstößel homogenisiert und in einem vorher zugegebenen Puffer in Lösung gebracht. Die Endkonzentrationen dieses Puffers waren 50 mM Tris, pH-Wert 7,5, 2 mM Kalziumchlorid und verschiedene Proteinaseinhibitoren, die als gebrauchsfertige Zusammenstellung vertrieben werden. Die nicht gelösten Bestandteile des zerkleinerten Gewebes wurden kurz abzentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet.

3.3.1.2 Messung der erzielten Proteinkonzentrationen

Der Proteingehalt der Extrakte wurde anschließend photometrisch bestimmt. Dazu wurden 200 µl von BioRad hergestelltes *Dye Reagent Concentrate* mit 800 µl destilliertem Wasser gemischt und jeweils 1 µl des Lysats zugegeben. Dieser Ansatz wurde im Spektrophotometer bei Licht einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Das Messprinzip beruht auf der Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Protein, wodurch dessen Absorptionsmaximum von ursprünglich 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Durch Vergleich mit einer zuvor erstellten Eichkurve kann die Proteinkonzentration in der Probe errechnet werden.

3.3.1.3 Anreicherung kalmodulinbindender Proteine

Um die PMCA später auch sicher nachweisen zu können, wurde die Eiweißfraktion, zu der die PMCA gehört, zunächst von den restlichen Proteinen getrennt und somit angereichert. Zu diesem Zweck machte man sich zunutze, dass die PMCA die Fähigkeit besitzt, Kalmodulin zu binden (s.o.).

Zur Präzipitation der entsprechenden Proteinfraction wurden *Kalmodulin-Sepharosebeads* verwendet. Es wurden jeweils 1mg Proteinextrakt und 50 µl *beads* zusammenpipettiert und bei 4 °C für etwa zwei Stunden rotierend inkubiert. Nachdem

die entsprechenden Proteine an die Kalmodulinbeads gebunden hatten, wurden diese viermal mit jeweils 1 ml des bereits bei der Lyse eingesetzten Puffers gewaschen.

3.3.1.4 Western-Blot-Analyse

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Diese werden in einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch ein elektrisches Feld auf eine Membran übertragen. Hier werden sie mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) ist in der Lage, Proteine nur nach deren Größe und unabhängig von deren Ladung aufzutrennen. Das ist dadurch möglich, dass SDS durch Bindung an die Proteine deren unterschiedliche Ladung kaschiert.

Für die Elektrophorese wurde eine *BioRad-Elektrophoresekammer* benutzt, zuerst ein 8%iges Trenngel gegossen und darüber ein 5%iges Sammelgel gelegt. Als Leiter diente ein Elektrophoresepuffer. Die gewaschenen Kalmodulinbeads wurden mit einem in etwa gleich großen Volumen an SDS-Gelladepuffer versetzt, einem Puffer, der sich aus 19 Teilen Laemmli-Probenpuffer und einem Teil β -Mercaptoethanol zusammensetzt, und anschließend sofort für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Mit den so vorbereiteten Proben wurde dann das Sammelgel geladen und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von rund 90 V gestartet. Um das Ergebnis auswerten zu können, war vorher zu den Proben auch eine Positivprobe und 10 μ l des *Full Range Rainbow™ Protein Molecular Weight Marker* auf das Gel geladen worden.

Anschließend wurde ein Elektrotransfer nach Towbin (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Dazu wurde das Gel in einer Halteklammer auf einem Schwamm und zwei Lagen *Whatman-Filterpapier* platziert. Auf das Gel kam eine Nitrozellulosemembran zu liegen, die erneut mit zwei Lagen *Whatman-Filterpapier* und einem Schwamm bedeckt wurde. Alle Bestandteile dieses Aufbaus wurden vorher in demselben Puffer equilibriert, in dem danach auch der Transfer stattfand, und das Sammelgel vom Trenngel, welches Bestandteil des Aufbaus war, abgetrennt. Die Klammer mit diesem Aufbau wurde in einer *BioRad-Kammer* in Transferpuffer platziert, in der sich zusätzlich ein Kühlakku befand, und die Proteine mit Hilfe eines

konstanten Stromflusses von 90 mA über Nacht von dem Gel auf die Membran übertragen.

Um vor der Detektion der PMCA mittels Antikörper unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran als nächstes für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Blockierlösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurden Antikörper in Blockierlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Membran darin bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Es wurden sowohl ein polyklonaler *rabbit-anti-hPMCA4b-Antikörper*, der die 15 COOH-terminalen Aminosäurenreste der hPMCA4b erkennt, als auch der monoklonale Mausantikörper *JA3* (gewonnen aus der Maus, Klon JA3, Neomarkers, USA) verwendet. Bei dem Epitop des *JA3-IgG1* handelt es sich um die Aminosäurenreste 1156 bis 1180 der hPMCA4b. Anschließend wurde die Membran viermal jeweils mindestens 5 min in Waschlösung gewaschen, um ungebundene Immunglobuline zu entfernen.

Als nächstes wurden die Membranen etwa 45 min bei Raumtemperatur mit einem 1:3000 in PBS-Tween (*Phosphate-Buffered-Saline*) verdünnten sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde so gewählt, dass er an den jeweiligen primären Antikörper bindet. Deshalb wurde für den polyklonalen anti-PMCA-Antikörper ein *goat-IgG-anti-rabbit* und für den monoklonalen primären Antikörper ein gegen Mausimmunglobulin gerichteter Antikörper aus der Ziege gewählt. Beide stammten von der Firma Amersham und waren mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, mit dessen Hilfe die Banden, an die die Antikörper gebunden hatten, sichtbar gemacht werden konnten. Dazu wurde der *ECL(enhanced chemiluminescence)-Kit* verwendet. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine Reaktion dieses Reagenz mit H_2O_2 , bei der Licht emittiert wird, das auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Nachdem die Membran durch einen weiteren Waschvorgang (wie oben beschrieben) von ungebundenem IgG gereinigt worden war, wurde sie für 1 min in dem Chemilumineszenzreagenz inkubiert, das durch Mischung von gleichen Teilen der beiden Lösungen aus dem *ECL-Kit* entsteht. Die Membran wurde kurz mit *Whatmanpapier* getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt, zusammen mit einem *X-ray-Retina-Film* in eine Röntgenkassette gelegt und dort für ein bis zwei Minuten exponiert. Je nach Stärke des Signals auf dem entwickelten Film wurde ein weiterer Film kürzer oder länger belichtet.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen

3.3.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden Herzmuskelgewebe, quergestreifter Skelettmuskel und Aorta wie oben beschrieben aus der transgenen Maus entnommen, in *Tissue Tec* eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zum Schneiden des Gewebes wurde ein *Kryostat* auf -22 °C vorgekühlt. Die Gewebeschnitte in einer Schichtdicke von $8\text{ }\mu\text{m}$ wurden dann auf einem mit *Polylysine-L* beschichteten Objektträger platziert.

3.3.2.2 Färbung der Gewebeschnitte

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Darstellung von Proteinen im Zell- und Gewebeverband. Dazu wird das Gewebe auf dem Objektträger fixiert und die Integrität der Zellmembranen zerstört. Durch die entstandenen Poren sind in den folgenden Schritten auch die intrazellulär liegenden Moleküle zugänglich. Mittels eines gegen die gesuchte Struktur gerichteten Antikörpers wird diese spezifisch detektiert. Ein zweiter Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, erkennt den ersten. Im Fluoreszenzmikroskop kann der Farbstoff dann sichtbar gemacht werden und so die Anwesenheit und Lage von Proteinen im Zellverband verifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl glatte Muskelzellen als auch PMCA im selben Gewebeschnitt detektiert werden, um die Lokalisation der Kalziumpumpe in diesen Zellen nachzuweisen.

Als erster Antikörper wurde deshalb der bei der Firma SWANT erworbene, gegen den N-terminalen Bereich der hPMCA4b gerichtete Hase-anti-hPMCA4b-Antikörper *4N* und ein spezifisch nur das glattmuskuläre α -Aktin (*α -smooth muscle actine* von Sigma) erkennendes IgG 2a gewählt. Bei letzterem handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper, der, um im zweiten Schritt unspezifische Bindung mit Maus-Immunglobulin zu vermeiden, direkt mit dem Farbstoff *FITC* gekoppelt war. Um den *4N*-Antikörper sichtbar zu machen, wurde als zweiter Antikörper das *goat-anti-rabbit-*

IgG-Affinipure der Firma Jackson ImmunoResearch eingesetzt, der mit dem Farbstoff *Texas Red* gekoppelt war.

Die getrockneten Gewebeschnitte wurden zuerst in 2% Paraformaldehyd enthaltender PBS-Lösung an den Objektträger fixiert. Die Fixierung fand bei 4 °C für 15 min statt. Danach schloß sich ein Permeabilisierungsschritt an. Für diesen wurde eine mit 0,1% Triton-X versetzte PBS-Lösung verwendet. Dieser Reaktionsschritt dauerte 20 min. Um einer unspezifischen Antikörperbindung vorzubeugen wurden die Schnitte 4 h bei 25 °C in einer Blockierlösung inkubiert. Zum Blockieren wurde eine PBS-Lösung verwendet, die 2% Rinderserumalbumin und 10% Ziegen Serum enthielt.

Diese Blockierlösung wurde anschließend aspiriert und die Schnitte mit den in ebendieser Blockierlösung 1:100 verdünnten ersten Antikörpern bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte eine etwa einstündige Inkubation mit dem ebenfalls in der Blockierlösung gelösten zweiten Antikörper bei Raumtemperatur. Vor diesen beiden Schritten wie auch abschliessend wurden die Gewebeschnitte in PBS 3x5 min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in Moviol, das mit 2,5% 1,4-Diazabicyclooctan versetzt war, eingebettet. Sie wurden bei Raumtemperatur getrocknet und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach dem gleichen Prinzip wurde die Lokalisation von endogener PMCA und nNOS in glatten Gefäßmuskelzellen jeweils durch Kofärbung mit glattmuskulärem α -Aktin gezeigt.

3.3.3 Nachweis der physikalischen Interaktion zweier Proteine

3.3.3.1 Gewinnung von Proteinextrakten

Um später zu treffende funktionelle Hypothesen stützen zu können, wurde gezeigt, dass die beiden interessierenden Proteine, die PMCA und die NOS, auch physikalisch interagieren, d.h. in der Zelle eine Bindung miteinander eingehen. Dazu wurde, wie oben bereits beschrieben, aus Aorten transgener und wildtypischer Tiere jeweils ein Organlysat in RIPA-Puffer hergestellt. Dabei wurden jeweils vier Aorten gepoolt, um eine genügende Menge Protein zu gewinnen. Anschließend wurden die erhaltenen

Proteinkonzentrationen mit der Bradford-Methode im Photometer (wie oben ausgeführt) gemessen. Es wurden jeweils gleiche Mengen zum Ansatz gebracht.

3.3.3.2 Kopräzipitation zweier Proteine

Zur Kopräzipitation wurde nach einem Präinkubationsschritt die PMCA antikörpervermittelt aus dem Proteinansatz an jeweils gleiche Teile *Protein A*- und *G-Sepharose* (hergestellt von der Firma Amersham Pharmacia Biotech) präzipitiert. Dabei wurden sowohl von den transgenen als auch von den wildtypischen Aortenlysaten je drei Ansätze mit jeweils 300 μ g Protein angesetzt. Nach einer Präinkubation in *Protein A*- und *G-Sepharose* wurden in einem zweiten Schritt je ein Ansatz mit 5 μ l anti-PMCA-Serum (SWANT, Schweiz) und einer mit 5 μ g des monoklonalen gegen die humane PMCA4b gerichteten *JA3*-Antikörpers versetzt. Zum dritten Ansatz wurde jeweils ein irrelevanter Antikörper zugegeben.

Diese Ansätze wurden anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der oben beschriebene Ansatz aus *Protein A*- und *G-Sepharose* zugegeben und die Proben bei 4 °C eine Stunde inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt wurden die Ansätze dreimal mit RIPA-Puffer und abschließend einmalig mit 50mM Tris, pH 8,0 gewaschen und danach in SDS-Ladepuffer bei 95 °C fünf Minuten denaturiert.

Mit den so aufbereiteten Proben wurde ein Western Blot wie oben beschrieben durchgeführt. Als primäre Antikörper kamen polyklonales PMCA4-Antiserum, 1:500 (SWANT, Schweiz) und monoklonale Anti-nNOS-Antikörper, 1:250 (Transduction Laboratories Kat.#: N41520) zum Einsatz. Der zweite Antikörper war an Meerrettichperoxidase gekoppelt und wurde mittels *ECLTMReagenz* detektiert (Amersham Pharmacia Biotech).

3.4 Funktionelle Versuche an isolierten Aortenringen

3.4.1 Gewinnung der Aortenringe

Transgene und wildtypische Tiere wurden mittels intraperitoneal injiziertem Phenobarbital (40mg/kg KG) anästhesiert und anschließend durch Genickbruch getötet.

Die Aorta wurde in *no-touch*-Technik entnommen und sofort in 4 °C kalte Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung verbracht. Unter dem Mikroskop wurden die Gefäße mittels einer dünnen Kanüle gespült, um sie von noch vorhandenen Blutzellen zu reinigen. Verbliebenes Bindegewebe wurde vorsichtig entfernt. Die Aortenringe wurden auf eine Länge von etwa drei Millimetern zugeschnitten.

3.4.2 Kontraktions- bzw. Relaxationsversuche

Die Aortenringe wurden mittels feinen Drahtklammern aufgehängt und in ein mit Krebslösung gefülltes Organbad verbracht. Hier wurden sie mit einer Vorrichtung verbunden, die einerseits Dehnungskraft auf das Gewebe übertragen kann und andererseits die Gegenkontraktion der Aortenringe registriert. Es folgte eine Inkubationsphase von einer Stunde. Anschließend wurde die Inkubationslösung dahingehend modifiziert, dass die KCl-Konzentration 100 mmol/l betrug. In diesem Milieu wurden die Aortenringe langsam unter Spannung gesetzt, bis die Kontraktionsantwort maximal ausfiel. Dies war bei $2,0 \pm 0,2$ g der Fall. Der Wert dieser Kontraktionsantwort wurde als Referenzwert verwendet.

Um die Relaxationsantwort auf Acetylcholin (10^{-10} – 10^{-7} mol/l) oder Nitroprussid-Natrium (10^{-11} – 10^{-5} mol/l) zu verifizieren, wurden die Ringe vorher mittels Noradrenalin (10^{-8} – 10^{-7} mmol/l) auf etwa 70% des obigen Referenzwertes vorkontrahiert. In einem weiteren Schritt wurde das Verhalten des Gefäßtonus unabhängig von endothelialen Einflussgrößen untersucht. Dazu wurde das Endothel durch vorsichtiges Reiben auf einer dünnen Kanüle entfernt und dessen Fehlen durch ausbleibende Relaxation auf Acetylcholin (3×10^{-6} mol/l) bestätigt. Das Kontraktionsverhalten der transgenen und wildtypischen deendothelialisierten Aortenringe wurde unter steigenden Konzentrationen von KCl (1 – 100 mmol/l) gemessen. In einem weiteren Schritt wurden die gleichen Messungen nach halbstündiger Inkubation mit L-NG-Nitroargininmethylester (L-NAME, 3×10^{-5} mol/l) wiederholt. L-NAME ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und kaschiert so deren gefäßrelaxierenden Effekt.

3.4.3 Statistische Auswertung

Die Antwort der isolierten Aortenringe auf relaxierende Substanzen wurde als Prozentsatz der durchgeführten Vorkontraktion angegeben. Letztere wurde wie oben beschrieben für jeden Ring mittels Noradrenalin auf etwa 70% des Referenzwertes bei 100 mmol/l KCl eingestellt. Die Kontraktion in ansteigenden Konzentrationen von KCl wurde als Prozentsatz des Referenzwertes bei 100 mmol/l KCl ausgedrückt, der zu Anfang des Experiments für jeden Versuchsansatz eingestellt wurde.

Von jeder Maus wurden drei Aortenringe untersucht und die Ergebnisse gemittelt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde die Sensitivität der einzelnen Gefäßringe als negativer Logarithmus der Konzentration angegeben, die eine halbmaximale Kontraktion oder Relaxation bewirkte. Die maximale Relaxation (bezogen auf den Vorwert, s.o.) bzw. Kontraktion wurde gegen den negativen dekadischen Logarithmus der jeweiligen Konzentration des Agens nichtlinear aufgetragen. Zur Auswertung wurde das Softwareprogramm *MatLab* (Math Works Inc., Natick, MA) verwendet. Für den Vergleich zweier Werte wurde gegebenenfalls der ungepaarte t-Test oder der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Vergleiche mehrerer Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur analysiert. Der Korrelationskoeffizient wurde durch lineare Regression bestimmt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis des integrierten Transgens

Die mittels *DNeasy Kit* (s. Angaben des Herstellers) gewonnene DNA wurde anschließend mit Hilfe zweier passender Restriktionsenzyme so zerschnitten, dass das Transgen isoliert wurde. Dazu dienten die Enzyme *KpNI* und *Bam HI* der Firma Amersham Biosciences. Danach wurde gemäß dem Southern-Blot-Verfahren das Transgen mittels einer radioaktiv markierten Sonde detektiert.

Abbildung 3 zeigt deutlich signalgebend die Proben derjenigen Mäuse, die das Transgen im Genom integriert hatten, im Vergleich mit Wildtyp-Kontrollen (fehlende Banden). In der ersten Bahn sieht man den unspezifisch bindenden 1Kb-Marker.

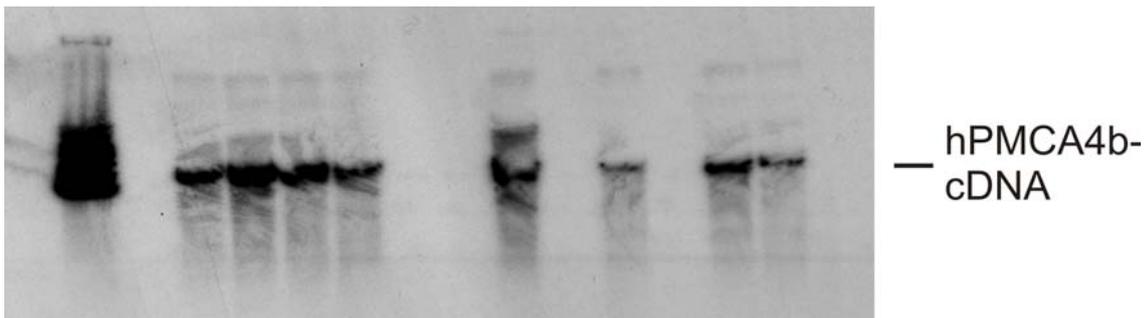


Abbildung 3: Southern-Blot zur Verifizierung des Einbaus des Transgens ins Genom der untersuchten Tiere. Durch eine radioaktiv markierte DNA-Sonde der hPMCA4b lassen sich transgene Tiere erkennen (schwarze Banden). Nicht transgene Proben zeigen kein positives Signal. In der ersten Bahn läuft ein 1Kb-Marker.

4.2 Nachweis der Transkription des Transgens

Um die Transkription des Transgens nachzuweisen, wurden Zellextrakte von Tieren mit positivem hPMCA4b-DNA-Befund auf ihren Gehalt an spezifischer mRNA überprüft. Mit der zur Detektion der entsprechenden RNA eingesetzten RT-PCR konnte aus kleinen Mengen Ausgangs-RNA eine zum Nachweis ausreichende Menge an

korrespondierender cDNA amplifiziert werden. Hierzu ist ein Zwischenschritt notwendig, in dem die reverse Transkriptase RNA retrograd in cDNA überführt.

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis dieser Versuche. Die Banden entsprechen der aus der hPMCA4b-mRNA amplifizierten cDNA. Abbildung 4 zeigt eine Mauslinie, die in allen untersuchten Organen hPMCA4b transkribiert und bei der sich entsprechend in allen untersuchten Organlysaten die zugehörige mRNA findet. Dieses Ergebnis wurde damit erklärt, dass jedes Organ über vaskuläre glatte Muskelzellen verfügt, in denen das Transgen aufgrund der Kopplung an den SM22 α -Promotor exprimiert werden sollte. Auch bei diesem Verfahren wurden zur Kontrolle eine Positiv- und eine Leerprobe (*no-template*) mitgeführt. Außerdem wurden im selben Versuchsaufbau RNA-Proben von Tieren eingesetzt, die nicht transgen waren. Bei diesen konnte folgerichtig keine entsprechende cDNA amplifiziert bzw. nachgewiesen werden.

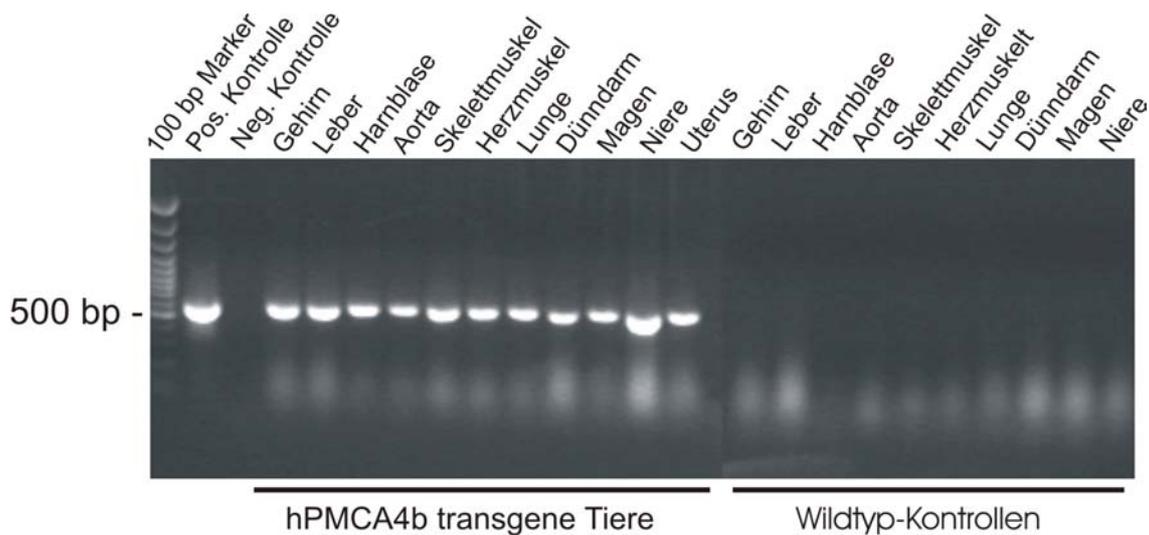


Abbildung 4: RT-PCR verschiedener Organproben transgener und wildtypischer Tiere. Transgene Mäuse zeigen in allen untersuchten Proben die hPMCA4b-mRNA. Wildtypische Tiere zeigen in keiner Probe ein entsprechendes Signal. In den ersten Bahnen laufen ein 1Kb-Marker, eine Positivprobe aus hPMCA4b-transfizierten HEK-Zellen und eine Leerprobe (*no template*).

4.3 Nachweis des Translationsprodukts

4.3.1 Proteinnachweis aus Zellextrakten

Auf Proteinebene wurde die PMCA im Western Blot in einzelnen Organen nachgewiesen. Dabei sah man eine Expression in Aorta, Skelettmuskel, Lunge, Niere, Leber und Magen. Als Positivprobe diente ein Proteinextrakt aus mit hPMCA4b-transfizierten HEK-Zellen. Das gesuchte Protein wurde mittels eines gegen hPMCA4b gerichteten polyklonalen Antikörpers markiert (Abb. 5).

Die weiteren Untersuchungen wurden mit Tieren einer Mauslinie durchgeführt, die sowohl auf RNA-Ebene als auch beim Nachweis des zugehörigen Proteins eine gute Expression des Transgens zeigten.

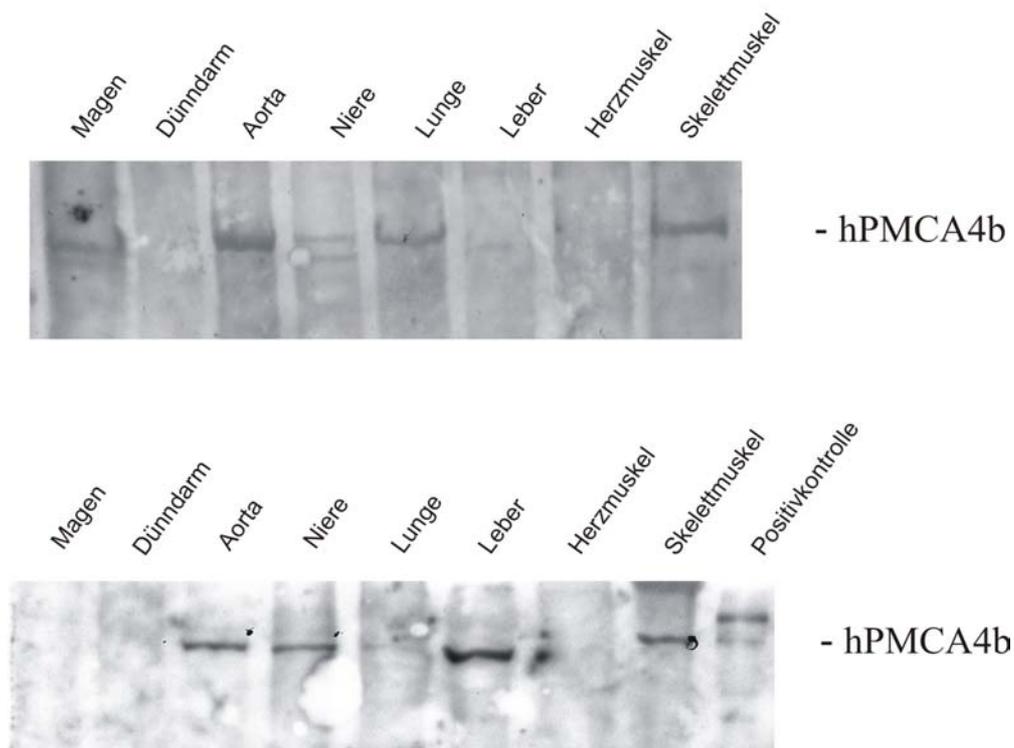


Abbildung 5: Zwei repräsentative Western Blots von Organlysaten transgener Tiere. Entsprechend der Verteilung der Banden konnte in verschiedenen Organen das Proteinprodukt des Transgens nachgewiesen werden. Bezüglich der Probe aus dem Magen zeigte sich interindividuell ein unterschiedliches Expressionsverhalten.

Doppelbanden und teilweise leicht unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten resultieren am ehesten aus unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen des Enzyms (vgl. [42, 74, 77]).

4.3.2 Lokalisationsnachweis der PMCA in glatten Gefäßmuskelzellen

Das Ziel der Arbeit war, Aussagen über das Verhalten des Gefäßmuskeltonus und damit über die Regulation des Blutdrucks durch die PMCA bei transgenen Tieren zu machen. Deshalb war es wichtig, den Nachweis zu erbringen, dass das Transgen in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden Immunfärbungen durchgeführt.

Zur Detektion glatter Gefäßmuskelzellen wurde ein Antikörper gegen das glattmuskuläre α -Aktin verwendet. Da es sich um einen monoklonalen Mausantikörper handelte, war er direkt mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff *FITC* gekoppelt. Die Gegenfärbung der humanen PMCA4b wurde mit einem gegen deren C-Terminus gerichteten polyklonalen Antikörper durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde dieser dann mit einem gegen ihn gerichteten Antikörper, welcher mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff *Texas Red* gekoppelt war, detektiert.

Abbildung 6 zeigt die Färbung von α -Aktin in glatten Muskelzellen und im Vergleich dazu die hPMCA4b-Färbung. Rechts sind jeweils eine Überlagerung der beiden Färbungen und damit die Kolo-kalisation der beiden Proteine dargestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass das Transgen in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird. Es sind Schnitte aus Aorta, Niere und Skelettmuskel abgebildet.

Nach demselben Prinzip zeigt Abbildung 7 die Färbung von endogener PMCA mit dem polyklonalen Antikörper *4N*, der PMCA4 in Mensch, Ratte und Maus erkennt. In Abbildung 7 ist die nNOS entsprechend durch einen spezifischen polyklonalen Antikörper markiert. Diese Färbungen sind jeweils in Schnitten durch die Gefäßwand der Aorta gezeigt und beide Male einer Färbung von glattmuskulärem α -Aktin gegenübergestellt. Die erneut durchgeführte Überlagerung weist kongruentes Expressionsverhalten der beiden Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen nach.

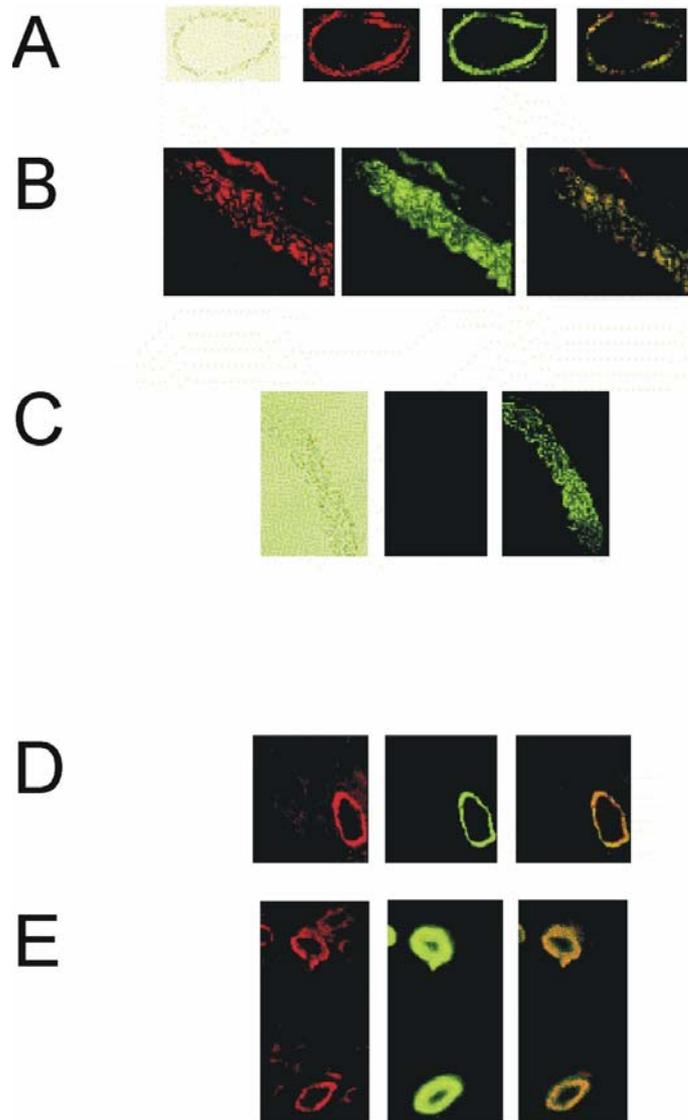


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Organschnitte. (A) zeigt einen Schnitt durch die Aorta. Man sieht eine lichtmikroskopische Aufnahme und daneben Fluoreszenzaufnahmen. Jeweils spezifische Antikörper markieren hPMCA4b rot (*Texas Red*) und glattmuskuläres α -Actin grün (*FITC*). Die Überlagerung zeigt die Lokalisation der hPMCA4b in glatten Myozyten. (B) Detailvergrößerung der unter (A) demonstrierten Schnitte. (C) Der sekundäre Antikörper zur PMCA-Färbung zeigt keine unspezifische Bindung (Mitte) oder Kreuzreaktion mit FITC-gekoppeltem gegen glattmuskuläres α -Actin gerichtetem Antikörper (rechts). Links eine Phasenkontrast-Abbildung. (D) zeigt ein Beispiel von Gefäßen in einem Schnitt durch Skelettmuskel, (E) ein entsprechendes Beispiel in einem Schnitt durch Nierengewebe (Färbung und Überlagerung jeweils wie unter (A))

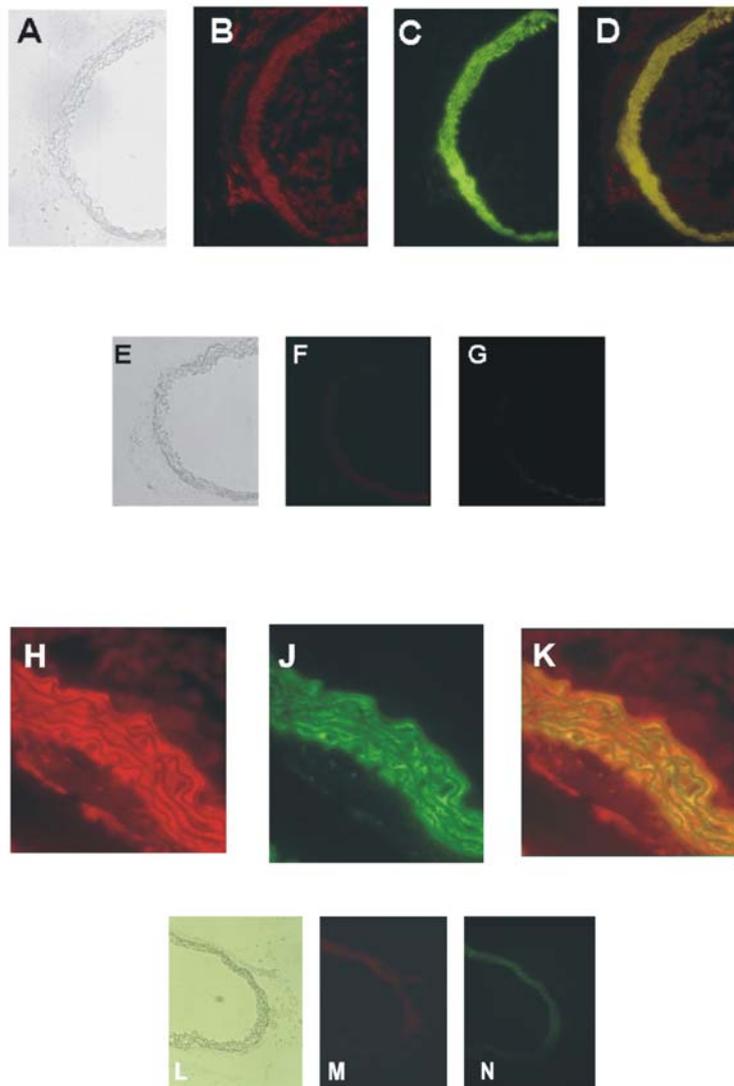


Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbungen von Schnitten durch die Aorta wildtypischer Tiere. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme, (B) rote Färbung von endogener PMCA mit einem entsprechenden Antikörper gegen PMCA und einem sekundären *Texas Red*-gekoppelten Antikörper. (C) Färbung glatter Muskelzellen mit einem *FITC* (grün)-gekoppelten Antikörper gegen glattmuskuläres α -Aktin. (D) zeigt die Überlagerung beider Schnitte und damit die Lokalisation der PMCA in glatten Myozyten. (E) Lichtmikroskopische Aufnahme. (F) zeigt keine unspezifischen Bindungen des sekundären *Texas Red*-gekoppelten Antikörpers ohne vorherigen spezifischen Antikörper, (G) zeigt keine Eigenfluoreszenz des Gewebes. (H)-(K) Färbungen zum Nachweis der Lokalisation der nNOS in glatten Muskelzellen entsprechend (B)-(D) mit einem spezifischen Antikörper gegen nNOS. (L)-(N) Kontrollen entsprechend (E)-(G).

4.3.3 Nachweis der physikalischen Interaktion von PMCA und nNOS

Um funktionelle Aussagen über die Interaktion beider Enzyme treffen zu können, wurde deren physikalische Interaktion *in vivo* nachgewiesen. Dazu wurde eine Kopräzipitation von PMCA und nNOS durchgeführt. PMCA wurde mittels spezifischer Antikörper aus Proteinlysaten wildtypischer und transgener Tiere an *Sepharosebeads* gebunden. Falls nNOS *in vivo* mit PMCA physikalisch interagiert, ist auch sie über eine Bindung der PMCA an den *beads* immobilisiert. Mit einem spezifisch gegen nNOS gerichteten Antikörper kann sie dann nach Verwerfen des Restproteinextrakts und Auftrennung im Western Blot (s.o.) nachgewiesen werden.

Zur Präzipitation der PMCA4b wurde ein polyklonales gegen die Isoform 4b der PMCA gerichtetes Antiserum bzw. ein spezifisch nur das humane Enzym erkennender Antikörper (*JA3*) verwendet und endogene nNOS mit einem polyklonalen anti-nNOS-Antikörper kopräzipitiert. Als Ergebnis zeigt sich bei mengengleichen Gesamtproteinansätzen eine deutlich stärkere Bande beim Nachweis der Gesamt-PMCA-Menge bei den transgenen Tieren, wie das bei einem dieses Protein überexprimierenden Tier zu erwarten ist. Beim Nachweis der an die PMCA gebundenen nNOS läßt sich eine Kopräzipitation bei transgenen Tieren mit beiden präzipitierenden PMCA-Antikörpern zeigen, während das in wildtypischen Tieren nur mit dem auch die Maus-PMCA erkennenden Antiserum möglich ist. Um unspezifische Bindung an die *beads* auszuschließen wurde auch ein irrelevanter Antikörper eingesetzt.

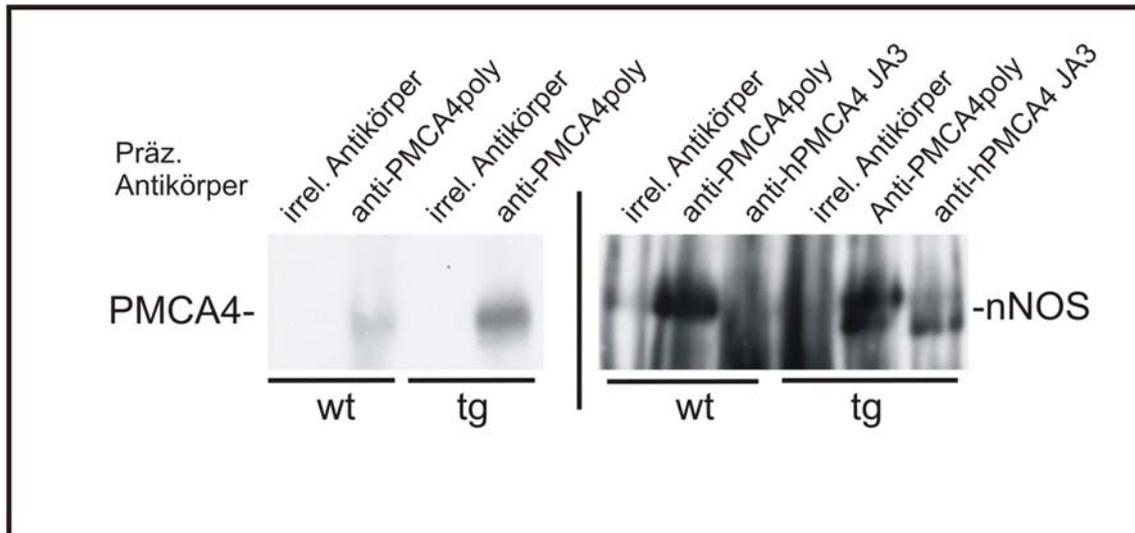


Abbildung 8: Immunopräzipitation von endogener PMCA4 und transgener hPMCA4b mit einem polyklonalen Serum gegen PMCA4 bzw. dem spezifisch gegen hPMCA4b gerichteten Antikörper *JA3* aus Gewebelysaten von Aorten. Links ist die Präzipitation von PMCA4 mit dem polyklonalen Serum bei wildtypischen (wt) und transgenen (tg) Tieren gezeigt. Rechts wird die Kopräzipitation von nNOS mit PMCA4 (mittlere Bahn) bzw. hPMCA4b (rechte Bahn) demonstriert. Dabei kann keine Kopräzipitation von hPMCA4b und nNOS bei Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. Ebenso zeigen sich bei beiden Gruppen keine unspezifischen Signale bei Präzipitation mit einem irrelevanten Antikörper (anti-Östrogen-Rezeptor β).

4.4 Funktionelle Untersuchungen an isolierten Aortenringen

4.4.1 Endothelabhängige Relaxation

Um Aussagen über den Einfluss einer Überexprimierung der PMCA auf den glattmuskulären Gefäßmuskeltonus treffen zu können, wurde die Relaxation isolierter Aortenringe (wie oben beschrieben) endothelabhängig und endothelunabhängig untersucht. Die NO-Produktion durch die NOS stellt ein wesentliches relaxierendes und für das Ziel dieser Arbeit interessierendes Moment dar. In den verschiedenen Teilen der Gefäßwand finden sich zwei Isoformen dieses Enzyms. Die eNOS im Endothel und die nNOS in den Myozyten.

Die Relaxation auf Acetylcholin in PMCA-transgenen und nNOS-knockout-Mäusen (Vektor von Paul Huang, erworben bei Jax Mice) wurde jeweils im Vergleich zu wildtypischen Tieren untersucht. Abbildung 9 zeigt die Stärke der Relaxation in Prozent der Vorkontraktion (s.o.). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Relaxationsverhalten beim Vergleich von PMCA-transgenen und wildtypischen Tieren ($60\pm 8\%$ vs. $67\pm 7\%$ bei maximaler Relaxation). Beim Vergleich der nNOS-knockout-Tiere mit den Wildtyp-Kontrollen ließ sich die halbmaximale Relaxation bei gleicher Acetylcholinkonzentration erreichen ($4,8 \times 10^{-8}$ mol/l vs. $5,2 \times 10^{-8}$ mol/l; n.s.), während die knockout-Tiere eine geringere prozentuale maximale Relaxation zeigten. Dieses Ergebnis läßt auf einen relaxierenden Einfluss der NO-Produktion der nNOS auf den Gefäßmuskeltonus schließen.

4.4.2 Endothelunabhängige Relaxation

Zur Untersuchung der endothelunabhängigen Relaxation wurden analoge Versuche durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass als relaxierendes Agens Nitroprussid-Natrium an Stelle von Acetylcholin verwendet wurde. So konnte der Effekt der NOS durch ein Überangebot an direkt vorhandenem NO kaschiert werden, welches durch Nitroprussid-Natrium nichtenzymatisch zur Verfügung stand.

Weder PMCA-transgene Tiere noch nNOS-knockout-Mäuse zeigten signifikante Unterschiede im Relaxationsverhalten der entsprechenden Aortenringe im Vergleich mit Wildtyp-Kontrollen. Dies zeigt, dass die Signaltransduktion jenseits der NO-Produktion durch die NO-Synthasen sowohl in PMCA-transgenen als auch in nNOS-knockout-Tieren unbeeinflusst ist (Abbildung 10).

4.4.3 Kontraktion in KCl-Lösung

Aortenringe wildtypischer und transgener Tiere wurden deendothelialisiert, um den relaxierenden Effekt der endothelialen NOS auszuschalten. Anschließend wurden sie mit Hilfe des Kraftüberträgers wie oben beschrieben vorkontrahiert. Die Größe der Kraft entsprach dabei der, bei der vorher die maximale Kontraktionsantwort in 100 mmol/l KCl-Lösung festgestellt worden war. Mit dieser Vorkontraktion als

Referenzwert wurden die Kontraktionsantworten der Aortenringe in steigenden Konzentrationen von KCl-Lösung gemessen. KCl depolarisiert dabei in unphysiologisch hoher Konzentration die Muskelzelle und löst so deren Kontraktion aus. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz des Referenzwertes in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration aufgetragen.

Deendothelialisierte Aortenringe von PMCA-transgenen Mäusen erreichten dabei eine signifikant höhere maximale Kontraktionsantwort im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen ($86\pm 6\%$ vs. $68\pm 7\%$; $p < 0,05$). In einem zweiten Schritt wurden die Ringe in L-NAME vorinkubiert. Dies ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und blockiert so den durch das jetzt nicht mehr synthetisierte NO hervorgerufenen relaxierenden Effekt. In diesen Versuchen zeigte sich eine insgesamt signifikant stärkere Kontraktionsantwort im Vergleich zum selben Ansatz ohne L-NAME ($p < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied zwischen transgener und wildtypischer maximaler Antwort bestand nicht mehr ($111\pm 7\%$ vs. $105\pm 7\%$, n.s.).

Nach demselben Verfahren wurden nNOS-knockout-Mäuse mit Wildtyp-Kontrollen verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant stärkere maximale Kontraktionsantwort der knockout-Tiere ($151\pm 5\%$ vs. $131\pm 6\%$; $p < 0,05$), was den vasodilatierenden Effekt des durch nNOS produzierten NO demonstriert.

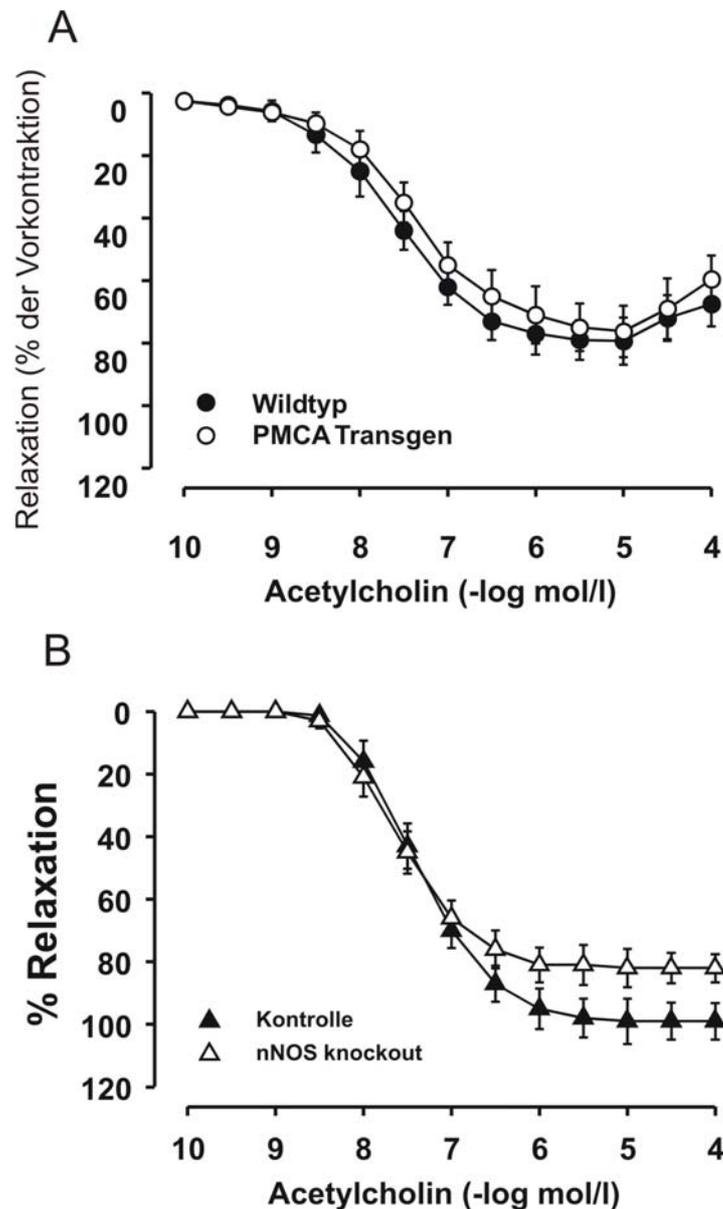


Abbildung 9: Endothelabhängige Relaxation von Aortenringen auf Acetylcholin. (A) Nach Vorkontraktion mit Noradrenalin (10^{-7} mol/l) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Relaxationsverhalten transgener und wildtypischer Aortenringe bei intaktem Endothel (Mittelwert±Standardabweichung, n=6). (B) Der Vergleich von nNOS-knockout Tieren und wildtyp-Kontrollen ergab eine deutlich stärkere Kontraktionsantwort bei den knockout-Mäusen (Mittelwert±Standardabweichung, n=5; Vorkontraktion wie unter (A). Bei fehlenden Fehlerbalken war die Standardabweichung kleiner als die Symbolgröße.

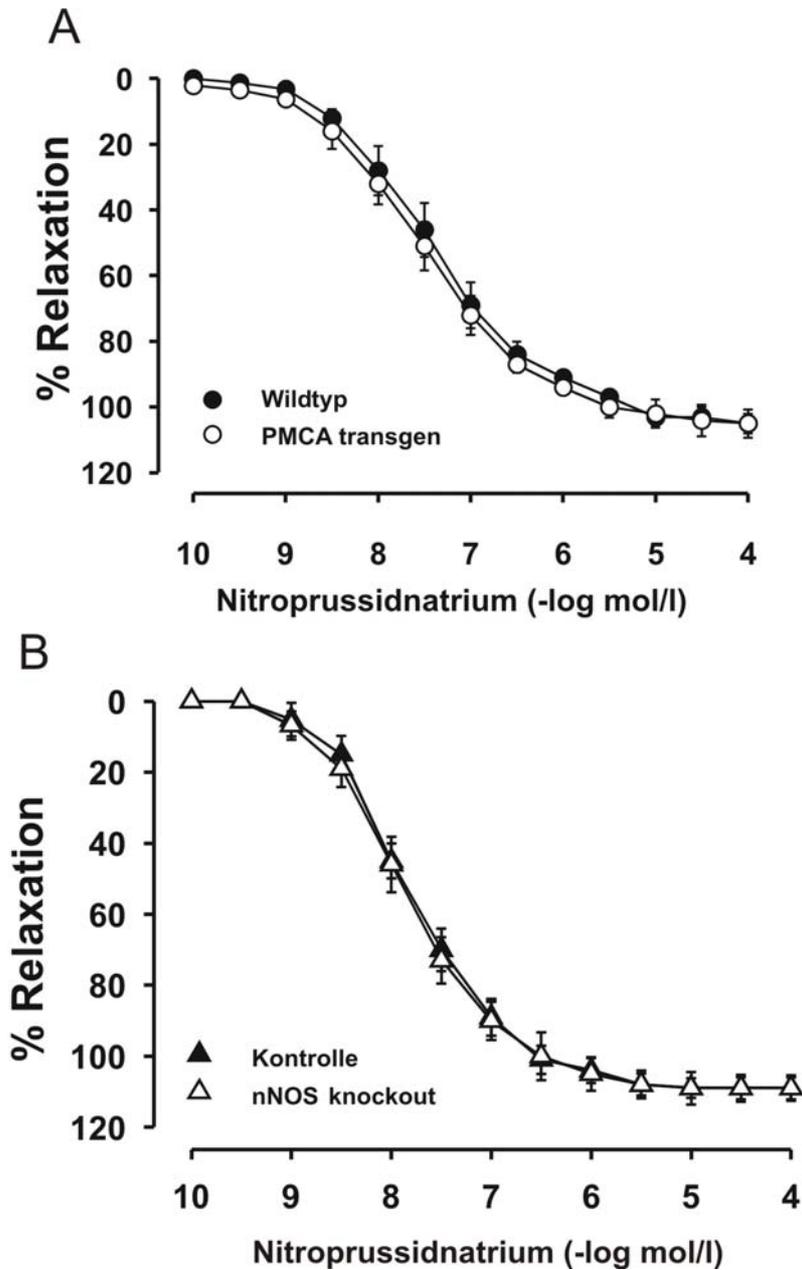


Abbildung 10: Endothelunabhängige Relaxation deendothelialisierter Aortenringe in Prozent der Vorkontraktion durch Noradrenalin (10^{-7} mol/l) auf Nitroprussid-Natrium. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung; bei fehlenden Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als die Symbolgröße. (A) Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Kontraktionsantwort von PMCA-transgenen und wildtypischen Tieren (n=6). (B) Ebenso erhält man bei entsprechenden Vergleichsuntersuchungen von nNOS-knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen keine unterschiedlichen Ergebnisse (n=5).

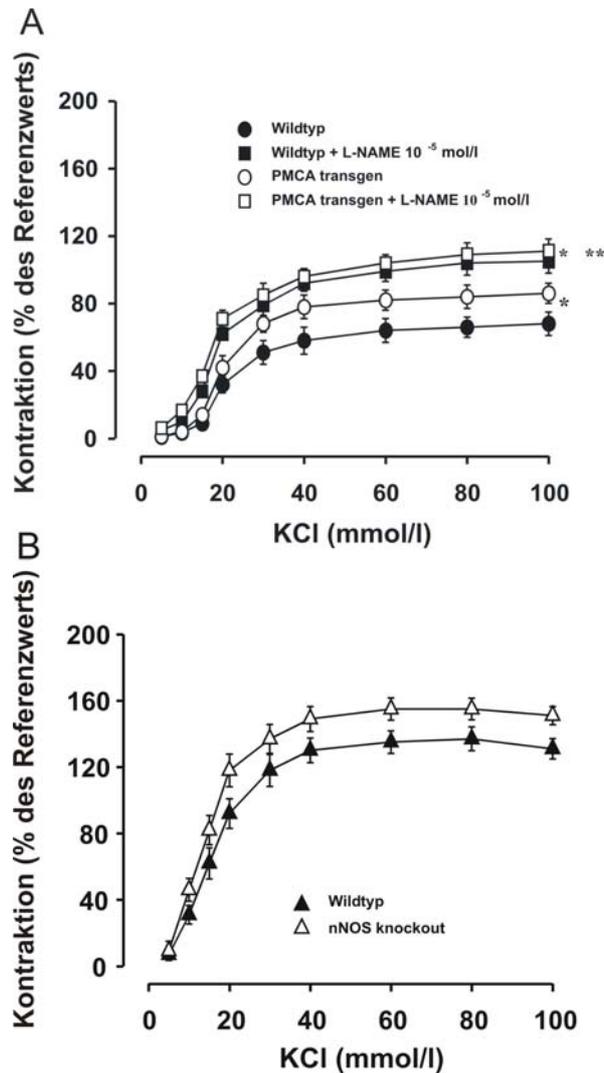


Abbildung 11: Kontraktionsantworten deendothelialisierter Aortenringe auf KCl in Prozent des Referenzwerts bei 100 mmol/l KCl. Angegeben sind jeweils Mittelwert±Standardabweichung; bei fehlenden Fehlerbalken ist die Standardabweichung kleiner als die Symbolgröße. (A) Vergleich des Kontraktionsverhaltens transgener und wildtypischer Tiere ohne und mit Vorbehandlung durch L-NAME: es zeigt sich eine signifikant stärkere Kontraktionsantwort bei Aortenringen transgener Mäuse ohne L-NAME Vorbehandlung (* $p < 0,05$ vs. Wildtyp; $n=6$), während dieser Unterschied nach Präinkubation nicht mehr auftritt (bei insgesamt signifikant stärkerer Kontraktion; ** $p < 0,05$ vs. fehlende L-NAME Präinkubation; $n=5$). (B) Entsprechender Vergleich von nNOS-knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen: der Unterschied im Kontraktionsverhalten ist signifikant (* $p < 0,05$; $n=5$).

5 Diskussion

5.1 Das transgene Modell

Ziel dieser Arbeit war es, Aussagen über physiologische Aufgaben der Plasmamembran-Kalzium-ATPase zu machen. Dazu war ein transgenes Tiermodell generiert worden. In einem solchen Modell wird das entsprechende Protein überexprimiert, d.h. ein Vielfaches der natürlich vorkommenden Menge des spezifischen Proteins wird in den entsprechenden Zellen produziert. So treten die Effekte des untersuchten Enzyms deutlicher zu Tage (*gain of function*).

Transgene Tiermodelle kombinieren die Möglichkeiten und Vorteile eines genetisch veränderten Organismus mit molekularer und funktioneller Physiologie. Die Vorteile eines genetisch veränderten Tiermodells treten besonders dann hervor, wenn man sich vergegenwärtigt, dass es zwar eine große Anzahl an hoch konservierten Proteinen gibt – und die PMCA ist eines davon (Übersicht in [18]) – die vom Tiermodell auf den menschlichen Organismus schließen lassen, dass aber durch unterschiedliche physiologische Abläufe und verschiedene äußere Einflüsse die Aussagekraft dieser Schlüsse gemindert wird. Dem kann vorgebeugt werden, indem man transgene Modelle für bestimmte interessierende menschliche Proteine schafft. Dies ist umso mehr der Fall, wenn das Transgen unter die Kontrolle eines Promotors gestellt wird, der so gewählt ist, dass die Expression nur in bestimmten, gewünschten Geweben stattfindet. Eine Alternative stellt die Beeinflussung bestimmter Enzyme durch Pharmaka *in vivo* dar. Diese trägt aber weder dem oben angesprochenen Problem der unterschiedlichen Spezies Rechnung, noch kann man davon ausgehen, dass ein solches Vorgehen so spezifisch wirkt, dass nicht andere oder folgende physiologische Abläufe beeinträchtigt werden. Dies macht die Überlegenheit eines genetisch veränderten Modells offenkundig.

Trotzdem gibt es natürlich auch bei solchen Modellen Grenzen. Das Transgen wird randomisiert in die DNA der Maus eingebaut, so dass es potentiell eine regulierende oder sogar kodierende Gensequenz unterbrechen kann. So besteht die Gefahr, dass ein bestimmtes Gen verändert oder gar nicht mehr exprimiert wird, was ohne Zutun des Transgens zu einem veränderten Phänotyp führen kann. Dies ist insbesondere dann

problematisch, wenn es sich um ein Gen handelt, dass in den zu untersuchenden Prozeß involviert ist. Außerdem hat der genetische Hintergrund der verwendeten Mauslinie und die Tatsache, ob das Transgen gewebespezifisch oder ubiquitär exprimiert wird Einfluss auf den entstehenden Phänotyp [111, 112]. Trotzdem bleibt die transgene Überexpression ein sehr erfolgreiches Modell, wenn es darum geht, die Rolle einzelner Gene im gesunden oder kranken Organismus zu untersuchen (Übersicht in [113]).

5.2 Transgen und Promotor

Die PMCA wurde in diesem Fall unter Kontrolle des SM22 α -Promotors gestellt. Dies geschah deshalb, da es Ziel der Arbeit war, die Rolle der PMCA in der Regulation des Gefäßmuskeltonus näher zu untersuchen. Das SM22 α -Gen besteht aus fünf Exons und umfasst 6,2 Kb. Im adulten Organismus wird es nur in glatten Muskelzellen exprimiert. Es stellt einen der frühesten Marker differenzierter glatter Muskelzellen dar. SM22 α wird im Gegensatz zu den kontraktilen Proteinen der Myozyten sowohl im Ruhestadium als auch im Proliferationsstadium in hohem Maße exprimiert [92]. Diese Tatsachen machen dessen Promotor zu einem idealen Promotor eines Gens, dessen Funktion in glatten Muskelzellen untersucht werden soll.

Die hPMCA4b ist wie beschrieben eine Isoform der Plasmamembran-Kalzium-ATPasen, die im adulten Organismus nahezu ubiquitär exprimiert wird (Übersicht in [18]). Eine physiologische Aufgabe der PMCA ist es, ähnlich wie eine Reihe anderer kalziumtransportierender Proteine, Kalziumionen aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum bzw. bestimmte Zellkompartimente wie das sarkoplasmatische Retikulum der Muskelzellen zu pumpen. Man geht heute davon aus, dass pro hydrolysiertem ATP ein Kalziumion transportiert wird. [49, 114].

Kalziumionen strömen über spannungsabhängige Kalziumkanäle in die Muskelzellen, wenn diese depolarisieren. Ab einer intrazellulären Konzentration von etwa 10^{-7} mol/l wird dann über den Kalziumkalmodulinkomplex die Myosinkinase aktiviert, die ihrerseits das Myosin phosphoryliert. Dieser Vorgang stellt eine Voraussetzung für die Interaktion von Myosin und Aktin und die damit verbundene Kontraktion der Muskelzelle dar (Übersicht in [115]).

Zum Beenden des Kontraktionsvorgangs muß die intrazelluläre Kalziumkonzentration erneut absinken. Blausteins Hypothese besagt, dass dabei der elektrochemische Gradient für Natriumionen die entscheidende Rolle spielt. Dieser ist für Natriumionen in die Zelle gerichtet und treibt unter anderem einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher an. Dabei muß dieser Transport an einem bestimmten Punkt aufhören, da Gefäßmuskelzellen konstant einen gewissen Tonus aufrechterhalten müssen, um den peripheren Widerstand zu garantieren. Trotzdem ändert sich durch unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen die Stärke dieses Gradienten, damit die intrazelluläre Kalziumkonzentration und daraus folgend der Gefäßtonus [116]. Dies geschieht vor allem durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Dieser katalysiert den Austausch eines intrazellulären Ca^{2+} -Ions gegen drei extrazelluläre Na^+ -Ionen [117, 118]. Die Wichtigkeit dieses Transporters für die Kontrolle der intrazellulären Kalziumkonzentration bzw. die Auswirkungen eines Fehlens desselben auf das Kontraktionsvermögen von Myozyten konnte bei knockout-Mäusen für die vor allem im Herzmuskel exprimierte Isoform 1 des in drei Isoformen vorkommenden Transporters gezeigt werden. Homozygote Tiere mit der entsprechenden Mutation waren nicht lebensfähig. Es liegen auch Daten zur Regulation der Aktivität dieses Proteins in glatten Muskelzellen durch Phosphorylierung vor [119, 120].

Man würde also erwarten, dass ein Enzym, das den Transport von Kalziumionen aus der Zelle katalysiert, dazu beiträgt, den Gefäßmuskeltonus durch eine Senkung des intrazellulären Kalziums zu mindern. Dies würde über einen geringeren gesamten peripheren Widerstand zu einem Absinken des Blutdrucks führen. Es gibt aber einige Hinweise, die Zweifel daran aufkommen lassen, dass die PMCA dieselbe physiologische Rolle erfüllt wie der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter. In nicht erregbaren Zellen ist die PMCA das einzige bekannte Enzym, das Kalzium aus der Zelle pumpt. Deshalb wurde postuliert, dass sie für die Aufrechterhaltung des Kalziummilieus verantwortlich sei (Übersicht in [24]). In erregbaren Zellen findet sich allerdings der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, dessen Transportkapazität für Kalziumionen im Vergleich zur PMCA sehr viel größer ist, wie in isolierten Kardiomyozyten gezeigt werden konnte [121]. Mehr als eine Feinregulation der Kalziumhomöostase scheint die PMCA in Gegenwart eines so effektiven Systems nicht leisten zu können. Auch die sehr hohe Konservierung der Kalziumpumpe (Übersicht in [18]) deutet eher auf eine übergeordnete Funktion hin.

So konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die PMCA in den Prozeß der Gewebedifferenzierung involviert ist. Darauf deutet auch die große Anzahl an unterschiedlichen Spliceprodukten und die zum Teil sehr spezifische Gewebeverteilung dieser Unterformen hin [54]. Weiterhin konnte der Einfluss von Kalziumkonzentration bzw. der von Kalmodulin auf den Ruhe- bzw. Aktivitätszustand von Zellen gezeigt werden. Untersuchungen des Zusammenhangs von intrazellulärer Kalziumkonzentration in PMCA-überexprimierenden Muskelzelllinien und deren Wachstum und Differenzierung lassen die PMCA als ein Enzym erscheinen, dessen Funktion über die Aufrechterhaltung des Kalziumhaushalts der Zelle hinausgeht [122].

In Kardiomyozyten aus transgenen Ratten, die die PMCA4 myokard-spezifisch überexprimierten, konnten weder im basalen noch im stimulierten Kontraktionsverhalten des Herzens Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden werden. Ebenso wenig waren die Kalziumströme unterschiedlich. Dagegen wurden deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Kardiomyozyten gefunden [108].

5.3 Lokalisation der PMCA in der Zelle

Die PMCA ist sicher nicht ausschließlich in Caveolae lokalisiert, sondern über die gesamte Plasmamembran verteilt. Trotzdem findet sich eine deutlich erhöhte Konzentration der PMCA in diesen speziellen Zellmembranabschnitten [80]. Diese verfügen über ein spezielles Kalziummilieu, das sich von dem des übrigen Zytoplasmas unterscheidet. Somit sind Caveolae auf der einen Seite an der Regulation des Kontraktionsverhaltens der glatten Muskelzellen beteiligt, indem sie Kalziumionen entsprechend verschieben [123], und initiieren endozytotische Prozesse [124]. Auf der anderen Seite finden in Caveolae diverse, v.a. Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktionskaskaden statt. Caveolae sind reich an verschiedenen Signaltransduktionsmolekülen. Neben PMCA finden sich dort G-Proteine, verschiedene PKC-Isoformen, Proteine aus der Familie der IP_3 -Rezeptoren, Caveolin, Kalmodulin und NOS [81].

5.4 PMCA und NOS

Die verschiedenen Isoformen der NO-Synthase finden sich in den entsprechenden Zellen ebenfalls bevorzugt in Caveolae. So konnte im Hamster gezeigt werden, dass nNOS und Caveolin 1 bzw. 3 in Gefäßmuskelzellen kolokalisiert sind [85]. Caveolin könnte somit einerseits zum *targeting* beitragen. Andererseits konnte für NOS gezeigt werden, dass deren Aktivität durch Bindung von Caveolin gehemmt wird. Durch Kalziumkalmodulin dagegen wird der Substratumsatz gesteigert [102]. Wie bereits eingangs erwähnt, wird PMCA ebenfalls durch Kalziumkalmodulin aktiviert. Dieser gemeinsame Regulationsmechanismus legt eine noch näher zu charakterisierende funktionelle Verbindung beider Proteine nahe.

Weiterhin wurde gezeigt, dass nNOS über eine PDZ-Domäne verfügt [105-107]. Verschiedene Proteine konnten identifiziert werden, die über diesen Mechanismus mit nNOS kommunizieren. PMCA4b, die PDZ-Domänen binden kann [45], interagiert mit nNOS und kann so dieses Enzym regulieren [86]. In einem einfachen Modell könnte die Kalziumkalmodulinkonzentration im Mikromilieu der Caveolae durch Verschiebung von Kalziumionen in den Extrazellulärraum gesenkt werden. Die PMCA könnte dann die Aktivität der nNOS inhibieren. Diese Inhibition hat wahrscheinlich Auswirkungen auf den intrazellulären cGMP-Spiegel und dessen Folgewirkungen.

5.5 Regulation des Gefäßmuskeltonus bei hPMCA4b überexprimierenden Mäusen

5.5.1 Die relevanten Proteine in der Muskelzelle

In der vorliegenden Arbeit wurden die oben diskutierten Erkenntnisse über die Rolle der sarkolemmalen kalmodulinabhängigen Kalzium-ATPase im Regulationsprozeß des Tonus glatter Muskelzellen auf ein *in vivo* Modell übertragen und Folgerungen bezüglich deren Auswirkungen auf komplexere physiologische Abläufe im Gesamtorganismus gezogen. Ziel war es in diesem Zusammenhang, den Einfluss der

PMCA im Gefäßsystem zu untersuchen und Aussagen über die daraus resultierende Beeinflussung des Blutdrucks der Tiere zu ziehen.

Voraussetzung für funktionelle Versuche zur Klärung dieser Fragen ist es, die Expression des Transgens in den entsprechenden Tieren nachzuweisen, was auf allen Ebenen im physiologischen Entstehungsprozeß eines Proteins erfolgreich durchgeführt wurde. Die Tiere wurden bezüglich der homozygoten oder heterozygoten Integration des Transgens untersucht und solche mit positivem Ergebnis für die Weiterzucht der transgenen Mauslinien bzw. für die im Folgenden diskutierten Untersuchungen herangezogen. Die Umsetzung des hPMCA4b-Gens in entsprechende mRNA und die Existenz des Enzyms konnte in verschiedenen Geweben der transgenen Tiere nachgewiesen werden.

Um die Funktion in glatten Gefäßmuskelzellen betrachten zu können, wurde die durch die Wahl des Promotors vorgegebene Lokalisation der hPMCA4b in denselben gezeigt. Dies war dadurch möglich, dass Immunfärbungen gegen das spezifisch in glatten Muskelzellen vorkommende α -Aktin und Gegenfärbungen in denselben Gewebeschnitten gegen hPMCA4b eine Kolokalisation in Myozyten der Muskularis von Gefäßschnitten zeigten. Weiterhin wurde erneut jeweils durch Kofärbung mit glattmuskulärem α -Aktin die Lokalisation von endogener mPMCA4b nicht transgener Tiere sowie die Kolokalisation von PMCA und nNOS im Sarcolemm glatter Gefäßmuskelzellen verifiziert.

Neben diesen topologischen Gemeinsamkeiten konnte mittels Kopräzipitation auch die physikalische Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden. In den die PMCA überexprimierenden Tieren fand sich erwartungsgemäß eine deutlich größere Menge an präzipitierter PMCA als in wildtypischen Tieren. Bei der Kopräzipitation von PMCA und nNOS konnte letztere in einem spezifisch nur die humane Isoform der Kalziumpumpe präzipitierenden Ansatz nur in transgenen Tieren nachgewiesen werden. Dagegen wurde die physikalische Interaktion von nNOS und endogener PMCA in transgenen und Kontrolltieren nachgewiesen.

Die gemeinsame Lokalisation und die physikalische Interaktion beider Proteine konnte bereits früher in Zelllinien gezeigt werden [86]. Obige Ergebnisse weisen diese Erkenntnisse auch im transgenen Tiermodell nach und stellen so eine wesentliche

Voraussetzung für die ebenfalls bisher nur in Zelllinien untersuchte Hypothese dar, dass die PMCA auch *in vivo* regulatorisch auf die nNOS Einfluss nimmt.

5.5.2 Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen

Um funktionelle Aussagen über den Tonus der Gefäßmuskulatur treffen zu können, wurden Versuche wie oben beschrieben an isolierten Aortenringen durchgeführt. Dabei wurde zuerst die endothelvermittelte Relaxation geprüft. Im Endothel werden bei intakter Gefäßwand verschiedene den Tonus der Gefäßwand beeinflussenden Agentien substituiert. Relaxierend wirkt vor allem das von der dort lokalisierten eNOS produzierte NO. Es zeigten sich keine Unterschiede im Relaxationsverhalten der Aortenringe auf den relaxierenden Stimulus Acetylcholin im Vergleich von hPMCA4b-transgenen und wildtypischen Tieren. Obwohl die NO-Produktion der nNOS – diese wird durch PMCA inhibiert [86] – die der endothelialen NOS übersteigt, scheint das Endothel über genügend relaxierende Reserven zu verfügen, so dass die Inhibition der nNOS nicht offensichtlich wird. Daneben spielt sicher auch die nicht näher bestimmte Restaktivität der nNOS eine Rolle.

Anders verhält es sich beim Vergleich wildtypischer mit nNOS-knockout-Tieren. Hier finden sich im Bereich maximaler Relaxation auf Acetylcholin Unterschiede. Die knockout-Mäuse relaxieren in diesem Bereich schwächer als die Kontrollen, während die halbmaximale Kontraktion bei beiden Tieren noch die gleiche Konzentration an relaxierendem Stimulus erforderte. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei starkem relaxierendem Stimulus die Potenz des endothelvermittelten Anteils ausgereizt ist und somit der nNOS relativ gesehen eine bedeutendere Rolle zukommt. Auf jeden Fall scheint die nNOS-Aktivität zur Relaxation der Gefäßmyozyten beizutragen.

Die endothelunabhängige Relaxation wurde mittels Nitroprussid-Natrium untersucht. Dabei handelt es sich um eine Substanz, die nichtenzymatisch Stickstoffmonoxid freisetzt. Die NO-Synthase ist also in diesen Prozeß nicht involviert. Sowohl im Vergleich PMCA-transgener und wildtypischer Tiere als auch in dem von nNOS-defizienten Mäusen und Kontrollen zeigten sich keine Unterschiede im Relaxationsverhalten. Dies beweist, dass funktionelle Veränderungen bei den genetisch

veränderten Tieren nicht in physiologischen Abläufen nach Produktion von NO durch die NOS auftreten.

Um den Einfluss des Endothels auszuschalten, wurden die Aortenringe deendothelialisiert. So konnten Aussagen über die Interaktion von PMCA und nNOS getroffen werden, da deren Auswirkungen dann nicht mehr von der Aktivität der endothelialen relaxierenden Mechanismen kaschiert wurden. KCl-Lösung wurde verwendet, um die Muskelzellen zu depolarisieren und so ein Aktionspotential mit anschließender Kontraktion auszulösen. Es zeigte sich, dass PMCA-transgene Tiere signifikant stärkere Kontraktionsantworten boten als wildtypische Tiere. Dieses Ergebnis bestätigt vorherige Erkenntnisse aus Zellmodellen. Wenn die PMCA einen hemmenden Einfluss auf die nNOS ausübt, wird in einem Organismus, der PMCA in Gefäßmuskelzellen überexprimiert, diese Hemmung im Vergleich mit wildtypischen Tieren überproportional stark ausfallen und damit die Menge an reaktiv auf einen Kontraktionsstimulus bereitgestelltem relaxierendem NO überproportional klein sein. Demnach muß die Kontraktion in transgenen Aortenringen stärker ausfallen.

Um die Veränderungen im NOS-NO-cGMP-System als Ursache dieser Ergebnisse zu festigen, wurde in einem zweiten Schritt eine Präinkubation der Ringe mit L-NAME durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase. In diesem Versuchsaufbau ist somit die Aktivität der nNOS deutlich gemindert. Es kann bei entsprechendem Überschuss an L-NAME keine NO-initiierte relaxierende Antwort mehr stattfinden. Kontraktionsversuche in KCl-Lösung zeigten erwartungsgemäß eine insgesamt im Vergleich zum Versuchsansatz ohne L-NAME signifikant stärkere Kontraktion. Ein Unterschied in der Kontraktionsantwort zwischen transgenem und wildtypischem Mauseortenring ließ sich nicht mehr nachweisen. Durch L-NAME-Blockade der NO-Produktion fällt die zwar geringere, aber doch noch vorhandene NO-Wirkung in transgenen Tieren in gleichem Maße aus wie die physiologische in wildtypischen Kontrollen. Es besteht in beiden Fällen keine reaktiv-relaxierende NO-Antwort mehr bzw. nur noch eine gleichermaßen geringe Restantwort. Daraus resultiert eine gleich starke Kontraktion, die absolut die der in ihrer Antwort nur gehemmten transgenen Myozyten übersteigt.

Ergänzend wurde das Kontraktionsverhalten von Aortenringen von nNOS-knockout-Mäusen in KCl-Lösung im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen untersucht. Dabei zeigte

sich ein vergleichbarer Kurvenverlauf wie bei der Gegenüberstellung transgener und wildtypischer Tiere. Die nNOS-defizienten Aortenringe kontrahierten signifikant stärker als die der Wildtyp-Kontrollen.

6 Zusammenfassung

Ein Modell, das die hier gezeigten Erkenntnisse und bereits bekannte Ergebnisse vereint, könnte also wie folgt aussehen: PMCA und nNOS sind topologisch gemeinsam in Caveolae lokalisiert. Die PMCA ist ein integrales Membranprotein dieser spezialisierten Abschnitte des Sarkolemm, die nNOS ist über den Dystrophin-Syntrophinkomplex [105] ebenfalls fest mit der Zellmembran verbunden. Die hPMCA4b interagiert physikalisch über eine spezielle Aminosäuresequenz, mit der sie die PDZ-Domäne der nNOS binden kann, mit der nNOS. Beide Enzyme werden durch entsprechend hohe Konzentrationen an Kalziumkalmodulin aktiviert [125]. Es konnte gezeigt werden, dass nNOS in Analogie zu Regulationsmechanismen für eNOS durch bestimmte Isoformen von Caveolin gehemmt wird. Verschiedene Aminosäuresequenzen des Caveolin scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Nach Präinkubation mit diesen Abschnitten entsprechenden Peptiden konnte nNOS nicht mehr an Kalziumkalmodulinbeads präzipitiert werden [103]. Mit den hier demonstrierten Ergebnissen könnte ein hypothetisches Modell wie folgt aussehen. Aktiviert durch hohe Kalziumkalmodulinspiegel, die gleichzeitig auch die nNOS aktivieren, initiiert die PMCA4b einen Gegenregulationsvorgang. Kalziumionen werden aus der Zelle in den Extrazellulärraum verschoben und so das lokale Mikromilieu verändert. Die Kalziumkalmodulinkonzentration fällt, und durch eine Verschiebung des Gleichgewichts für diese Substanz löst sich die Bindung von Kalmodulin an nNOS. Damit kann Caveolin, das ebenfalls Bestandteil des Dystrophinkomplexes ist, an nNOS assoziieren und übt so eine Hemmung der Enzymaktivität aus. Der Umsatz von L-Arginin in L-Citrullin und Stickstoffmonoxid sinkt. Damit stehen weniger relaxierende Valenzen zur Verfügung mit positiver Auswirkung auf die Kontraktion der Muskelzelle. Dabei könnte die hohe Affinität von Kalziumkalmodulin zur PMCA4b bzw. deren vergleichsweise lange fortbestehende Aktivierung nach Senken der Kalziumkalmodulinkonzentration eine entscheidende Rolle spielen [71, 126] (für eine Übersicht siehe auch [18]). Ob diese Hypothese zutrifft oder ob dem gesehenen Effekt die direkte Interaktion von PMCA4b und nNOS zugrunde liegt, bleibt zu klären.

Die präsentierten Ergebnisse weisen die PMCA4b als ein wesentliches regulatorisches Agens der nNOS im intakten Organismus aus. Dies stellt einen weiteren Schritt zum

Verständnis der Regulation des Gefäßmuskeltonus und damit des Blutdruckverhaltens dar, das auch unter klinischen Gesichtspunkten von großer Bedeutung ist. Es wird interessant sein, welche weiteren Interaktionspartner dieser vielversprechenden Enzyme in Zukunft entdeckt werden, und wie die komplexen Zusammenhänge weiter entschlüsselt werden.

Interaktion PMCA4b/NOS-I

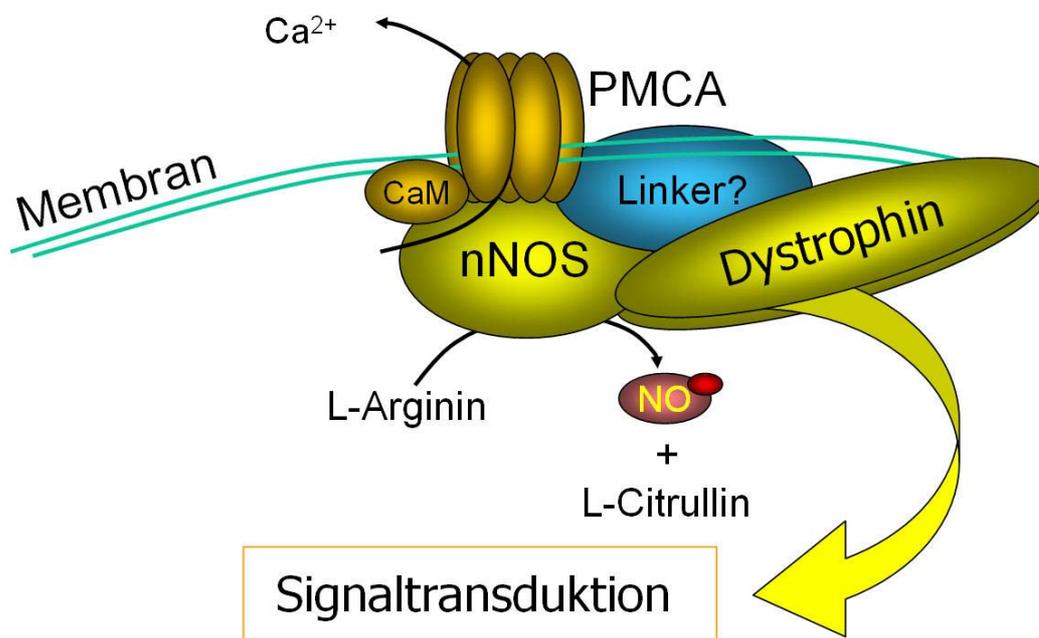


Abb. 12 (modifiziert aus [86]): Modell der Hypothese zur Interaktion von PMCA und nNOS. PMCA ist ein integrales Membranprotein der Caveolae. Über den Dystrophinkomplex ist nNOS ebenfalls an diese Membrankompartimente assoziiert. PMCA und nNOS interagieren über eine die PDZ-Domäne der nNOS bindende Sequenz der PMCA. Kalziumkalmodulin (CaM) aktiviert beide Proteine. Die nNOS produziert NO, die PMCA verschiebt Ca^{2+} in den Extrazellulärraum. Mit sinkender Ca^{2+} -Konzentration tritt eine Hemmung der nNOS auf (hypothetischer Mechanismus im Text beschrieben).

7 Literaturverzeichnis

1. Birkenhager WH, S.M., Krauss XH, Kolsters G, Zaal GA., *Consecutive haemodynamic patterns in essential hypertension*. Lancet, 1972. **1**(7750): p. 560-4.
2. Lund-Johansen, P., *Hemodynamic alterations in hypertension--spontaneous changes and effects of drug therapy. A review*. Acta Med Scand Suppl, 1977. **603**: p. 1-14.
3. Messerli, F.H., et al., *Borderline hypertension: relationship between age, hemodynamics and circulating catecholamines*. Circulation, 1981. **64**(4): p. 760-4.
4. Weiss, Y.A., et al., *Repeat hemodynamic determinations in borderline hypertension*. Am J Med, 1978. **64**(3): p. 382-7.
5. Folkow, B., *Physiological aspects of primary hypertension*. Physiol Rev, 1982. **62**(2): p. 347-504.
6. Coleman, T.G., R.E. Samar, and W.R. Murphy, *Autoregulation versus other vasoconstrictors in hypertension. A critical review*. Hypertension, 1979. **1**(3): p. 324-30.
7. Havlik, R.J. and M. Feinleib, *Epidemiology and genetics of hypertension*. Hypertension, 1982. **4**(5 Pt 2): p. III121-7.
8. Webber, L.S., et al., *Occurrence in children of multiple risk factors for coronary artery disease: the Bogalusa heart study*. Prev Med, 1979. **8**(3): p. 407-18.
9. Berglund, G., O. Andersson, and L. Wilhelmsen, *Prevalence of primary and secondary hypertension: studies in a random population sample*. Br Med J, 1976. **2**(6035): p. 554-6.
10. Greminger, P., et al., *[Primary and secondary hypertension in polyclinical patients]*. Schweiz Med Wochenschr, 1977. **107**(17): p. 605-9.
11. Kannel, W.B., et al., *Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. The Framingham study*. N Engl J Med, 1972. **287**(16): p. 781-7.
12. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
13. Thijs, L., et al., *A meta-analysis of outcome trials in elderly hypertensives*. J Hypertens, 1992. **10**(10): p. 1103-9.
14. Shull, G.E., *Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5284-90.
15. Schatzmann, H.J., *ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells*. Experientia, 1966. **22**(6): p. 364-5.
16. Shull, G.E. and J. Greeb, *Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases*. J Biol Chem, 1988. **263**(18): p. 8646-57.
17. Verma, A.K., et al., *Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump*. J Biol Chem, 1988. **263**(28): p. 14152-9.
18. Strehler, E.E. and D.A. Zacharias, *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 21-50.

19. Keeton, T.P., S.E. Burk, and G.E. Shull, *Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4*. J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2740-8.
20. Stauffer, T.P., et al., *Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25993-6003.
21. Strehler, E.E., *Plasma membrane Ca²⁺ pumps and Na⁺/Ca²⁺ exchangers*. Semin Cell Biol, 1990. **1**(4): p. 283-95.
22. Greeb, J. and G.E. Shull, *Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle*. J Biol Chem, 1989. **264**(31): p. 18569-76.
23. Strehler, E.E., et al., *mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(18): p. 6908-12.
24. Carafoli, E., *Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme*. Faseb J, 1994. **8**(13): p. 993-1002.
25. Heim, R., et al., *Microdiversity of human-plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region*. Eur J Biochem, 1992. **205**(1): p. 333-40.
26. Brown, B.J., et al., *Primary structure of human plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1283**(1): p. 10-3.
27. Keeton, T.P. and G.E. Shull, *Primary structure of rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A*. Biochem J, 1995. **306** (Pt 3): p. 779-85.
28. Carafoli, E., et al., *The calcium pump of the plasma membrane: structure-function relationships*. Adv Exp Med Biol, 1989. **255**: p. 61-70.
29. Axelsen, K.B. and M.G. Palmgren, *Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily*. J Mol Evol, 1998. **46**(1): p. 84-101.
30. Lutsenko, S. and J.H. Kaplan, *Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity*. Biochemistry, 1995. **34**(48): p. 15607-13.
31. Moller, J.V., B. Juul, and M. le Maire, *Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1286**(1): p. 1-51.
32. Guerini, D., *The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase*. Cell Tissue Res, 1998. **292**(2): p. 191-7.
33. Penniston, J.T. and A. Enyedi, *Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump*. J Membr Biol, 1998. **165**(2): p. 101-9.
34. Zacharias, D.A. and C. Kappen, *Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1428**(2-3): p. 397-405.
35. Stahl, W.L., et al., *Plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **16**(3-4): p. 223-31.
36. Stauffer, T.P., et al., *Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain*. Brain Res, 1997. **748**(1-2): p. 21-9.

37. Kozel, P.J., et al., *Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18693-6.
38. James, P., et al., *Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes*. J Biol Chem, 1988. **263**(6): p. 2905-10.
39. Enyedi, A., et al., *The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump*. J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12313-21.
40. Falchetto, R., et al., *The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain*. J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 2930-6.
41. Falchetto, R., T. Vorherr, and E. Carafoli, *The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme*. Protein Sci, 1992. **1**(12): p. 1613-21.
42. Neyses, L., L. Reinlib, and E. Carafoli, *Phosphorylation of the Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1985. **260**(18): p. 10283-7.
43. Monteith, G.R. and B.D. Roufogalis, *The plasma membrane calcium pump--a physiological perspective on its regulation*. Cell Calcium, 1995. **18**(6): p. 459-70.
44. Wuytack, F. and L. Raeymaekers, *The Ca(2+)-transport ATPases from the plasma membrane*. J Bioenerg Biomembr, 1992. **24**(3): p. 285-300.
45. Kim, E., et al., *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1591-5.
46. Kosk-Kosicka, D., T. Bzdega, and J.D. Johnson, *Fluorescence studies on calmodulin binding to erythrocyte Ca²⁺(+)-ATPase in different oligomerization states*. Biochemistry, 1990. **29**(7): p. 1875-9.
47. Vorherr, T., et al., *The calmodulin-binding domain mediates the self-association of the plasma membrane Ca²⁺ pump*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 22-7.
48. Kosk-Kosicka, D. and T. Bzdega, *Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin*. J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18184-9.
49. Niggli, V., E.S. Adunyah, and E. Carafoli, *Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺ - ATPase*. J Biol Chem, 1981. **256**(16): p. 8588-92.
50. Missiaen, L., et al., *Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca²⁺-transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference*. Biochem J, 1989. **263**(3): p. 687-94.
51. Brodin, P., et al., *Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump*. Eur J Biochem, 1992. **204**(2): p. 939-46.
52. Filoteo, A.G., A. Enyedi, and J.T. Penniston, *The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca²⁺ pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding domain interacts with lipid*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11800-5.
53. Zvaritch, E., et al., *Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca²⁺ pump using trypsin proteolysis*. Biochemistry, 1990. **29**(35): p. 8070-6.

54. Hammes, A., et al., *Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca(2+)-ATPase*. *Faseb J*, 1994. **8**(6): p. 428-35.
55. Guerini, D., et al., *The expression of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by Ca²⁺*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1667-76.
56. Guerini, D., et al., *Calcineurin controls the expression of isoform 4CII of the plasma membrane Ca(2+) pump in neurons*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3706-12.
57. Afroze, T. and M. Husain, *c-Myb-binding sites mediate G(1)/S-associated repression of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase-1 promoter*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(12): p. 9062-9.
58. Bhargava, A., et al., *Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus*. *J Neurosci*, 2000. **20**(9): p. 3129-38.
59. Zacharias, D.A., S.J. Dalrymple, and E.E. Strehler, *Transcript distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms and splice variants in the human brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. **28**(2): p. 263-72.
60. Burk, S.E. and G.E. Shull, *Structure of the rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. Skeletal muscle-specific splicing results in a plasma membrane Ca(2+)-ATPase with a novel calmodulin-binding domain*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(27): p. 19683-90.
61. Hilfiker, H., D. Guerini, and E. Carafoli, *Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane Ca²⁺ ATPase. Functional properties of the enzyme and its splicing products*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(42): p. 26178-83.
62. Chicka, M.C. and E.E. Strehler, *Alternative splicing of the first intracellular loop of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 alters its membrane targeting*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18464-70.
63. Strehler, E.E., *Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca²⁺ pumps*. *J Membr Biol*, 1991. **120**(1): p. 1-15.
64. Howard, A., S. Legon, and J.R. Walters, *Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(5 Pt 1): p. G917-25.
65. Kessler, F., et al., *Study of calmodulin binding to the alternatively spliced C-terminal domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump*. *Biochemistry*, 1992. **31**(47): p. 11785-92.
66. Verma, A.K., et al., *Regulatory region of plasma membrane Ca²⁺ pump. 28 residues suffice to bind calmodulin but more are needed for full auto-inhibition of the activity*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(3): p. 1687-91.
67. Verma, A.K., et al., *Plasma membrane calcium pump isoform 4a has a longer calmodulin-binding domain than 4b*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(7): p. 3714-8.
68. Enyedi, A., et al., *The Ca²⁺ affinity of the plasma membrane Ca²⁺ pump is controlled by alternative splicing*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(1): p. 41-3.
69. Preiano, B.S., D. Guerini, and E. Carafoli, *Expression and functional characterization of isoforms 4 of the plasma membrane calcium pump*. *Biochemistry*, 1996. **35**(24): p. 7946-53.

70. Enyedi, A., et al., *Calmodulin-binding domains from isozymes of the plasma membrane Ca²⁺ pump have different regulatory properties.* J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 8952-6.
71. Elwess, N.L., et al., *Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺.* J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17981-6.
72. Filoteo, A.G., et al., *Plasma membrane Ca(2+) pump isoform 3f is weakly stimulated by calmodulin.* J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4323-8.
73. Dean, W.L., et al., *Regulation of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation.* J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15113-9.
74. Wan, T.C., M. Zabe, and W.L. Dean, *Plasma membrane Ca(2+) -ATPase isoform 4b is phosphorylated on tyrosine 1176 in activated human platelets.* Thromb Haemost, 2003. **89**(1): p. 122-31.
75. Dell'Acqua, M.L. and J.D. Scott, *Protein kinase A anchoring.* J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 12881-4.
76. Enyedi, A., et al., *Protein kinase C activates the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain.* J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32461-7.
77. Wang, K.K., et al., *Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase from human erythrocytes.* J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 9078-85.
78. Hofmann, F., et al., *Phosphorylation of the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump by protein kinase C reduces its interaction with calmodulin and with its pump receptor site.* J Biol Chem, 1994. **269**(39): p. 24298-303.
79. Enyedi, A., et al., *Protein kinase C phosphorylates the "a" forms of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin.* J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27525-8.
80. Fujimoto, T., *Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae.* J Cell Biol, 1993. **120**(5): p. 1147-57.
81. Isshiki, M. and R.G. Anderson, *Calcium signal transduction from caveolae.* Cell Calcium, 1999. **26**(5): p. 201-8.
82. Nagano, T., H. Jourdi, and H. Nawa, *Emerging roles of Dlg-like PDZ proteins in the organization of the NMDA-type glutamatergic synapse.* J Biochem (Tokyo), 1998. **124**(5): p. 869-75.
83. Ponting, C.P., et al., *PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites.* Bioessays, 1997. **19**(6): p. 469-79.
84. Tsunoda, S., et al., *A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade.* Nature, 1997. **388**(6639): p. 243-9.
85. Segal, S.S., S.E. Brett, and W.C. Sessa, *Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters.* Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. H1167-77.
86. Schuh, K., et al., *The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I.* J Cell Biol, 2001. **155**(2): p. 201-6.
87. Li, S., et al., *Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin.* J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15693-701.

88. Okamoto, T., et al., *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.* J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5419-22.
89. Couet, J., M. Sargiacomo, and M.P. Lisanti, *Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities.* J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30429-38.
90. Yamamura, H., et al., *Structure and expression of the human SM22alpha gene, assignment of the gene to chromosome 11, and repression of the promoter activity by cytosine DNA methylation.* J Biochem (Tokyo), 1997. **122**(1): p. 157-67.
91. Li, L., et al., *SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis.* Circ Res, 1996. **78**(2): p. 188-95.
92. Solway, J., et al., *Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha.* J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13460-9.
93. Griffith, O.W. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.* Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 707-36.
94. Mayer, B. and E.R. Werner, *In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995. **351**(5): p. 453-63.
95. Masters, B.S., et al., *Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-ligated heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal.* Faseb J, 1996. **10**(5): p. 552-8.
96. Umans, J.G. and R. Levi, *Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure.* Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 771-90.
97. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway.* N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
98. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.* Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
99. Schmidt, H.H. and U. Walter, *NO at work.* Cell, 1994. **78**(6): p. 919-25.
100. Crane, B.R., et al., *The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes.* Science, 1997. **278**(5337): p. 425-31.
101. Stuehr, D.J., *Structure-function aspects in the nitric oxide synthases.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 339-59.
102. Michel, J.B., et al., *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin.* J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15583-6.
103. Venema, V.J., et al., *Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain.* J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28187-90.
104. Ju, H., et al., *Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity.* J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18522-5.
105. Brenman, J.E., et al., *Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy.* Cell, 1995. **82**(5): p. 743-52.
106. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains.* Cell, 1996. **84**(5): p. 757-67.

107. Hillier, B.J., et al., *Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex*. Science, 1999. **284**(5415): p. 812-5.
108. Hammes, A., et al., *Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats*. Circ Res, 1998. **83**(9): p. 877-88.
109. DeMarco, S.J., M.C. Chicka, and E.E. Strehler, *Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2b interacts preferentially with Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2 (NHERF2) in apical plasma membranes*. J Biol Chem, 2002.
110. DeMarco, S.J. and E.E. Strehler, *Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21594-600.
111. Mungrue, I.N., et al., *Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 735-43.
112. Heger, J., et al., *Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction*. Circ Res, 2002. **90**(1): p. 93-9.
113. Chien, K.R., *Genes and physiology: molecular physiology in genetically engineered animals*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 901-9.
114. Schatzmann, H.J.C.E.e., *Membrane Transport of Calcium*. Academic Press, London, 1982: p. 41-108.
115. Kamm, K.E. and J.T. Stull, *Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4527-30.
116. Blaustein, M.P., *Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis*. Am J Physiol, 1977. **232**(5): p. C165-73.
117. Reeves, J.P. and C.C. Hale, *The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system*. J Biol Chem, 1984. **259**(12): p. 7733-9.
118. Kimura, J., A. Noma, and H. Irisawa, *Na-Ca exchange current in mammalian heart cells*. Nature, 1986. **319**(6054): p. 596-7.
119. Wakimoto, K., et al., *Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36991-8.
120. Iwamoto, T., S. Wakabayashi, and M. Shigekawa, *Growth factor-induced phosphorylation and activation of aortic smooth muscle Na⁺/Ca²⁺ exchanger*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8996-9001.
121. Bers, D.M., J.W. Bassani, and R.A. Bassani, *Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(10): p. 1772-7.
122. Hammes, A., et al., *Expression of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in myogenic cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30816-22.
123. Sugi, H., S. Suzuki, and T. Daimon, *Intracellular calcium translocation during contraction in vertebrate and invertebrate smooth muscles as studied by the pyroantimonate method*. Can J Physiol Pharmacol, 1982. **60**(4): p. 576-87.
124. Anderson, R.G., et al., *Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae*. Science, 1992. **255**(5043): p. 410-1.
125. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 682-5.

126. Caride, A.J., et al., *The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca(2+) pump is slow and is changed by alternative splicing.* J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 35227-32.

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

soweit nicht im Text beschrieben

ATP	Adenosintriphosphat
CaM	Kalziumkalmodulin
DABCO	1,4-Diazabicyclooctan
GMP	Guanosinmonophosphat
MAGUK	membranassoziierte Guanylatzyklen
NOS	Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
PBS	Phosphat-Bufferd-Saline
PDZ	PSD-95, disc-large, ZO-1
PKA/B/C	Phosphokinase A/B/C
PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
PSD-95	postsynaptic density protein-95
RIPA	Radioimmunoprecipitation-Assay-Buffer
SERCA	sarcoendoplasmatische-Kalzium-ATPase
SSC	sodium chloride/sodium citrate
SSPE	sodium chloride/sodium phosphate EDTA
sys/dias	systolisch/diastolisch
TAE	Tris-acetate
TBS	Tris-Buffered-Saline

Lösungen und Puffer

(soweit nicht im Text beschrieben)

Nährmedium für Plasmidkultur

Trisacetat (TAE) 40 mM Tris-Acetat, 2 mM Na₂EDTA x 2H₂O
in H₂O dest.
pH 8,5

SSC 20x	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ citrat x 2H ₂ O pH 7,0 in H ₂ O dest.
SSPE 20x	175,3g M NaCl, 27,6g NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O, 7,4g EDTA, 800ml pH 7,4 ad H ₂ O 1l
Tris 1M, pH 8,0	1 M Trisbase in H ₂ O dest. pH 8,0
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 4H ₂ O, 1,4 mM KH ₂ HPO ₄ in H ₂ O dest. pH 7,4
PBS für Western	0,58 M Na ₂ HPO ₄ , 0,17 M NaH ₂ PO ₄ , 0,68 M NaCl pH 7,4 in H ₂ O dest.
Denhardt`s Reagenz 50x	5g Ficoll (Type 400, Pharmacia®), 5g Polyvinylpyrrolidon, 5g BSA (Sigma®) 500ml H ₂ O
SDS-Gelladepuffer	Laemmlli®-Puffer, 2-Mercaptoethanol 19:1
Western Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS pH 8,3 in H ₂ O dest.
Western Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS 20 Vol% Methanol, pH 8,3 in H ₂ O dest.
Western-Blockierlösung	PBS, 5% Milchpulver, 0,1% Tween
RIPA-Puffer	150mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 50mM Tris (pH 8,0), 1mM PMSF
Permeabilisierungslösung	0,05M PBS, 0,1% Triton-X
Blockierlösung Immunfärbung	PBS, 2% Rinderserumalbumin (BSA), 10% Serum

Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (modifiziert)	118,6mmol/l NaCl, 4,7mmol/l KCl, 2,5mmol/l CaCl ₂ , 1,2 mmol/l MgSO ₄ , 1,2mmol/l KH ₂ PO ₄ , 25,1mmol/l NaHCO ₃ , 0,026mmol/l EDTA, 10,1mmol/l Glucose
--	--

Chemikalien, Fertigkits

Substanz/Kit	Firma
α - ³² P-dATP	ICN
anti PMCA Antikörper 4N (polyklonal)	SWANT
anti hPMCA4b Antikörper JA3 (monoklonal)	Neomakers
anti SM α -Actin Antikörper FITC gekoppelt	Sigma
goat α rabbit Affinipure Antikörper Texas Red gekoppelt	Jackson-ImmunoResearch
goat α rabbit Antikörper HRP gekoppelt	Amersham Biosciences
goat α mouse Antikörper HRP gekoppelt	Amersham Biosciences
anti nNOS Antikörper	Transduction Laboratories
BSA	Boehringer Mannheim
Kalmodulin-Sepharose-beads	Amersham Biosciences
Complete EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets	Roche
Deoxycholic Acid	Sigma
Dneasy Tissue Kit	Qiagen
Dye Reagent Concentrate	BioRad
ECL-Kit	Amersham Biosciences
Ethanol	J.T.Baker
Formaldehyd	Merck
Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker	Amersham Biosciences

GeneRuler 1Kb DNA ladder	Fermentas
Igepal	Sigma
Isopropanol	Merck
Kälberserum (foetal)	PAA
Laemmli Sample Buffer	BioRad
2-Mercaptoethanol	Merck
Multiprime DNA labeling system	Amersham Biosciences
Nucleobond PC 500 Elutionskit	Machery-Nagel
One Step RT-PCR Kit	Qiagen
PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid)	Sigma
Propanol	Merck
Protein A+G Sepharose	Amersham Bioscience
Proteinase K	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme EcoR1/BamH1	Fermentas
Szintillationscocktail Emulsifer Safe	Packard
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulphat)	Amersham Bioscience
Temed	Roth
TissueTec	Sakura
Triton X-100	Sigma
Trizol	Invitrogen life technologies
Tween 20	Sigma

Gerätschaften, Materialien

Gerät, Material	Hersteller
β-Counter TRI-CARB Liquid-Scintillator	Packard
DNA Thermal Cycler	Perhin Elmer
Drehofen Hybaid Mini Oven	MWG Biotech

Elektrophoresekammern	BioRad
Elektrophoresenetzgerät Power Pack 25	Biometra
Entwicklermaschiene	Agfa
Kryostat	Leika
Kryotom Microtome Blade	Feather
Lichtmikroskop mit UV-Lichtquelle	Zeiss
Axiovert 135	
Magnetrührer/Heizplatte Ikamag	Roth
Nitrocellulosemembran Hybond	Amersham Pharm. Biotech
Objektträger Poly-Lysin	Menzel Gläser
Photometer UV-160	Shimadzu
Pipetten	Eppendorf
Pipettus-Akkugerät	Hirschmann
Polaroidkamera	Polaroid
Röntgenfilm X-Ray Retina	AGFA
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Thermostat plus	Eppendorf
UV-Lichtquelle Mini-Transluminator	BioRad
Waage	Satorius
Zellulosepapier	Wathman
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge 2K15	Sigma

