Einfluss der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase auf den cGMP/cAMP-Crosstalk und die Steifigkeit der murinen Aorta

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Sarah Dünnes

aus Mainz

Würzburg 2016



Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter:

.....

Gutachter:

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Eidesstattliche Erklärung

nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: "Einfluss der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase auf den cGMP/cAMP-Crosstalk und die Steifigkeit der murinen Aorta", eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den _____

Sarah Dünnes

Meiner geliebten Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	leitun	ıg	. 1
	1.1	NO/	cGMP-Signalkaskade	. 1
	1.2	NO-	Synthese	. 1
	1.3	NO-	sensitive Guanylyl-Cyclase	. 4
	1.4	Effe	ktorproteine von cGMP	. 5
	1.4.	1	cGMP-abhängige Phosphodiesterasen	. 5
	1	.4.1.	Phosphodiesterase 3	. 6
	1.4.	2	cGMP-abhängige Ionenkanäle	. 7
	1.5	Effe	ktorproteine von cAMP	. 7
	1.6	NO/	cGMP-Signalkaskade im vaskulären System	. 8
	1.7	Das	Blutgefäßsystem	.11
	1.7.	1	Funktion und Aufbau der Blutgefäße	.12
	1.7.	2	Aorta	.15
	1.8	Extr	azelluläre Matrix	15
	1.8.	1	Kollagen	.16
	1.8.	2	Elastin	.17
	1.8.	3	Vaskuläres Remodelling und Pulswellengeschwindigkeit	.17
	1.9	Trar	nsgene Maus-Modelle	18
	1.9.	1	Globaler Knock-out der NO-GC	.19
	1.9.	2	Glattmuskelspezifischer Knock-out der NO-GC	.20
2	Ziel	setzı	Jng	.21
3	Mat	erial	und Methoden	.22
	3.1	Mat	erial	.22
	3.1.	1	Chemikalien	.22
	3.1.	2	Antikörper für Western Blot	.23
	3.1.	3	Antikörper für Immunhistochemie	.23
	3.1.	4	Puffer und Lösungen	.23
	3.1.	5	Geräte	.26
	3.2	Met	hoden	.27
	3.2.	1	Tiere und Präparation	.27
	3	.2.1.	1 Haltung und Zucht	.27
	3	.2.1.2	2 Tamoxifen-Injektionen	.27
	3	.2.1.3	3 Genotypisierung	.27
	3	.2.1.4	4 Organentnahme	.28

	3.2.2	Western Blot		8
	3.2.2.	1 Herstellung der Western Blot-Prob	en28	В
	3.2.2.	2 Bestimmung der Proteinkonzentrat	tion28	B
	3.2.2.	3 Gelelektrophorese		9
	3.2.2.	4 Blotting		9
	3.2.3	Messung von Durchmesser und Wando	dicke30	0
	3.2.4	Aktivitätsmessungen		0
	3.2.4.	1 Phosphodiesterase-Assay		0
	3.2.4.	2 Radioimmunoassay	3:	2
	3.2.5	Organbad		4
	3.2.5.	1 Test zur Relaxation der Gefäße		4
	3.2.5.	2 Spannungs-Dehnungs-Test	3	5
	3.2.6	Messung der Pulswellengeschwindigke	eit mittels MRT30	6
	3.2.6.	1 Tierpräparation und Messung	3	7
	3.2.6.	2 Auswertung		9
	3.2.7	Biochemische Untersuchungen der Aor	rta3	9
	3.2.7.	1 Elastin-Assay	3	9
	3.2.7.	2 Kollagen-Assay	40	0
	3.2.8	Immunhistochemie	4	1
	3.2.9	Histologie	4	1
	3.2.9.	1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	4	1
	3.2.9.	2 Pikrosiriusrot-Färbung		2
	3.2.10	Statistik		2
4	Ergebni	sse	4	3
	4.1 Aus	schnitt der NO-GC	4	3
	4.1.1	Immunhistochemie der glatten Muskula	.tur4	3
	4.1.2	NO-induzierte Relaxation der Gefäße	40	6
	4.2 cAN	1P/cGMP-Crosstalk	4	6
	4.2.1	cAMP-Signalkaskade	4	9
	4.2.1.	1 Messung des cAMP-Spiegels mitte	els Radioimmunoassay4	9
	4.2.1.	2 Effekt von Forskolin auf die Relaxa	tion der Aorta4	9
	4.2.2	PDE3-vermittelter cAMP/cGMP-Crossta	alk4	9
	4.2.2.	1 PDE3-Expression in der glatten Ge	efäßmuskulatur5	3
	4.2.2.	2 Rolle der PDE3A bei der Relaxatio	n der Aorta5	5
	4.2.2.	B Effekt von ODQ auf die Milrinon-in	duzierte Relaxation5	5
	4.2.2.	Abnahme der PDE3A-Expression .	58	8
	4.2.2.	5 PDE3A-Aktivität	6	1
	4.3 Ein	luss der NO-GC auf die Steifigkeit der A	orta6	3

	4.3.	1 Messung des spezifischen Herzgewichtes	63
	4.3.	2 Aortensteifigkeit	65
	4.	3.2.1 Spannungs-Dehnungs-Test	65
	4.	3.2.2 Pulswellengeschwindigkeit	68
	4.3.	3 Messung der Aorten-Geometrie	68
	4.3.	4 Messung der ECM-Proteine	71
	4.3.	5 Struktur der Aorta	73
5	Disk	sussion	78
5	.1	Deletion der NO-GC in den Gefäßen	78
5	.2	Einfluss der NO-GC-Deletion auf den cAMP/cGMP-Crosstalk	79
5	.3	Bedeutung der NO-GC für die Steifigkeit der Aorta	83
6	Zus	ammenfassung	89
7	Sun	nmary	90
8	Lite	raturverzeichnis	92
9	Eige	ene Publikationen	103
10	D	anksagung	104

Abbildungsverzeichnis

Abb.	1: Die NO/cGMP-Signalkaskade	2
Abb.	2: Signalwege in der glatten Muskulatur	9
Abb.	3: Aufbau einer Arterie	.14
Abb.	4: Magnetresonanztomographie der Maus-Aorta	.38
Abb.	5: Immunhistochemische Analyse des NO-GC-Ausschnitts in der Aorta	.44
Abb.	6: NO-GC-Ausschnitt in der Arteria carotis	.45
Abb.	7: Verlust der NO-induzierten Relaxation in KO-Aorten	.47
Abb.	8: NO-induzierten Relaxation der Arteria carotis	.48
Abb.	9: Basal und Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion	.50
Abb.	10: Effekt von Forskolin auf die Relaxation der Aorta	.51
Abb.	11: Forskolin-induzierte Relaxation der Aorta	.52
Abb.	12: Expression der PDE3	.54
Abb.	13: Effekt von Milrinon auf die Relaxation der Aorta	.56
Abb.	14: Milrinon-induzierte Relaxation der Aorta	.57
Abb.	15: Effekt von ODQ auf die Relaxation der Aorta	.59
Abb.	16: Quantifizierung der PDE3A-Expression	.60
Abb.	17: Zusammenhang zwischen NO-GC- und PDE3A-Expression	.62
Abb.	18: cAMP-abbauende PDE3A-Aktivität	.64
Abb.	19: Spezifisches Herzgewicht	.66
Abb.	20: Spannungs-Dehnungs-Diagramm	.67
Abb.	21: Pullswellengeschwindigkeit	.69
Abb.	22: Geometrie der Aorta	.70
Abb.	23: Biochemische Messung von Elastin und Kollagen	.72
Abb.	24: Veränderte Struktur der "elastic lamellae" in GCKO-Aorten	.74
Abb.	25: Struktur der "elastic lamellae" in SMC-GCKO-Aorten	.75
Abb.	26: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil 4.3	.77
Abb.	27: Einfluss von Milrinon auf den PDE3A-vermittelten cAMP/cGMP-Crosstalk	82

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	=	α-Glattmuskel-Aktin
ATP	=	Adenosintriphosphat
BK _{Ca} -Kanal	=	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
BH ₄	=	Tetrahydro-L-biopterin
BSA	=	Rinderserumalbumin
cAMP	=	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	=	zvklisches Guanosinmonophosphat
DAG	=	Diacylolycerol
DMAB	=	4-Dimethylaminobenzaldehyd
DTT	=	Dithiothreitol
EC	=	Endothelzellen
eNOS	_	endotheliale NO-Synthase
FAD	_	Elavin-Adenin-Dinucleotid
EMN	_	Flavin-Mononucleotid
GCKO	_	alobaler knock-out der NO-GC
GSNO	_	S Nitrosodutathion
GINO	_	Glycoroltripitrat
GTR	=	Guanaaintrinhaanhat
	=	
	=	Induzierbare NO-Synthase
	=	Inositoi 1,4,5,-trisphosphat
KH-Losung	=	Krebs-Henseleit-Losung
L-NAME	=	NG-Nitro-L-Arginin-Methylester
MLC	=	Myosin-leichte-Kette
MLCK	=	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	=	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
MRT	=	Magnetresonanztomographie
NADP	=	Nicotinaäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nNOS	=	neuronale NO-Synthase
NO	=	Stickstoffmonoxid
NO-GC	=	NO-sensitive Guanylyl Cyclase
NOS	=	NO-Synthase
ODQ	=	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]- quinoxalin-1-on
PDE	=	Phosphodiesterase
PE	=	Phenylephrin
PIP ₂	=	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	=	Proteinkinase A
PKG	=	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	=	Phospholipase C
RT	=	Raumtemperatur
SMC	=	Glattmuskelzellen
SMC-GCKO	=	Glattmuskelzell-spezifischer knock-out der NO-GC
ÜN	=	über Nacht
VE	=	voll-entionisiert
w/v	=	Gewicht pro Volumen
WT	_	Wildtyp-Maus
v/v	_	Volumen pro Volumen
-, -		

1 Einleitung

1.1 NO/cGMP-Signalkaskade

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen, wie der Blutdruckregulation, der Thrombozytenaggregation und -adhäsion und der synaptischen Plastizität. Innerhalb der Kaskade nimmt die NOsensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) eine Schlüsselfunktion als wichtigster Rezeptor für das Signalmolekül Stickstoffmonoxids (NO) ein (Abb. 1). Bereits 1980 wurde von Furchgott und Zawadzki ein im Endothel freigesetzter Faktor, der sogenannte "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) entdeckt, der zur Erweiterung der Blutgefäße führt (Furchgott & Zawadzki, 1980). Jahre später stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Faktor um das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). NO wird endogen von verschiedenen Isoformen der NO-Synthase produziert. Die Bindung von NO an die NO-GC führt zur Produktion des sekundären Botenstoffs cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieser Botenstoff aktiviert verschiedene Effektor-Moleküle, wie cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMPregulierte Phosphodiesterasen oder cGMP-regulierte Ionenkanäle (Lohmann et al., 1997; Rybalkin et al., 2003). Über diese unterschiedlichen Effektoren bewirkt cGMP letztlich eine Gefäßrelaxation (Schultz et al., 1977; Groneberg et al., 2010), die Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Bohme et al., 1974; Haslam et al., 1978; Mellion et al., 1981; Walter & Gambaryan, 2004) sowie die Modulation der synaptischen Plastizität (Lu et al., 1999). Durch die Relaxation der glatten Muskulatur in Blutgefäßen trägt die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade wesentlich zur Regulation des Blutdrucks bei. Phosphodiesterasen beenden das cGMP-Signal durch Abbau des sekundären Botenstoffs.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Komponenten des Signalwegs und deren Funktion näher eingegangen.

1.2 NO-Synthese

NO ist ein gasförmiges freies Radikal, das aufgrund seiner geringen Größe und Lipophilie ungehindert durch Zellmembranen diffundieren kann und somit intra- und interzellulär als Gasotransmitter fungiert. Durch seine hohe Reaktivität und der damit verbundenen kurzen Halbwertszeit (Palmer *et al.*, 1987) ruft es lediglich lokale Effekte hervor. NO wird von verschiedenen Isoenzymen der Familie der NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Bei dieser enzymatischen Reaktion werden



Glattmuskelrelaxation Inhibition der Thrombozyten-Aggregation Synaptische Plastizität

Abb. 1: Die NO/cGMP-Signalkaskade

Stickstoffmonoxid (NO) wird von NO-Synthasen gebildet. Dieser Gasotransmitter aktiviert die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC), was zur vermehrten Synthese von cGMP führt. cGMP aktiviert im Anschluss diverse Effektorproteine, wie die cGMP-abhängige Proteinkinase oder cGMP-abhängige Ionenkanäle. Phosphodiesterasen (PDEs) terminieren das Signal durch den Abbau des cGMPs.

Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoff zu NADP⁺ und Wasser oxidiert. Des Weiteren entsteht die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin. Als Ko-Enzyme dieser Reaktion werden Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinadeninmononukleotid (FMN) und Häm benötigt (Mayer *et al.*, 1990; Klatt *et al.*, 1992). NO wird aufgrund seiner dilatierenden Wirkung zur Behandlung von *Angina pectoris* eingesetzt. Es gibt verschiedene klinisch genutzte Nitrovasodilatoren, wobei organische Nitratester, wie Glyceroltrinitrat, Isosorbidmononitrat und Isosorbiddinitrat, häufig verwendet werden. Sie werden in den glatten Muskelzellen der Gefäße enzymatisch in ihre denitrierten Metaboliten und NO gespalten (Ahlner *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2005). Die als Homodimere vorliegenden NOS lassen sich in drei Isoenzyme unterteilen: die induzierbare (iNOS), die neuronale (nNOS) und die endotheliale (eNOS) NO-Synthase (Forstermann *et al.*, 1994).

Die hauptsächlich in Makrophagen und Mikrogliazellen exprimierte iNOS produziert hohe NO-Konzentrationen und ist damit an der unspezifischen Immunantwort beteiligt (Stuehr *et al.*, 1991). In vielen Entzündungsprozessen ist die iNOS durch bakterielle Lipopolysaccharide oder Cytokine hochreguliert. Dadurch entstehen hohe NO-Konzentrationen, die einerseits zytotoxisch auf Bakterien wirken können (Liew *et al.*, 1990; Nathan & Xie, 1994), andererseits jedoch auch einen starken Abfall des Blutdrucks und damit einen septischen Schock verursachen können (Forstermann & Sessa, 2012). In spezifischen Neuronen des zentralen Nervensystems wird die nNOS exprimiert und ist dort verantwortlich für die Langzeitpotenzierung (Son *et al.*, 1998) und die synaptische Plastizität (Lu *et al.*, 1999). Im peripheren Nervensystem wirkt das von nNOS produzierte NO wie ein atypischer Neurotransmitter und vermittelt so die Darmperistaltik, Vasodilatation und Erektion des Penis (Sanders *et al.*, 1992; Forstermann & Sessa, 2012; Groneberg *et al.*, 2013). Die nNOS wurde, neben Gehirn und neuronalem Gewebe, auch in Epithel- (Schmidt & Walter, 1994) und glatten Muskelzellen (Loesch & Burnstock, 1995) lokalisiert.

Die vorwiegend in Endothelzellen vorkommende eNOS konnte auch in Kardiomyozyten und Nervenzellen (Kantor *et al.*, 1996) nachgewiesen werden. Die Bildung von NO aus Endothelzellen wird durch eine Vielzahl von Stoffen, wie z.B. Acetylcholin, Endothelin, Serotonin, ADP und ATP, induziert. Das produzierte NO spielt allgemein eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Apoptose, sowie bei der Leukozytenadhäsion (Forstermann & Sessa, 2012). Im vaskulären System bewirkt die eNOS durch Produktion von NO eine Vasodilatation und ist somit wesentlich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt (Groneberg *et al.*, 2010). KO-Mäuse spezifisch für eNOS haben einen stark erhöhten Blutdruck und weisen keine Acetylcholin-induzierte Gefäßrelaxation mehr auf (Huang *et al.*, 1995). Zudem deuten die Dysfunktionen in der Angio- und Arteriogenese dieser KO-Tiere auf antiproliferative Effekte von endothelialem NO hin (Moroi *et al.*, 1998; Rudic *et al.*, 1998; Dai & Faber, 2010).

Die beiden Isoenzyme nNOS und eNOS werden im Gegensatz zur iNOS konstitutiv exprimiert und durch intrazelluläre Erhöhung von Ca²⁺ und den dadurch entstehenden Ca²⁺/Calmodulin Komplex aktiviert (Forstermann & Sessa, 2012). Die iNOS ist auf transkriptioneller Ebene induzierbar, wird also nur nach Stimulation durch z.B. Lipopolysaccharide oder Cytokine exprimiert.

Um den Einfluss des von NOS produzierten NO zu untersuchen, können diese Enzyme pharmakologisch mittels N^G-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) gehemmt werden. Dieser Wirkstoff wurde in klinischen Studien zur Behandlung des septischen Schocks getestet. Allerdings führte die Gabe des Hemmstoffes dosis-abhängig zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes und damit zum Anstieg des Blutdrucks (Avontuur *et al.*, 1998).

1.3 NO-sensitive Guanylyl-Cyclase

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) gehört zur Familie der Guanylyl-Cyclasen (GC), welche die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysieren. Sie werden abhängig von ihren Aktivatoren in zwei Gruppen unterteilt: die NO-sensitive Form (NO-GC), die durch NO stimuliert wird (Schultz *et al.*, 1977; Murad *et al.*, 1978) und die Peptid-aktivierte Form (pGC), die durch natriuretische Peptide aktiviert wird (Waldman *et al.*, 1984; Winquist *et al.*, 1984). Während die als Homodimere vorkommende pGC membrangebunden vorliegt, wurde die NO-GC jahrelang als lösliche oder cytosolische GC bezeichnet. Russwurm *et al.* (2001) konnten jedoch nachweisen, dass auch die NO-GC Membranassoziiert vorliegen kann. Die NO-GC ist der wichtigste Rezeptor für das Signalmolekül NO (Friebe & Koesling, 2003). Zur Abgrenzung von der pGC wird sie, aufgrund ihrer Affinität zu NO, in dieser Arbeit als NO-GC bezeichnet.

Sie besitzt im Gegensatz zu anderen Häm-Proteinen, wie Hämoglobin oder Myoglobin, eine höhere Affinität zu NO als zu Sauerstoff (Gerzer *et al.*, 1981a). Neben NO kann auch Kohlenstoffmonoxid an die NO-GC binden. Dies führt jedoch nur zu einer 4-fachen Aktivierung des gereinigten Enzyms, während die Bindung von NO eine 100- bis 200-fache Aktivierung bewirkt (Gerzer *et al.*, 1981b).

Bei der NO-GC handelt es sich um ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer ß-Untereinheit (UE). Die α -UE besteht aus den beiden Splicevarianten α_1 und α_2 , die beide als Dimerisierungspartner der β_1 -UE dienen können (Russwurm *et al.*, 1998). Obwohl die beiden Dimere nur geringe Sequenzhomologien in der N-terminalen Region aufweisen, gibt es keine Unterschiede in der katalytischen Fähigkeit, NO-Stimulierbarkeit oder Substrataktivität (Russwurm *et al.*, 2001). Die Kombination aus α_1 - und β_1 -Unterheinheit stellt jedoch das in unterschiedlichen Geweben am häufigsten vorkommende Dimer dar (Mergia *et al.*, 2003), während das $\alpha_2\beta_1$ -Herterodimer vorwiegend in neuronalem Gewebe lokalisiert ist und ihr daher eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission zugeschrieben wird (Burette *et al.*, 2002).

Jede Untereinheit besteht aus einer C-terminalen katalytischen Domäne, einem zentralen Teil und einer regulatorischen N-terminalen Region. Die regulatorische Domäne enthält eine prosthetische Häm-Gruppe, die mit Hilfe des Kofaktors Mg²⁺ NO bindet und somit einen NO-Fe²⁺-His-Komplex formt. Dies führt zur Spaltung der His-Fe²⁺-Bindung, was eine Konformationsänderung bewirkt und somit zur Aktivierung der NO-GC führt (Ignarro, 1990).

ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1one) ist ein potenter spezifischer Inhibitor der NO-GC und weist gleichzeitig keine Beeinflussung der membranständigen GC noch der Adenylyl-Cyclase (AC) auf (Garthwaite *et al.*, 1995). ODQ oxidiert das an die Häm-Gruppe gebundene zweiwertige Eisen-Ion und verhindert so die Bindung von NO (Schrammel *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2000). Im Zuge dessen bleibt die Stimulation der NO-GC aus. ODQ hemmt, abhängig von der eingesetzten NO-Donor-Konzentration, mit einer IC₅₀ von 0,2 bis 0,7 μ M die NO-GC *in vitro* irreversibel (Schrammel *et al.*, 1996). *In vivo* ist die ODQ-vermittelte Hemmung der GC ab einer bestimmten NO-Konzentration nicht mehr vollständig (Lies *et al.*, 2013).

1.4 Effektorproteine von cGMP

1963 wurde cGMP erstmals im Rattenurin (Ashman *et al.*, 1963) nachgewiesen. Dieser sekundäre Botenstoff wird durch die katalytische Aktivität der GC gebildet. Die intrazelluläre Erhöhung des cGMP-Spiegels beeinflusst unterschiedliche Effektoren, wie cGMP-abhängige Phosphodiesterasen, cGMP-regulierte Proteinkinasen (PKG) und cGMP-regulierte Ionenkanäle (Denninger & Marletta, 1999) und vermittelt so das extrazelluläre Signal.

1.4.1 cGMP-abhängige Phosphodiesterasen

Die Aktivierung der NO-GC führt zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration, während die Stimulierung der Adenylyl-Cyclase durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren zu einer gesteigerten cAMP-Synthese führt. Diese beiden sekundären Botenstoffe lösen vielfältige physiologische Effekte aus, die durch die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung in cGMP bzw. cAMP durch Phosphodiesterasen (PDEs) terminiert wird. Sie bauen diese zu Guanosinmonophosphat (GMP) bzw. Adenosinmonophosphat (AMP) ab. Bereits in den 1960er Jahren führten Butcher and Sutherland (1962) erste Untersuchung zur Wirkweise von "3[•],5[•]-nucleotide phosphodiesterases" durch. Allen Säugetier-PDEs gemeinsam ist eine etwa 270 Aminosäuren lange konservierte, katalytische Domäne im C-terminalen Teil des Enzyms (Charbonneau *et al.*, 1986). Dieser katalytische Kern ist für die Spaltung der in zyklischen Nukleotiden enthaltene Phosphodiesterbindung notwendig. Die Familie der PDEs besteht aus 11 Isoenzymen, die sich in ihrer Substratspezifität, Gewebelokalisation und Regulation unterscheiden (Bender & Beavo, 2006). Anhand ihrer Substratspezifität werden die PDEs in verschiedene Klassen eingeteilt: cAMPspezifische PDEs sind PDE4, PDE7 und PDE8, cGMP-spezifische PDEs sind PDE5, PDE6 und PDE9. Zu den PDEs mit dualer Substratspezifität gehören PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11 (Francis *et al.*, 2001; Bender & Beavo, 2006). In dieser Arbeit wurde die PDE3 untersucht, die im Folgenden näher beschrieben wird.

1.4.1.1 Phosphodiesterase 3

Die Phosphodiesterase 3 (PDE3) gehört zur Gruppe der PDEs mit gemischter Substratspezifität, wobei die Bindungsaffinität für cGMP höher ist als für cAMP. Allerdings ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit für cAMP 10-fach höher als für cGMP, weshalb sie auch als cGMP-inhibierte PDE bezeichnet wird. Die PDE3 ist somit ein wichtiger Verknüpfungspunkt zwischen dem cGMP- und dem cAMP-Signalweg. Ihre Aktivität wird mittels Phosphorylierung durch die Kinasen PKA, PKB und PKC beeinflusst (Shakur et al., 2001). Zwei Gene kodieren für zwei PDE3-Isoenzyme: PDE3A und PDE3B. Beide Subtypen besitzen an ihrem N-Terminus eine lange und eine kurze hydrophobe Domäne. Die aus 195 Aminosäuren bestehende lange Domäne bildet 6 Transmembranhelices, die eine Bindung an die Membran erlauben (Shakur et al., 2001). Während die PDE3A in Thrombozyten, in Herzmuskelzellen, Oozyten und glatter Gefäßmuskulatur stark exprimiert wird, kommt die PDE3B vorwiegend in Hepatozyten, Adipozyten und Nierengewebe vor (Wechsler et al., 2002). Durch Deletion der PDE3A kommt es zu einer Fehlregulation bei der Proliferation von vaskulären Myozyten (Begum et al., 2011). und in weiblichen Mäusen, durch fehlende Oozyten-Reifung, zur Unfruchtbarkeit (Masciarelli et al., 2004). Der Verlust der PDE3B kann zu einer Transdifferenzierung des weißen Fettgewebes in braune Fettzellen führen (Guirguis et al., 2013). Durch alternatives Spleißen oder unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte entstehen drei verschiedene Isoformen der PDE3A (1-3), die bis auf unterschiedlich lange N-Termini die gleiche Aminosäuresequenz besitzen (Zaccolo & Movsesian, 2007). Hierzu gehört die membranständige PDE3A1 mit einem Molekulargewicht von etwa 136 kDa, die PDE3A2 (118 kDa), die sowohl membranständig als auch cytosolisch vorliegt, sowie die cytosolische 94 kDa schwere PDE3A3. Die Spleißvarianten unterscheiden sich je nach Gewebe und Herkunft in ihrem Molekulargewicht. Während in humanem

Herzgewebe alle drei Isoformen vorkommen, können in murinem Aortengewebe lediglich PDE3A2 und PDE3A3 nachgewiesen werden. Das PDE3B-Gen kodiert ausschließlich für eine Spleißvariante mit einem Gewicht von ca. 125 kDa.

Pharmakologisch kann die PDE3 durch die selektiven Inhibitoren Cilostamid (IC_{50} 20 nM) oder Milrinon (IC_{50} 150 nM (Harrison *et al.*, 1986)) gehemmt werden. Medizinisch findet die PDE3-Blockade Anwendung in der akuten Behandlung der Herzinsuffizienz, da die Hemmung der PDE3 durch die Akkumulation von cAMP eine positiv inotrope Wirkung auf den Herzmuskel hat (Baim *et al.*, 1983).

1.4.2 cGMP-abhängige lonenkanäle

Eine weitere Gruppe von cGMP-regulierten Proteinen sind nicht-selektive Ionenkanäle (CNG-Kanäle; "cyclic nucleotide-gated channels"), bei denen es sich um Kationenkanäle handelt (Yu et al., 2005). Sie wurden erstmals in den Photorezeptorzellen der Retina (Fesenko et al., 1985) und in olfaktorischen Neuronen (Nakamura & Gold, 1987) nachgewiesen und spielen dort eine entscheidende Rolle im Seh- und Riechprozess. CNG-Kanäle kommen zudem im Darmepithel, in der Niere, dem Gehirn und im Herzen vor (Biel et al., 1994). Sie weisen meist eine höhere Sensitivität für cGMP als für cAMP auf, obwohl das Maß abhängig vom Typ des CNG-Kanals ist (Hofmann et al., 2005). Sie sind durchlässig für verschiedene Kationen, vor allem für K⁺ und Na⁺, aber auch für Ca²⁺ (Frings et al., 1995). Ihre Aktivität wird sowohl durch Phosphorylierung, als auch durch die Ca²⁺/CaM-Bindung beeinflusst (Kaupp & Seifert, 2002). Die Bindung von intrazellulärem cGMP im C-Terminus dieser Kanäle bewirkt einen Einstrom von Na+ und Ca²⁺, die wiederum als tertiäre Botenstoffe weitere Signalkaskaden in Gang setzen (Biel et al., 1999). Zu den CNG-Kanälen zählen auch HCN-Kanäle ("hyperpolarizationactivated cyclic nucleotide-gated cation channel"), Diese Kanäle werden im Gegensatz zu den meisten anderen spannungsabhängigen lonenkanälen nicht durch Depolarisation, sondern bei einem hyperpolarisierten Membranpotential aktiviert. Außerdem leiten sie sowohl K⁺- als auch Na⁺-Ionen, so dass es bei hyperpolarisierter Membran zu einem depolarisierenden Einstrom von Na⁺ kommt. Reguliert werden diese Kanäle durch den Sympathikus, der über adrenerge Rezeptoren eine Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirkt. Sie sind verantwortlich für die Schrittmacheraktivität von Neuronen oder Sinusknotenzellen im Herzen. Der durch HCN-Kanäle geleitete Strom ist wesentlich für die diastolische Depolarisation des Sinusknotens verantwortlich.

1.5 Effektorproteine von cAMP

Das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde von Sutherland and Rall (1958) entdeckt, als sie die Wirkweise von Hormonen auf die Bildung von Glykogen aus

Glukose in der Leber untersuchten. Das durch Adenylyl-Cyclasen (AC) gebildete cAMP vermittelt, wie cGMP, eine Relaxation der glatten Muskulatur. In Leber- und Muskelzellen wird die AC über ein System aus β -Adrenozeptor und stimulierendem G-Protein (Gs) aktiviert. Dabei binden verschiedene Hormone wie z.B. Adrenalin oder Noradrenalin an den β-Adrenozeptor, der wiederum an ein G-Protein gekoppelt ist. Durch diese Bindung dissoziiert das G-Protein in seine drei Untereinheiten (α -, β - und γ -UE). Die α -UE ersetzt GDP durch GTP und aktiviert daraufhin die AC. Die AC katalysiert nach Aktivierung Mg²⁺-abhängig die Bildung von cAMP aus 5'-Adenosintriphosphat (ATP). Dabei entsteht zusätzlich Pyrophosphat, welches sofort in zwei anorganische Phosphate zersetzt wird und so die Reaktion irreversibel macht. Der Haupteffektor des sekundären Botenstoffs cAMP ist die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Sie bewirkt durch Phosphorylierung und damit Hemmung der Kinase der Myosin- leichten Kette (MLCK) eine Relaxation der glatten Muskelzellen. In höheren Konzentrationen bindet cAMP auch an die PKG und reguliert somit die Ca2+-Freisetzung (Francis & Corbin, 1999). Der Botenstoff cAMP aktiviert des Weiteren die Untergruppe der CNG-Kanäle, die HCN-Kationenkanäle. Forskolin, ein nicht-selektiver Aktivator der AC (Hanoune & Defer, 2001), wird in der Forschung zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eingesetzt.

1.6 NO/cGMP-Signalkaskade im vaskulären System

Die NO/cGMP-Signalkaskade spielt im vaskulären System eine entscheidende Rolle, da sie u.a. durch Kontraktion und Relaxation der Gefäße den Blutdruck reguliert und an den Prozessen der Angio- und Arteriogenese beteiligt ist (Bettaga *et al.*, 2015). Selbst ohne äußere Einflüsse besitzt die glatte Muskulatur einen myogenen Basistonus der durch den Phosphorylierungsgrad der leichten Kette des Myosins (MLC) bestimmt wird. Dies wird entweder durch die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und/oder durch Aktivierung der Rho-Kinase induziert. Das in Endothelzellen durch eNOS produzierte NO diffundiert in die glatten Muskelzellen, inhibiert diesen Weg und führt zu einer Relaxation des Gewebes. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Mechanismen dargestellt.

Zunächst wird der Ca²⁺-abhängige Weg beschrieben, bei dem die Bindung von Liganden, wie z.B. Histamin oder Endothelin, an den Gq-Protein-gekoppelten-Rezeptor eine Kontraktion der glatten Muskelzellen (SMC) bewirkt. Grund dafür ist die durch Bindung der Liganden ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors, der darauffolgend die Phospholipase C_{β} (PLC_{β}) aktiviert (Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004). PLC_{β} spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Bei steigendem intra-luminalem Druck werden die Botenstoffe IP₃ und DAG vermehrt synthetisiert (Narayanan



Abb. 2: Signalwege in der glatten Muskulatur

Die NO/cGMP-Signalkaskade spielt auch im vaskulären System eine entscheidende Rolle, da sie u.a. durch Kontraktion und Relaxation der Gefäße den Blutdruck reguliert. Der Phosphorylierungsgrad der Myosin-leichten-Kette (MLC) bestimmt den myogenen Zustand. Dies wird entweder durch die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und/oder durch Aktivierung der Rho-Kinase induziert. Für weitere Erklärungen siehe Text. et al., 1994). DAG aktiviert die Proteinkinase C_α (Laher & Bevan, 1987; Yeon et al., 2002), die wiederum durch Phosphorylierung die Leitfähigkeit von spannungsgesteuerten L-Typ Ca²⁺-Kanälen ("voltage gated calcium channels", CaV) erhöht (Yeon et al., 2002). Durch IP₃ wird ein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) sitzender Ca²⁺-permeabler Ionenkanal, der IP₃-Rezeptor, aktiviert. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Ausstrom von Ca2+-Ionen aus dem ER in das Cytosol (Bootman et al., 2002; Hisatsune et al., 2005). Durch DAG und IP₃ steigt somit die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration an. Die freien Ca²⁺-Ionen bilden mit Calmodulin (CaM) einen Komplex, der die CaM-abhängige Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert. Diese Kinase phosphoryliert die Myosin-leichte-Kette (MLC (Somlyo & Somlyo, 2003)), was die Interaktion von Aktin und Myosin ermöglicht und so eine Kontraktion der glatten Muskulatur bedingt (Webb, 2003; Murthy, 2006).

Eine andere Kaskade führt Ca²⁺-unabhängig zur Phosphorylierung von MLC und dadurch zur Kontraktion (Klages *et al.*, 1999). Auch hier beginnt die Signalkaskade bei G-Proteinen. So aktivieren Hormone wie Thromboxan A₂ (TXA₂) die Proteine der G_{12/13}-Familie, was zu einer Stimulation der kleinen GTPase RhoA führt, die ihrerseits die Rho-Kinase (ROCK) aktiviert (Somlyo & Somlyo, 2003). Daraufhin kann ROCK die MLCP phosphorylieren und sie somit

inaktivieren. Infolge dessen steigt der Anteil des phosphorylierten Myosins, was Ca²⁺-unabhängig eine Kontraktion der Muskulatur bewirkt. Diese Kontraktionsmechanismen werden sowohl bei chemischen Stimuli, als auch bei Druckerhöhung ausgelöst (Davis & Hill, 1999; Schubert *et al.*, 2008), Allerdings reagieren die großlumigen Leitgefäße wie die Aorta weitgehend passiv auf Druckveränderungen (Davis *et al.*, 1986). Die kleineren Widerstandsgefäße wie Arterien und Arteriolen hingegen, besitzen einen myogenen Tonus und können durch Veränderung ihres Gefäßdurchmessers die Druckänderung ausgleichen (Davis, 1993; Naik *et al.*, 2005).

Der Gegenprozess der Kontraktion, die Relaxation der glatten Muskulatur, wird durch die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP vermittelt. Die AC produziert nach Aktivierung durch ein G-Protein den sekundären Botenstoff cAMP. Dieses Molekül aktiviert die Proteinkinase (PKA), was eine Inhibition der MLCK zur Folge hat. Dadurch wird die Phosphorylierung von MLC verhindert und somit eine Relaxation der glatten Muskulatur ausgelöst. Der für diese Arbeit wichtigere Botenstoff cGMP wird im Gefäßsystem hauptsächlich von der NO-GC nach NO-Stimulation synthetisiert. cGMP aktiviert die PKGI (Lincoln *et al.*, 1995), was über verschiedene Mechanismen zu einer Relaxation führen kann. Einerseits phosphoryliert die PKGI die MLCP, wodurch es zu einer Dephosphorylierung der MLC kommt und somit die Aktin-Myosin-Interaktion

reduziert wird. Andererseits phosphoryliert die PKGI einen Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanal, den BK_{Ca}-Kanal, und erhöht damit dessen Offenwahrscheinlichkeit. Dadurch kommt es zu einem vermehrten K⁺-Ausstrom und folglich zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Diese Hyperpolarisation hemmt spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanäle, wodurch der Ca²⁺-Einstrom verringert wird und infolgedessen eine Relaxation zustande kommt (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999; Sausbier *et al.*, 2000). Einen dritten Relaxationsmechanismus stellt die Phosphorylierung des Proteins IRAG ("IP₃-receptorassociated cGMP-dependent kinase-substrate") durch die Spleißvariante PKGI_β dar. Die Phosphorylierung bewirkt eine Hemmung der IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER (Schlossmann *et al.*, 2000), wodurch die MLCK nicht aktiviert und somit keine Kontraktion ausgelöst werden kann.

Das Absinken der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in der Zelle wird durch die Ca²⁺-ATPase SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) verursacht. Sie ist sowohl für die Wiederaufnahme von Ca²⁺ in intrazelluläre Speicher als auch für dessen Transport in den extrazellulären Raum verantwortlich (Shull, 2000). Ausgehend von drei Genen werden fünf verschiedene Isoformen kodiert, wobei SERCA2b in glatten Muskelzellen und SERCA3 in Endothel- und Epithelzellen von Bedeutung bei der Blutdruckregulation sind (Anger *et al.*, 1994). Die sinkende Ca²⁺-Konzentration inaktiviert die MLCK, wodurch es zur Dephosphorylierung der MLC durch die MLCP kommt, was eine Relaxation der glatten Muskulatur zur Folge hat (Somlyo & Somlyo, 1994).

1.7 Das Blutgefäßsystem

Die Hauptaufgaben des Blutgefäßsystems sind die Versorgung des Körpers mit Sauerstoff und Nährsubstraten, ebenso wie der Abtransport von Stoffwechselprodukten und Kohlendioxid. Auch dient das zirkulierende Blut dem Hormontransport, zur interzellulären Kommunikation und der Wärmeverteilung. Aus diesen Gründen ist eine konstante Durchblutung für die adäquate Funktion der Organe notwendig.

Der Blutkreislauf, beginnend mit dem Herzen, wird in den großen (Körper-)Kreislauf und den dahinter geschalteten kleinen (Lungen-)Kreislauf unterteilt. Vom linken Ventrikel des Herzens wird sauerstoffreiches (oxygeniertes) und kohlendioxidarmes Blut pulsatil durch Kontraktion des Herzmuskels in die Aorta und das nachgeordnete Gefäßnetz aus Arterien, Arteriolen und schließlich Kapillaren gepumpt. In den Kapillaren der Organe findet der Nährstoffaustausch statt. Aus dem Kapillarbett fließt das nun sauerstoffarme (desoxygenierte) und kohlendioxidreiche Blut über Venolen und Venen zurück zum rechten Vorhof, gelangt in den rechten Ventrikel und wird von dort durch die Lungenarterie in die Lungenkapillaren gepumpt (Lungenkreislauf). In der Lunge, genauer gesagt zwischen Venolen und Lungenbläschen, findet der Gasaustausch statt.

Das Blut wird erneut mit Sauerstoff angereichert und Kohlendioxid aus dem Blut abgegeben. Aus dem Kapillarbett der Lunge gelangt das re-oxygenierte Blut über die Lungenvenen zum linken Vorhof, um von dort erneut in den Körperkreislauf einzutreten. Funktionell wird der Kreislauf in ein Hochdruck-, ein Niederdrucksystem und die Mikrozirkulation gegliedert. Zum Hochdrucksystem zählen der linke Ventrikel in der Systole, Aorta, Arterien und Arteriolen. Das Niederdrucksystem besteht aus der gesamten Lungenstrombahn, d.h. den Venen, den beiden Vorhöfe und dem rechten sowie linken Ventrikel in der Diastole. Zu den Austauschgefäßen der Mikrozirkulation zählen die kleinen Gefäße des Kreislaufsystems: Arteriolen, Kapillaren und Venolen, sowie die im Gewebe liegenden Lymphgefäße. In ihnen findet der Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Interstitium statt.

1.7.1 Funktion und Aufbau der Blutgefäße

Um die unterschiedlichen Anforderungen an das Herz-Kreislauf-System erfüllen zu können, gibt es verschiedene Arten von Blutgefäßen, die sich in ihrem Aufbau und damit ihren Eigenschaften unterscheiden (Jain, 2003). Sie werden abhängig von ihrem Aufbau in Hauptschlagader (Aorta), Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen, Venolen und die beiden Hohlvenen unterteilt.

Das oxygenierte Blut wird durch Aorta, Arterien und Arteriolen auf die Peripherie verteilt. Um das vom Herzen stoßweise ausgeschüttete Blut in eine kontinuierliche Strömung umzuwandeln, besitzen die Aorta und die großen Arterien durch Einlagerung von elastischen Fasern sehr dehnbare Gefäßwände. Indem sie durch den hohen Druck während der Systole erweitert werden und so einen Teil des ausgeworfenen Blutvolumens in dem vergrößerten Lumen speichern, sind sie in der Lage die Energie der vom Herzen ausgehenden Druckpulswelle aufzunehmen. Diese Volumendehnbarkeit wird als "Windkesselfunktion" bezeichnet. Die als Widerstandsgefäße bezeichneten kleinen Arterien und Arteriolen beeinflussen den peripheren Widerstand hauptsächlich durch ihren geringen Innenradius und weniger durch ihre Gesamtoberfläche. Der Strömungswiderstand hängt nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz von der Rohrlänge, der Blutviskosität und umgekehrt proportional von der vierten Potenz des Innenradius ab. In den nachgeschalteten Kapillaren und postkapillaren Venolen findet der Gas- und Stoffaustausch statt. Kapillaren sind sehr dünnwandig, was den Austausch mit dem venösen Netz erleichtert. Dies wird zusätzlich durch die große Anzahl und die niedrige Blutgeschwindigkeit begünstigt. Kapillaren selbst sind amuskulär, allerdings sitzen auf ihnen Perizyten, die mit ihren Fortsätzen das Gefäß umspannen (Attwell et al., 2016). Da Perizyten kontraktil sind, können sie den Gefäßdurchmesser der Kapillaren beeinflussen und tragen so zur Regulation des Blutdrucks bei (Hall *et al.*, 2014). Von den Kapillaren fließt das Blut in das venöse System. Venen dienen aufgrund ihrer relativ dünnen Wand (wenige glatte Muskelzellen, aber viele elastische Fasern) und ihres großen Fassungsvolumens als Blutreservoir. Sie werden deshalb auch als Kapazitätsgefäße bezeichnet. Aufgrund der niedrigen Anzahl an glatten Muskelzellen, besitzen sie allerdings nur eine geringe Kontraktionsfähigkeit. Um dennoch den venösen Rückstrom entgegen der Schwerkraft zu gewährleisten, sind von außen wirkende Kräfte notwendig. Auf zwei verschiedene Arten kommt es zu einem Sog: einerseits wird durch Senkung der Ventilebene des Herzens während der Systole und andererseits durch den nach der Inspiration entstandenen Überdruck im Brustraum bei gleichzeitigem Unterdruck im Bauchraum das Blut nach oben gesogen. Zusätzlich sorgt die Kontraktion der Skelettmuskulatur für eine Komprimierung der Venen, was den Rückfluss des Blutes zum Herzen begünstigt. Die in regelmäßigen Abständen vorkommenden Venenklappen, verhindern das Zurückfließen des Blutes in die Peripherie.

Die Wand (*Tunica*) aller großen Blutgefäße ist grundsätzlich gleich aufgebaut (Abb. 3). Sie ist ein heterogen geschichtetes Netzwerk aus verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen (EC), glatten Muskelzellen und Fibroblasten, die über auto-parakrine Interaktionen verbunden sind. Es werden drei verschieden aufgebaute Wandabschnitte unterschieden. Der innersten Schicht (*Tunica intima*), die mit der *Lamina elastica interna* endet, folgt die *Tunica media*. Diese mittlere Schicht muss der durch den Blutdruck ausgelösten Dehnung des Gefäßes entgegenwirken und reguliert über den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen den Gefäßdurchmesser. Sie besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, ringförmig verlaufendem kollagenen Bindegewebe, sowie elastischen Fasern. Die in der *Tunica media* enthaltenen lamellaren Einheiten ("elastic lamellae") bilden die funktionelle Basis der Gefäßwand. Sie ziehen sich

ringförmig in vielen engen Windungen durch die Gefäßwand und stehen über feine Fasern miteinander in Verbindung. Intermediäre Kollagenfasern in der *Tunica media* sind wichtig für die Zugfestigkeit der Gefäße. Nach außen wird diese mittlere Schicht durch die *Lamina elastica externa* abgegrenzt. Den abschließenden Wandteil des Blutgefäßes bildet die *Tunica adventitia*, die als kollagene Bindegewebsschicht das Gefäß im umliegenden Gewebe verankert. Die EC der Intima kleiden als einschichtiges Endothel das Gefäßlumen aus und bilden als stark Stoffwechsel-aktive Zellen die Grundlage für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (Davies, 1995; Chien, 2007). Durch ihre selektive Permeabilität beeinflussen sie die Diffusion von Nähr- und Botenstoffen und treten durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren sowie stimulierenden und inhibierenden Stoffen in direkten Kontakt mit den SMC der *Tunica*





Abb. 3: Aufbau einer Arterie

A) Durchlichtbild eines Aortenschnitts (20 μ m) gefärbt mit α -SMA-Anitkörper **B)** Schematische Darstellung der Aorta. Das durch die eNOS in Endothelzellen (EC) der *Tunica intima* produzierte NO diffundiert in die Glattmuskelzellen (SMC) der *Tunica media* und aktiviert dort die NO-GC. Dies führt zur Produktion des sekundären Botenstoffes cGMP, der letztlich eine Relaxation der SMC bewirkt. Zwischen den Zellen befindet sich die extrazelluläre Matrix (ECM). media. Dadurch kontrollieren sie die myogenen Prozesse, die Adhärenz von Immunzellen (Wagner et al., 2011) und verschiedene Remodellierungsprozesse wie Angiogenese und Arteriogenese (Yancopoulos et al., 2000). Im Gegensatz zu den EC sind die SMC mehrschichtig zirkulär angeordnet und integrieren in die elastischen Lamellen. Sie regulieren durch zirkuläre Kontraktion bzw. Dilatation den Gefäßdurchmesser und damit den Gefäßtonus. Sie exprimieren verschiedene Kontraktilitäts-vermittelnde Proteine, wie glattmuskuläres Aktin (SMA) oder die glattmuskuläre schwere Kette des Myosins (SMMHC). Auch synthetisieren und sezernieren die SMC verschiedene Proteine und Kohlenhydrate, die die extrazelluläre Matrix bilden. Der genaue Aufbau dieser Matrix unterscheidet sich je nach Anforderung und Lokalisation der Gefäße (Michel et al., 2012). So ist beispielsweise in die extrazelluläre Matrix von Knochen und Zähnen Ca²⁺ zur Verhärtung eingebaut. Der Elastin-Gehalt ist maßgeblich für die Dehnbarkeit der Gefäße und damit für die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutdrucks. So enthält die ECM der Aorta zur Gewährleistung der Windkesselfunktion mehr Elastin als die Gefäßwand der Venen. Bei verschiedenen Krankheiten und im Alter kann sich der Elastin-Anteil durch verschiedene Remodellierungsprozesse reduzieren und der Kollagen-Anteil erhöhen, was zur Versteifung der Gefäße führt (Brooke et al., 2003).

1.7.2 Aorta

Die Aorta transportiert als größte Arterie des elastischen Bautyps oxygeniertes Blut von der linken Herzkammer in den Körper zur weiteren Versorgung aller Organe. Sie wird in einen thorakalen und einen abdominellen Abschnitt unterteilt. Der in dieser Arbeit untersuchte thorakale Abschnitt wird in 3 Segmente unterteilt: *Aorta ascendens*, Aortenbogen und *Aorta descendens*. Im Verlauf der Aorta nimmt der Anteil von Kollagen gegenüber den elastischen Fasern in der *Tunica media* zu, so dass der abdominale im Vergleich zum thorakalen Abschnitt weniger stark reversibel dehnbar ist und der Druck zunimmt. Die Aorta ist durch den hohen Teil an Elastin in der Lage, den stoßartigen Blutstrom des Herzens in eine kontinuierlich-phasische Strömung umzuwandeln (Windkesselfunktion). Nach Schluss der Aortenklappe geht die Gefäßwand wieder auf ihre ursprüngliche Größe zurück und befördert dabei das Blut durch die elastischen Rückstellkräfte kontinuierlich in den Körperkreislauf.

1.8 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein komplexes Netzwerk aus sezernierten Proteinen und Kohlenhydraten, also der gesamte Gewebsanteil, der sich zwischen den Zellen im interzellulären Raum befindet. Zusammen mit den eingelagerten Zellen bildet die ECM das Bindegewebe. Sie ist essentiell für die Gewebsstruktur, formiert und verankert einzelne Zellen zu Verbänden, dient als interner Wasserspeicher und vermittelt Signale für Zell-Bewegung, -Wachstum und -Differenzierung. Im erwachsenen Organismus wird ECM bei verschiedenen pathologischen Prozessen, die beispielsweise der Wundheilung, Angiogenese oder Metastasierung, verändert. An diesen lokalen Umbauprozessen sind vor allem extrazelluläre Metallo- und Serinproteasen beteiligt. Die Komponenten der ECM werden hauptsächlich durch Fibroblasten und ihren Nachfolgerzellen gebildet. Sie besteht aus einer Vielzahl an Makromolekülen, die sich grob in Grundsubstanz und den darin eingebetteten Fasern einteilen lassen. Zu den hydratisierten, gelartigen Grundsubstanzen zählen neben den stark Glykosaminoglykanen, die kovalent an Proteine gebunden sind und Proteoglykane bilden, auch verschiedene Adhäsionsproteine und Elektrolyte. Diese Substanzen bedingen die Druckfestigkeit der Matrix und erlauben die Diffusion von Nährstoffen und Hormonen zwischen Blut und den Zellen. In diese Grundsubstanz sind strukturgebende Fasern aus Kollagen und Elastin und verschiedene adhäsive Proteine eingebettet. Kollagen verleiht den Geweben ihre Zugfestigkeit, während Elastin die Verformbarkeit ermöglicht. Die adhäsiven Proteine wie Fibronektin, Fibrinogen und Laminin beeinflussen die Signaltransduktion zwischen den Gewebszellen und der ECM.

1.8.1 Kollagen

Kollagen ist mit bis zu 30% das am häufigsten vorkommende Protein im Wirbeltier-Körper. Es zählt zu den Skleroproteinen, ist wasserunlöslich und faserig aufgebaut. Kollagene sind organspezifisch unterschiedlich zusammengesetzt, obwohl die Grundeinheit, das Tropokollagen, immer aus drei Peptidketten besteht. Zudem ist jede dritte Aminosäure Glycin (Gly), das durch seine geringe Größe ideal in die engen Windungen der rechtsgängigen Tripelhelix passt. Je nach Typ besteht jede einzelne Helix aus 600 bis 3000 Aminosäuren, die repetitive Gly-X-Y-Sequenzen enthalten. An Position X befindet sich häufig ein Prolin, das aufgrund seiner starren Ringstruktur die Ausbildung von engen Windungen in der Helix unterstützt. Das 4-Hydroxyprolin, das sich oft an Position Y befindet, stabilisiert über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Polypeptidketten die Tripelhelix. Dadurch wird die Helix zu einer steifen und zugfesten Faser von ca. 300 nm Länge und etwa 1,5 nm Dicke. Prokollagen wird hauptsächlich von Fibroblasten, aber auch von Chondrozyten und vielen anderen Zellen sezerniert. Die am rauen ER dieser Zellen hergestellten Kollagen-Polypeptidketten werden zunächst an einzelnen Prolin- und Lysinresten hydroxyliert. Bei diesem Prozess spielt Vitamin C eine entscheidende Rolle. Fehlt dieser Cofaktor, kommt es zur fehlerhaften Biosynthese von Kollagen und dadurch zur Mangelerkrankung Skorbut.

Nach Hydroxylierung kommt es durch Ausbildung von Disulfidbindungen zwischen den C-terminalen Propetiden zur Tripelhelixbildung. Das so entstandene Prokollagen wird meist noch am Golgi-Apparat glykosyliert und anschließend durch Exozytose mittels sekretorischer Vesikel in den Extrazellularraum entlassen. Nach diesen Modifikationsreaktionen lagern sich die Prokollagen-Ketten zu tripelhelikalen Tropokollagen-Molekülen zusammen. Durch diese sich periodisch wiederholenden Tropokollagen-Moleküle, erkennt man elektronenmikroskopisch eine typische Querbänderung mit einem Abstand von 64 nm. Im letzten Schritt wird die Gesamtstruktur durch kovalente Quervernetzung einzelner Tropokollagen-Einheiten zu Fibrillen zusätzlich stabilisiert. Die Anordnung der Fibrillen ist abhängig von der Funktion im jeweiligen Gewebe. So sind sie in Sehnen zur Kraftübertragung parallel ausgerichtet, wohingegen sich im Glaskörper des Auges ein lichtdurchlässiges Fibrillen-Netz bildet.

1.8.2 Elastin

Elastin ist ein weiteres wichtiges Strukturprotein, das den Hauptanteil der elastischen Fasern im Bindegewebe von Wirbeltieren darstellt. Es kommt hauptsächlich in der Haut, der Lunge und den Blutgefäßen vor und ist für deren Spannkraft und Elastizität verantwortlich. Die Primärstruktur ist ähnlich der des Kollagens, jedoch enthält sie Valin anstelle von Hydroxylysin. Im Gegensatz zu Kollagen ist Elastin sehr dehnbar. Die elastischen Eigenschaften erhält dieses Protein besonders durch den hohen Anteil an Aminosäuren mit Isopren-ähnlichen Seitenketten, also Isoleucin, Leucin und Valin. Von größter Bedeutung für die Dehnfähigkeit des Elastins ist die Aminosäure Lysin. Lysinreste werden durch das Enzym Lysyloxidase zu Allysin oxidiert. Drei Allysine zusammen mit einem Lysin bilden ein ringförmiges Desmosin, das die Hitzestabilität, Resistenz gegen viele Proteasen und Wasserunlöslichkeit des Elastins bedingt. Durch periodische seitliche Verkettung der benachbarten Desmosine entsteht ein gummiartiges, dehnbares und dichtes Netz. Elastin wird von den Zellen in der wasserlöslichen Form des Tropoelastins sezerniert und sofort extrazellulär vernetzt.

1.8.3 Vaskuläres Remodelling und Pulswellengeschwindigkeit

Das Gefäß reagiert auf veränderte äußere und innere Bedingungen mit strukturellen Veränderungen der Gefäßwand (vaskuläres Remodelling). Diese Umbauvorgänge finden in der ECM statt und betreffen primär die *Tunica media*. Neben diesem physiologischen Umbau kommt es auch zu pathologischen Veränderungen der Wanddicke oder dem Lumen-Durchmesser. Beispielsweise kann das Gefäß auf einen erhöhten Druck mit der Verdickung der Gefäßwand reagieren, wodurch sich der periphere Widerstand erhöht. Bei diesen Umbauprozessen nimmt die Elastizität der

Gefäße immer mehr ab. Für die Aorta bedeutet dies einen Verlust der Windkesselfunktion und daraus resultierend eine erhöhte systolische Pulswellengeschwindigkeit (PWV). Dadurch kommt es zur erhöhten Reflexion von Pulswellen und der Uberlagerung dieser bereits in der Systole und nicht wie bei normal elastischen Gefäßen erst in der Diastole. Dies führt zu einem Anstieg des systolischen und Abnahme des diastolischen Blutdrucks und somit zu einer Erhöhung des Pulsdrucks (London, 1997). Auch die Abnahme der aortalen Windkesselfunktion verursacht einen erhöhten systolischen Blutdruck und gleichzeitig wird durch den Verlust ihrer Retraktionskraft ein weiteres Absinken des diastolischen Blutdrucks bedingt. Der erhöhte systolische Blutdruck führt zu einer erhöhten kardialen Nachlast und schließlich zu einer konzentrischen Hypertrophie. Der reduzierte diastolische Blutdruck lässt das Risiko für Ischämien durch die verschlechterte koronare Perfusion steigen (Safar & Lacolley, 2007). Auch führen Impedanzänderungen durch Gefäßverzweigung, Verengung der Gefäße oder abnehmende Elastizität zu Reflexionen der Pulswelle. Bei einer Vielzahl kardiovaskulärer Krankheiten (z.B. Hypertension, Ischämie oder Aneurysmen) kommt es zu einer Dysregulation dieser vaskulären Umbauprozesse. Beim Alterungsprozess jedoch sind der Umbau und damit die Versteifung der Gefäße ein natürlicher Vorgang.

Die Steifigkeit der Arterien, insbesondere der Aorta, dient als Wert für die Einschätzung kardiovaskulärer Risikofaktoren. Kardiovaskuläre Krankheiten sind in Industrieländern die häufigste Todesursache. Die arterielle Hypertonie trat 1995 bereits mit einer Prävalenz von 25% auf (Burette *et al.*, 2002). Als Maß für die Steifigkeit der zentralen Arterien wird in Medizin und Forschung die aortale PWV bestimmt. Sie beschreibt die Geschwindigkeit, mit der die Pulswelle nach Auswurf des Schlagvolumens durch das Gefäßsystem wandert. Laurent *et al.* (2003) zeigten, dass eine erhöhte PWV bei sonst gesunden Hypertonie-Patienten das Auftreten von Schlaganfällen vorhersagen kann. Da sich Veränderungen der großen Arterien schnell in einer Erhöhung der PWV zeigen, stuft die Europäische Gesellschaft für Kardiologie die PWV als signifikanten Marker für hypertensive Endorganschäden ein. Die lokale PWV wird häufig mittels Magnetresonanztomographie bestimmt, da diese Methode ein genaues und nicht-invasives Verfahren darstellt.

1.9 Transgene Maus-Modelle

spielen Genetisch veränderte Mäuse Untersuchung bei der von Signaltransduktionswegen und pathophysiologischen Mechanismen in der medizinischen Forschung eine entscheidende Rolle. Um die Funktion eines bestimmten Enzyms zu untersuchen, wird ein Gen gezielt im Genom verändert. Bei den transgenen Tieren wird das Erbgut entweder durch das Einfügen von Fremd-DNA mittels embryonaler Stammzell-Technik verändert oder ein bestimmtes Gen deletiert oder deaktiviert.

Da das Mausgenom zu 99% mit dem menschlichen Genom übereinstimmt und sogar 96% der Gene in vergleichbarer Nachbarschaft liegen (Capecchi, 1994; Houdebine, 2007), eignen sich Mäuse besonders als Modellorganismen für die wissenschaftliche und klinische Forschung. Ein weiterer Vorteil bei der Arbeit mit Mäusen ist, dass murine embryonale Stammzellen in Kultur gehalten werden können (Capecchi, 1994). Auch hat dieses Tiermodell viele praktische Vorzüge, wie einen geringen räumlichen Anspruch, niedrige Kosten und schnelle Generationsfolge aufgrund der hohen Reproduktionsrate. Um den Mechanismus und die physiologische Rolle der NO/cGMP-Signalkaskade genauer zu erforschen, wurden verschiedene Knock-out (KO)-Mauslinien für die NO-GC generiert. Nachfolgend wird auf die beiden in dieser Arbeit verwendeten KO-Mauslinien eingegangen.

1.9.1 Globaler Knock-out der NO-GC

Durch Deletion der B₁-Untereinheit, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Mauslinie erzeugt, bei der die NO-GC in allen Zellen (GCKO) ausgeschaltet ist. Dafür wurde das Cre-lox-P-System verwendet; ein Rekombinationssystem, das die gezielte Deletion einer bestimmten DNA-Sequenz erlaubt (Metzger & Feil, 1999). Zunächst wurde das Exon 10 der B1-UE der NO-GC mit zwei loxP-DNA-Sequenzen flankiert, die der Cre-Rekombinase (Cre) als Erkennungssequenz dienen. Diese homozygot gefloxten Tiere (B1-flox/flox) wurden dann mit Mäusen gekreuzt, die ubiguitär Cre exprimieren, sodass globale KOs der NO-GC entstanden. Bei diesen globalen KO-Tieren kommt es zu einer starken Wachstumsretardierung und einer verminderten Lebenserwartung. 80% der Tiere sterben innerhalb der ersten zwei Lebenstage. Die übrigen Mäuse sterben infolge einer stark reduzierten gastrointestinalen Motilität bei der Umstellung von Muttermilch auf Festnahrung. Durch Wechsel des Futters auf eine ballaststoffarme Diät mit Omeprazol und Natriumbikarbonat konnte die Überlebensrate gesteigert werden (Friebe et al., 2007). Anatomisch zeigt sich die genetische Veränderung im Gastrointestinaltrakt durch ein stark vergrößertes Caecum und eine erweiterte Gallenblase. Auch das kardiovaskuläre System ist bei diesen KO-Tieren stark betroffen. So haben adulte GCKO-Mäuse einen um 30 mmHg erhöhten systolischen Blutdruck im Vergleich zu ihren Wildtyp(WT)-Geschwistertieren. Bei Organbadversuchen mit Aorten-Ringen bleibt eine NO-vermittelte Relaxation völlig aus. Ebenfalls konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass NO in GCKO-Thrombozyten weder die Thrombin-induzierte Aggregation hemmt, noch die ADP-induzierte Adhäsion oder Thrombin-induzierte Ca²⁺-Ausschüttung beeinflusst. Physiologisch wird dies von der stark reduzierten Blutungszeit der GCKO-Tiere untermauert. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass NO-GC in murinen Thrombozyten und der Aorta der einzige NO-Rezeptor ist, der die Inhibition der Ca²⁺-Ausschüttung, Adhäsion und Aggregation vermittelt (Dangel *et al.*, 2010).

1.9.2 Glattmuskelspezifischer Knock-out der NO-GC

Zusätzlich zum globalen Knock-out (GCKO) wurde ein Zell-spezifisches Mausmodell kreiert, bei dem die NO-GC nur in glatten Muskelzellen deletiert wird (SMC-GCKO); alle übrigen Zellen bleiben unverändert. Zur Generierung dieser Zell-spezifischen KO-Mäuse wurden flox/flox-B1-Mäuse mit Mäusen verpaart, die ein Fusionsprotein der Cre mit einer modifizierten Estrogenrezeptor-Bindestelle (CreER^{T2}) exprimieren. Dieses Fusionsprotein befindet sich unter dem Einfluss des SMMHC("smooth muscle myosin heavy chain")-Promotors (Wirth et al., 2008), so dass bei diesen Tieren die Cre nur in glatten Muskelzellen exprimiert wird. Die Bindung des selektiven Estrogenrezeptor-Modulators Tamoxifen an die CreER^{T2}-Domäne der Cre ermöglicht deren Translokation in den Zellkern. Dort erkennt die Cre die loxP-stellen und schneidet die gefloxten DNA-Sequenzen aus. Dadurch kommt es ausschließlich in glatten Muskelzellen zur Deletion der NO-GC. 50 Tage nach einer 5-maligen Tamoxifen-Injektion (1 mg i.p.) ist die NO-GC in glatten Muskelzellen nicht mehr nachweisbar; immunohistochemische Analysen bestätigen den erfolgreichen Ausschnitt der NO-GC (Groneberg et al., 2010). Da das SMMHC-Cre-Transgen auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, tragen ausschließlich männliche Nachkommen dieses Gen. Deshalb wurden als Kontrollen lediglich männliche Tiere verwendet.

2 Zielsetzung

Das Signalmolekül NO wird in den Endothelzellen der Blutgefäße von der eNOS produziert NO diffundiert in die glatten Muskelzellen (SMC) und stimuliert dort die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC), die GTP zu cGMP umwandelt. Erhöhte cGMP-Spiegel führen in der Zelle zur Aktivierung der PKG und letztendlich zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Diese NO/cGMP-Signalkaskade trägt im vaskulären System entscheidend zur Regulation des Blutdrucks bei. Auch der sekundäre Botenstoff cAMP bewirkt in SMCs durch Stimulierung der PKA eine Relaxation. Eine Schnittstelle zwischen diesen beiden Botenstoffen und ihren Signalkaskaden bildet die cGMP-inhibierte cAMP-abbauende PDE3. Für die Untersuchung dieser Signalkaskaden wurden verschiedene Knock-out Modelle (KO) für die NO-GC verwendet: einerseits KO-Mäuse, bei denen die NO-GC in allen Zelltypen ausgeschaltet ist (GCKO) und andererseits Zell-spezifische KO-Mäuse, bei denen die NO-GC lediglich in glatten Muskelzellen deletiert ist (SMC-GCKO).

Um das Zusammenspiel von cAMP und cGMP näher zu beleuchten, wurde die PDE3 als Schlüsselenzym zwischen diesen beiden Botenstoffen genauer untersucht. Dafür wurden im ersten Teil dieser Arbeit folgende Versuche mit der murinen Aorta durchgeführt:

- Expression und Aktivität der PDE3 in Aortahomogenaten
- Messung der Relaxation von Aorten-Ringen bei PDE3-Blockade
- Einfluss von cAMP-stimulierenden Bedingungen auf die Milrinon-induzierte Relaxation

Der Verlust der NO-GC führt zu einigen Störungen der Körperfunktionen in KO-Mäusen. So zeigen GCKO-Mäuse neben einer verlangsamten gastrointestinalen Motilität auch einen erhöhten systolischen Blutdruck von ~30 mmHg im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die SMC-GCKO-Mäuse zeigen diese Blutdruckerhöhung. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Steifigkeit der Aorta als mögliche Ursache der Blutdruckerhöhung mittels folgender Versuche näher untersucht werden:

- Messung der Steifigkeit der Aorta anhand des Spannungs-Dehnungs-Tests und der Pulswellengeschwindigkeit
- Quantifizierung der am häufigsten vorkommenden ECM-Proteine Kollagen und Elastin
- Untersuchung der Struktur der Aorta

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bradford-Reagenz (5-fach) Bromphenolblau DePex Diclofenac DMBA Eosin Formalin Forskolin Glukose Glycerin 85% Hämatoxylin IBMX Kaliumdihydrogenphosphat L-NAME β-Mercaptoethanol Miglyol 812 Milrinon Natriumhypochloritlösung ODQ PageRuler Prestained Protein Ladder Paraffin Phenylephrin Pikrosiriusrot Ponceau S Roti-Block Roti-Histol Rotiphorese 30 SDS Tamoxifen Tween 20

Serva, Heidelberg Applichem, Darmstadt Serva, Heidelberg Cayman Chemical, MI (USA) Sigma-Aldrich, Taufkirchen Carl Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen AppliChem, Darmstadt Alexis, Lausen (CH) Merck, Darmstadt Apotheke des Uniklinikums, Würzburg LKT Laboratories, St. Paul (USA) ChemSolute, Renningen Alexis, Lausen (CH) Sigma-Aldrich, Taufkirchen Carl Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen Morphisto, Frankfurt a.M. Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Applichem, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen Carl Roth, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien zur Herstellung der verschiedenen Puffer wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bestellt.

3.1.2 Antikörper für Western Blot

1°Antikörper	Verdünnung	Hersteller
ß-Tubulin	1:1000	Cell Signaling, Danvers (USA)
GAPDH (USA)	1:1000	Cell Signaling, Danvers
mß₁ (NO-GC) PDE3A	1:1000 1:1000	eigene Herstellung Zur Verfügung gestellt von Brof. Dr. Vischeslav Nikolaov
Hamburg		TIOI. DI. VIACILESIAV IVIKUIAEV,
PDE3B Heidelberg	1:200	Santa Cruz Biotechnology,
2°Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-Ziege lgG	1:100000	Jackson Laboratories, Newmarket

3.1.3 Antikörper für Immunhistochemie

(UK)

1° Antikörper	Verdünnung	Hersteller
α-SMA, clone 1A4 mβ ₁ (NO-GC) PDE3A	1:500 1:800 1:200	Sigma-Aldrich, München eigene Herstellung Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev,
Hamburg PDE3B Heidelberg	1:250	Santa Cruz Biotechnology,
2°Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa 555 (anti-Hase) Alexa 594 (anti-Schaf)	1:800 1:800	Invitrogen, Carlsbad (USA) Invitrogen, Carlsbad (USA)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurde von allen nachfolgenden Reagenzien 1 I hergestellt.

Homogenisierungspuffer

<u>TEA-Puffer</u>		
NaCl	50	mМ
TEA/HCI	50	mМ
EDTA	1	mМ
DTT	2	mМ

Proteaseinhibitoren		
Benzamidin	1	mМ
PMSF	1	mМ
Pepstatin A	1	μM
Leupeptin	50	μΜ

Krebs-Henseleit-Lösung

<u>Stammlösung A</u>		
NaCl	118,0	mМ
KCI	4,7	mМ
CaCl ₂	2,5	mМ
MgSO ₄	1,2	mМ
KH ₂ PO ₄	1,2	mМ
<u>Stammlösung B</u>		

NaHCO₃ 25,0 mM

→ Für 1000 ml Puffer wurden 920 ml voll-entmineralisiertes Wasser, 40 ml Stammlösung A und 40 ml Stammlösung B mit 1,5 g Glukose gemischt. Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde jeden Tag frisch angesetzt, im Wasserbad auf 37° C erwärmt und konstant mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast, um den pH von 7,4 aufrechtzuerhalten.

Puffer für die PCR

Alkalischer Lysepuffer		
NaOH	1	М
EDTA	50	μΜ
рН 8,0		
Neutralisationspuffer		
Tris/HCl	0,1	М

Puffer für Gelelektrophorese und Western Blot

Sammelgelpuffer		
SDS	0,4	% (w/v)
Tris/OH	0,5	mМ
рН 6,8		
<u>Trenngelpuffer</u>		
SDS	0,4	% (w/v)
Tris/OH	1,5	mМ
рН 8,8		
Gel-Laufpuffer		
Glycin	192	mМ
Tris/OH	25	mМ
SDS	0,1	% (w/v)

Probenpuffer nach Laemmli		
Tris/OH	62,5	mМ
Glycerin	10	% (v/v)
B-Mercaptoethanol	5	% (w/v)
SDS	1	% (w/v)
Bromphenolblau	0,005	% (w/v)
Transferpuffer		
Glycin	192	mМ
Tris/OH	25	mМ
SDS	0,2	% (w/v)
Methanol	20	% (v/v)
Waschpuffer (TBST-T)		
NaCl	150	mМ
Tris/OH	10	mМ
Tween 20	0,1	% (w/v)
Ponceau-S Reagenz		
Trichloressigsäure	10	% (w/v)
Tris/OH	0,2	% (w/v)
SDS-Polyacrylamid-Gel		
<u>Sammelgel</u> (4%)		
VE-Wasser	1,05	ml
Sammelgelpuffer	1,5	ml
Rotiphorese	0,4	ml

<u>Trenngel</u> (7,5%)		
VE-Wasser	4,38	ml
Trenngelpuffer	2,25	ml
Rotiphorese	2,25	ml
TEMED	9	μl
APS	90	μl

TEMED

APS

Reagenzien für Hydroxyprolin-Assay

<u> Acetrat-Citrat-Puffer</u>		
Citronensäure	50	g
Natriumacetat	72	g
NaOH	34	g
Essigsäure (96%ig)	12	ml
pH 6,0		

→ Für den Gebrauch wurden zu 500 ml Puffer 100 ml Wasser und 150 ml 1-Propanol gegeben.

1,8 μl

36 µl

<u> Chloramin-T Reagenz</u>		
Chloramin-T	1,41	g
Wasser	10	ml
1-Propanol	10	ml
Acetat-Citrat-Puffer (fertig)	80	ml

Ehrlich's Reagenz

DMAB	1,5	g
1-Propanol	6	ml
Perchlorsäure (60%ig)	2,6	ml

 \rightarrow Mit 1-Propanol wurde auf 10 ml aufgefüllt.

3.1.5 Geräte

Gerät Flüssigszintilationszähler Bionokular CCD-Kamera CCD-Kamera Druckballon Kryotom Lichtquelle Mini-Gelkammern Mikroskop Schlittenmikrotom Spektrometer Multilabel Counter Nitrozellulosemembran Organbad Photometer PowerLab PowerLab Vakuumzentrifuge UV-Transilluminator Vaporisator	Produktbezeichnung 1600 TR SZ51 FluorChemSP GelLogic100 Respiration Sensor CM 3050 KL1500 Mini-PROTEAN Tetra Cells BZ 9000 BioRevo Hn40 Avance 750 Viktor ² Wallac 1420 Whatman Protran BA 85 Multi Myograph Model 610M Nano Drop, SimpliNano PowerLab 8/30 PowerLab 16/30 Speed Vac Concentrator Fluo-Link Vapor 2000 Ugo Basile 7025	Firma Packard Olympus AlphaInnotech Kodak Graseby Medical Ltd. Leica Schott Bio-Rad Keyence Reichert Jung Bruker Biospin Perkin Elmer GE Health Care Danish Myo Technology GE Health Care Danish Myo Technology GE Health Care AD Instruments AD Instruments Bachhofer Biometra Dräger Hugo Sachs Elektronik
Ventilator Verstärker	Ugo Basile 7025 MPVS Ultra	Hugo Sachs Elektronik Millar

Software

Amira 5.0 GraphPad Prism Software ImageJ LabChart 7.3.8 LabChart 8 MATLAB Microsoft Excel 2013

Firma

FEI Company GraphPad Software Inc. Wayne Rasband (www.imagej.nih.gov/ij/) AD Instruments AD Instruments The Mathworks Inc. Microsoft Windows

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere und Präparation

3.2.1.1 Haltung und Zucht

Die in den Versuchen verwendeten Mauslinien (GCKO: globaler NO-GC-Knockout und SMC-GCKO: Glattmuskel-zell-spezifischer NO-GC-Knockout) wurden von Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden entsprechend den Anforderungen in Makrolon-Typ-II-Käfigen mit Holzspänen als Einstreu gehalten. GCKO-Mäuse erhielten aufgrund ihrer eingeschränkten Darmmotilität eine ballaststoffarme Diät (Altromin 1013), die mit Omeprazol und Natriumbikarbonat angereichert war. Alle übrigen Tiere erhielten eine Nager-Standarddiät (Altromin 1320) und Wasser ad libitum. Zur Zucht der verschiedenen NO-GC-defizienten Maus-linien wurden je zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) und ein heterozygotes Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) verpaart. 18 bis 21 Tage nach der Geburt wurden die Nachkommen genotypisiert und nach Geschlechtern getrennt von der Mutter abgesetzt. Alle Versuche wurden mit adulten Mäusen (8 bis 24 Wochen) durchgeführt. Da das SMMHC-Cre-Transgen auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, tragen ausschließlich die männlichen Nachkommen dieses Gen. Somit wurden Versuche mit SMC-GCKO-Tieren lediglich mit männlichen Mäusen durchgeführt. In jedem Experiment wurden, Geschwistertiere als Kontrollen verwendet. Bei gleichem Alter konnte kein Unterschied zwischen WT- und heterozygoten Tieren festgestellt werden, weshalb die Ergebnisse dieser Tiere in einigen Experimenten unter dem Namen "Kontroll-Tiere" (ctrl) zusammengefasst wurden.

3.2.1.2 Tamoxifen-Injektionen

Zur Induktion des genetischen Knock-outs in SMC-GCKO Mäusen, wurde diesen im Alter von 6 bis 8 Wochen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen (1 mg i.p. gelöst in Miglyol 812) injiziert. Frühestens 50 Tage nach der Injektion wurden die Tiere in die Versuche eingesetzt. Erst ab diesem Zeitpunkt lässt sich die NO-GC sowohl auf Proteinebene als auch funktionell nicht mehr nachweisen (Groneberg *et al.*, 2010).

3.2.1.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte 21 Tage nach der Geburt durch Analyse von Ohrgewebe. Die Ohrstanzen wurden für 17 min bei 95 °C in 50 µl Lysepuffer gekocht und anschließend zur Neutralisation mit 50 µl Neutralisationspuffer versetzt. Aus den so erhaltenen Proben wurden definierte DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988a; Saiki *et al.*, 1988b) zunächst
amplifiziert. Anschließend wurden die so entstandenen DNA-Fragmente anhand ihrer unterschiedlich negativen Ladung und Größe mittels Agarosegel (2%) aufgetrennt. Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurde dem Gel der Farbstoff GelRed (1:50.000) hinzugefügt. Die Ethidium-Untereinheiten dieses Farbstoffs interkalieren zwischen die Basen der DNA, wodurch die DNA-Banden im Gel bei Anregung mit UV-Licht fluoreszieren. Alle Agarosegele wurden auf einem UV-Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt und ein Bild mit einer CCD-Kamera erstellt.

3.2.1.4 Organentnahme

Mäuse wurden mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und Tibialänge und Körpergewicht protokolliert. Anschließend wurde die Bauch- und Brusthöhle geöffnet und der thorakale Teil der Aorta, *die Arteria carotis* oder die Nieren entnommen und in mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaster Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung) gegeben. Die Gefäße wurden gespült, um sie von Blutresten zu befreien und von allen Organen das Fettgewebe abgeschnitten. Bei Bedarf wurde noch das Gesamt-Herzgewicht bestimmt, wobei der linke Ventrikel abpräpariert und separat gewogen wurde.

3.2.2 Western Blot

3.2.2.1 Herstellung der Western Blot-Proben

Die Aorta wurde wie unter 3.2.1.4 beschrieben präpariert und mit 100 µl Homogenisierungspuffer in einem Glas/Teflon Homogenisator mit Hilfe eines Mikrohandrührgeräts auf Eis homogenisiert. Die Nieren wurden mit der 5-fachen Menge Homogenisierungspuffer im Glas/Glas-Homogenisator mit Hilfe eines drehzahlvariablen Rührwerkes (30 Hübe, 500 U/min) homogenisiert. Um nicht-lösliche Zellbestandteile abzutrennen, wurden die Nieren-Homogenate 10 Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Homogenate wurden mit Probenpuffer nach Laemmli (1970) versetzt, 3 Minuten bei 95 °C gekocht, anschließend auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Homogenate erfolgte nach der Methode von (Bradford, 1976). Hierbei wurde in einer Mikrotiterplatte 20 µl Probe bzw. Standard (0-0,1 mg/ml Rinderserumalbumin) mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und die Absorption bei 590 nm mittels Photometer gemessen. Anhand der BSA-Eichgerade wurde die Proteinkonzentration der Proben

bestimmt. Um zu gewährleisten, dass die gemessene Absorption im linearen Bereich der erstellten Eichgeraden liegt, wurden die Proben gegebenenfalls vorverdünnt. Aufgrund des geringen Volumens der Aorten-Homogenate, wurde deren Proteinkonzentration mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

3.2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der in den Homogenaten enthaltenen Proteine, wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die aufzutrennenden Proben wurden zunächst mit Probenpuffer versetzt. Der hierbei verwendete Laemmli-Probenpuffer enthält zur Denaturierung der Proteine Natriumdodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol. Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol werden zunächst die stabileren Disulfidbrücken der Proteine gespalten. Das anionische Detergenz SDS denaturiert die Proteine, bindet an deren hydrophobe Aminosäurereste und überlagert dabei deren Eigenladung, sodass alle Proteine eine negative Ladung aufweisen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Protein-Größenstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in Elektrophorese-Modulen in Mini-Gelkammern mit 1,5 mm dicken, 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen für ca. 1 Stunde bei einer Stromstärke von 45 mA.

3.2.2.4 Blotting

Zum Nachweis bestimmter Proteine folgte der Gelelektrophorese ein Western Blot nach der Methode von Towbin et al. (1979). Dabei wurden die aufgetrennten Proteine durch elektrischen Transfer aus dem Gel eluiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das "Blotting" erfolgte in mit Transferpuffer gefüllten Elektrophorese-Transfer-Modulen in Mini-Gelkammern unter Kühlung für 1 Stunde bei 320 mA. Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen und damit den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran 5 min bei RT mit Ponceau-S gefärbt. Damit freie Proteinbindestellen abgesättigt und somit unspezifische Antikörperbindungen vermieden werden, wurde die Membran 30 min bei RT mit RotiBlock geblockt. Zum Nachweis der zu untersuchenden Proteine, wurde die Membran anhand der farbigen Markerbanden an den entsprechenden Stellen getrennt und in den jeweiligen spezifischen primären Antikörper-Lösungen (Antikörper in 3% Ovalbumin (w/v) in TBST) bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mehrfach mit TBST gewaschen und danach für 1 Stunde in einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten, Immunglobulinspezifischen Sekundär-Antikörper (in 3% Ovalbumin (w/v) in TBST) bei RT inkubiert. Zur Detektion der Antikörper wurde als Substrat das "SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrat" von Thermo Scientific verwendet. Die dabei entstandene Chemilumineszenz wurde mit einer 16-bits CCD-Kamera in einer lichtisolierten Kammer detektiert.

3.2.3 Messung von Durchmesser und Wanddicke

Zunächst wurden die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran getötet, die Aorta entnommen und in Carbogen-begaste KH-Lösung überführt. Die Aorta wurde von Fett und Bindegewebe befreit, durchgespült und mit einer Schneidevorrichtung in sechs 2 mm lange Ringe geschnitten. Vier Ringe wurden für die nachfolgenden Organbadversuche verwendet. Je zwei Ringe wurden halbiert, sodass vier schmale Stücke entstanden. Diese wurden in einen Tropfen KH-Lösung auf einem Objektträger mit Lineal gegeben. Unter dem Binokular wurden diese Aorten-Ringe so ausgerichtet, dass die Ringstruktur gut sichtbar war. Mit Hilfe der Software ImageJ wurde im Anschluss die Wanddicke und der Umfang der Ringe gemessen und daraus der Durchmesser berechnet.

3.2.4 Aktivitätsmessungen

3.2.4.1 Phosphodiesterase-Assay

Der Phosphodiesterase-Assay (PDE-Assay) ist eine Methode zur Bestimmung der katalytischen Aktivität verschiedener Phosphodiesterasen. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die Phosphodiesterasen in ³²P-cAMP die Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe und der Ribose spalten. Das so entstandene ³²P-AMP wird anschließend durch die Alkalische Phosphatase in Adenosin und ³²P-Phosphat gespalten. Die Impulse pro Minute (cpm) der freien radioaktiven Phosphatreste können dann in einem β-Counter gemessen und daraus die PDE-Aktivität berechnet werden. Um die Hydrolyseaktivität der PDE3 in Aorta-Homogenaten zu untersuchen, wurde zuvor radioaktiv-markiertes cAMP als Substrat hergestellt (Mullershausen *et al.*, 2003)

Herstellung des radioaktiv-markierten Substrats

Zur Herstellung von radioaktiv markiertem ³²P-cAMP wurde das am α -C-Atom markierte Triphosphat α -³²P-ATP mit gereinigter NO-GC umgesetzt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl 18,5 MBq des α -³²P-ATP in 50 mM TEA-Puffer mit 0,5 mg/ml BSA, 3 mM DTT, 3 mM MnCl₂, 1 mM GSNO und 2,5 µg gereinigter NO-GC in einem Reaktionsgefäß im Wasserbad bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Durch die Zugabe von je 450 µl Zink-Acetat (120 mM) und Na₂CO₃ (120 mM) wurde die Reaktion gestoppt. Das dabei entstandene Zinkcarbonat präzipitierte mit den freien 5'-Phosphaten der nicht umgesetzten Nukelosidtriphosphate. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Überstand auf eine mit 0,1 M Perchlorsäure äquilibrierte Aluminiumoxidsäule gegeben. Das zyklische ATP bindet an das Säulenmaterial, während nicht-zyklisierte Nukleotide und Pyrophosphate mit VE-Wasser (10 ml) von der Säule gespült werden. Zur Elution des Substrats wurde die Säule mehrfach mit 300 μ l einer 250 mM Natrium-Acetat-Lösung gespült. Mit einem β -Counter wurde die Substratkonzentration der einzelnen Fraktionen bestimmt.

Messung der PDE3-Aktivität

Zur Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität der PDE3 wurde radioaktiv markiertes ³²PcAMP als Substrat benutzt. Der Reaktionsansatz bestand aus einem Gesamtvolumen von 100 µl eines Puffers aus 50 mM TEA/HCI, 0.5 mg/ml BSA, 3 mM DTT, 1 U alkalischer Phosphatase, 3 mM MgCl₂, 1 µl Aorta-Homogenat, 1 µM nicht-radioaktives cAMP und einer bestimmten Menge des radioaktiv markierten Tracers ³²P-cAMP. Der Einsatz von nicht-radioaktivem Substrat diente dazu eine ausreichende Substratkonzentration in der Nähe des K_m-Wertes zu gewährleisten. BSA diente während der Reaktion als Schutzprotein, DTT als Oxidationsschutz und Magnesium zur Aufrechterhaltung der Phosphatase-Aktivität. Die Menge an radioaktiv markiertem Substrat wurde so gewählt, dass die Zählrate etwa 100.000 cpm betrug. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die umgesetzte Substratmenge mindestens den doppelten Wert des Leerwertes und nicht mehr als 20% der Gesamtsubstratmenge betrug. Nach Zugabe des spezifischen PDE3-Inhibitors Milrinon wurde die Reaktion durch Inkubation im 37 °C warmen Wasserbad gestartet. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 900 µl gekühlter Aktivkohlesuspension (30% Aktivkohlepulver in 50 mM KH₂PO₄, pH 2,3) gestoppt und die Proben 4 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Dabei werden die an die Aktivkohle gebundenen nicht-umgesetzten Nukleotide und Nukleoside sedimentiert, so dass im Überstand die abgespaltenen freien radioaktiven Phosphatreste vorliegen. 600 µl dieses Überstandes wurden in Szintillationsgefäße überführt und die Impulse pro Minute im Flüssigszintillationszähler gemessen. Die PDE-Aktivität wurde anschließend mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$v(PDE) = \frac{C - C_0}{C_t} * \frac{c_s * V_I}{\frac{V_g}{V_t} * t * V_H * c_P}$$

v(PDE)	spezifische Aktivität der PDE (nmol/min/mg)
C	Zählrate der Probe (cpm)
C ₀	Zählrate des Leerwertes (cpm)
Ст	Zählrate des eingesetzten Tracers ³² P-cAMP (cpm)
t	Inkubationsdauer (min)
V _H	eingesetzte Aorta-Homogenat-Menge (µI)
VI	Inkubationsvolumen (µI)
V	aomononon Brohonyolumon (ul)

V_g gemessenes Probenvolumen (μl)

Cs	eingesetzte Substratkonzentration (µM)
Vt	gesamtes Probenvolumen (µl)
cP	gemessene Proteinkonzentration (mg)

3.2.4.2 Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay (RIA) ist eine immunologische Nachweisreaktion zur Bestimmung von geringen Substanzmengen, in diesem Falle cAMP. Dabei wird das radioaktiv-markierte cAMP-Analogon ¹²⁵I-Sc-cAMP-TME (Tracer) durch einen spezifischen Antikörper präzipitiert und so der cAMP-Gehalt in einer Aortenprobe bestimmt. Durch die Inkubation von radioaktiv markiertem Tracer mit einem spezifischen Antikörper stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des Tracers ein. Dieses Gleichgewicht kann durch das in der Probe enthaltene cAMP in Richtung des freien Tracers verschoben werden, wodurch der präzipitierbare gebundene Anteil sinkt. Nach Proteinfällung und Absaugung des Überstands wird die Radioaktivität des Präzipitats bestimmt. Durch Verwendung einer Standardkurve mit bekannten cAMP-Mengen kann die cAMP-Konzentration in einer unbekannten Probe ermittelt werden. Die gewählten Bedingungen zur Durchführung des RIAs, die Behandlung der Proben und die Antikörperinkubation erfolgten, wie in (Jager *et al.*, 2013) beschrieben.

Synthese des ¹²⁵I-cAMP-Tracers

Als Tracer wurde im RIA das radioaktive cAMP-Analogon ¹²⁵I-Sc-cAMP-TME verwendet. Zur Herstellung dieses Tracers wurde das zyklische Nukleotidanalogon TME-ScAMP (2'-SuccinylcAMP-Tyrosylmethylester) mit ¹²⁵I markiert. Dabei wird der Tyrosylmethylester am aromatischen Ring des Tyrosylrests durch eine elektrophile Substitution mit ¹²⁵Iod markiert. Diese Synthese erfolgte nach der Chloramin T (N-Chlor-Toluol-Sulfonamid Natrium)-Methode von (Hunter & Greenwood, 1964) und (Steiner *et al.*, 1972) durchgeführt.

Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 µl enthielt 35,5 µl Phosphatpuffer (500 mM, pH 7,4), 5 µl Sc-cAMP-TME (800 pmol, gelöst in 50 mM Phosphatpuffer) und 9,5 µl Na¹²⁵I (37 MBq bzw. 400 pmol). Zum Start der Reaktion wurden 50 µl Chloramin-T (90 nmol, gelöst in 50 mM Phosphatpuffer) zugegeben. Chloramin-T oxidiert das radioaktive lodid zu elementarem lod, welches an mehreren Positionen des aromatischen Tyrosylrestes des Sc-cAMP-TME bindet. Um eine maximale Ausbeute an dem bevorzugten orthosubstituierten ¹²⁵I-TME-Sc-cAMP zu erreichen, musste die Reaktion nach 50 s gestoppt werden. Dafür wurden 100 µl 2,6 µM Na-Bisulfat zugegeben, welches das elementare lod zu lodid reduziert. Zur Reinigung des jodierten Produkts (Tracer) wurde eine Anionenaustauscher-Säule (QAE Sephadex A-25, GE Healthcare, ca. 10 ml Säulenvolumen) verwendet. Zuvor wurde das

Reaktionsgemisch mit 100 μ l H₂O verdünnt, um die Ionenstärke zu senken und anschließend auf die mit Ammoniumformiatpuffer (50 mM, pH 6) equilibrierte QAE-Säule gegeben. Die Elution erfolgte direkt im Anschluss mit 250 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 6) in 25 einzelnen 5 ml Fraktionen, von denen je 5 μ l im β -Counter gemessen wurden. Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, um die Autoradiolyse zu verlangsamen. Diese Gemische wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Herstellung der Aortenproben

Die Aorten wurden wie oben beschrieben (3.2.1.4) präpariert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde anschließend im Glas/Teflon Homogenisator mit 500 μ l eisgekühltem 70% igem Ethanol auf Eis homogenisiert. Nach Zentrifugation (15 min, 20.000 x g, 4 °C) wurde der cAMP-enthaltende Überstand entnommen und bei 100 °C getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 100 μ l RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, pH 6) gelöst. Das Proteinpellet wurde mit 0,1 M NaOH und 0,1 M SDS bei 60 °C über Nacht unter Schütteln gelöst und die Proteinkonzentration (wie unter 3.2.2.2 beschrieben) bestimmt.

Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von cAMP

Die zu analysierenden getrockneten Proben in RIA-Puffer wurden mit 3 µl eines Gemisches aus Triethylamin und Acetanhydrid (2:1) versetzt. Dadurch wurde das in den Proben enthaltene cAMP acetyliert und somit die Sensitivität des Assays um den Faktor 40 gesteigert (Harper & Brooker, 1975). Wobei die Nachweisgrenze dieses Assays bei 2 fmol zyklischem Nukleotid liegt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 200 µl. Dafür wurden 50 µl RIA-Puffer in Polypropylen-Röhrchen vorgelegt und mit 10 µl der gegebenenfalls verdünnten Probe, 100 µl Antiserum (final 1:100.000) und 40 µl Tracer (verdünnt und auf 40 µl mit RIA-Puffer aufgefüllt) versetzt. Um die Adsorption des Antikörpers an die Wände des PP-Röhrchens weitgehend zu verhindern, wurde dieser in γ -Globulin (0,5 mg/ml) verdünnt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen freiem und von Antikörper-gebundenem Nukleotid einstellen konnte. Zur Trennung von freiem und gebundenem cGMP wurde das im Reaktionsansatz befindliche Protein durch Zugabe von 3 ml Polyethylenglycol-Puffer (16% PEG 6000 in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) gefällt. Zuvor wurden die Ansätze mit 50 µl einer 0,8% igen γ -Globulinlösung versetzt, um eine möglichst vollständige Fällung des Proteins zu gewährleisten. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 6000 x g, 4 °C) und der Überstand abgesaugt. Die im Sediment an den Antikörper gebundene Aktivität wurde mittels β-Counter bestimmt. Die pro Probe eingesetzte Aktivität des Tracers betrug etwa 10.000 cpm, wobei die

Antikörpermenge und die Verdünnung der Probe so gewählt wurden, dass etwa 30-40% der Aktivität gebunden wurden. Das gleiche Verfahren wurde mit den Ansätzen der Standardkurve (2 - 512 fmol) durchgeführt. Die Aktivität wurde entweder unter basalen Bedingungen oder mit Forskolin-stimuliert gemessen. Mit den Aktivitätswerten der Standardkurve wurde die in den Proben enthaltene Menge an cAMP errechnet.

3.2.5 Organbad

Für die Untersuchungen der Gefäße im Organbad wurden zwei 4-Kanal-Multi-Myographen verwendet, deren Kammern jeweils 5 ml KH-Lösung enthielten, die konstant mit Carbogen begast und auf 37 °C erwärmt wurden. In den Organbadkammern befinden sich jeweils zwei Haken, von denen der Eine beweglich ist und mittels Stellschraube um eine bestimmte Länge verschoben werden kann, während der Andere fest mit einem Kraftmesser gekoppelt ist. So können die durch das Gewebe hervorgerufenen Kräfte gemessen werden.

3.2.5.1 Test zur Relaxation der Gefäße

Nach Fixierung der Gefäßringe in den Organbadkammern wurden diese bei einer Vorspannung von 5 mN (Aorta) bzw. 2mN (*A. carotis*) für 15 min äquilibriert. Da durch die für das Gewebe geänderten Bedingungen der Tonus spontan abfiel, musste die Vorspannung nachjustiert werden. Nach ca. 15 min war die Kraft stabil und der Versuch konnte gestartet werden. So konnten sowohl die Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion als auch der Kraftabbau bei der Relaxation der Gefäßringe gemessen und mit der Software LabChart ausgewertet werden.

Vor Versuchsbeginn wurde die KH-Lösung erneuert, um anschließend die Gewebestücke in Anwesenheit der Inhibitoren Diclofenac (Cyclooxygenase-Hemmer; 3 μ M) und L-NAME (NO-Synthase-Hemmer; 200 μ M) mit dem α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin (1 μ M) zu kontrahieren. Erst nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus erfolgte je nach Versuch die Zugabe von Forskolin, Milrinon oder Glyceroltrinitrat (GTN) in steigenden Konzentrationen (0,001 bis 10 μ M; in 10er Schritten). Forskolin ist ein nicht selektiver Stimulator der Adenylyl-Cyclasen, der einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit eine Vasodilatation bewirkt. Milrinon hemmt die PDE3, wodurch cAMP akkumuliert. GTN bewirkt als NO-Donor eine Vasodilatation. Erst nach dem Durchlaufen der Minima der Kontraktionen wurde die nächste Konzentration appliziert. Am Ende der Versuche wurde der unspezifische PDE-Inhibitor IBMX (100 μ M) zur vollständigen Relaxation der Ringe zugegeben. Dieser letzte Wert diente als Referenz zur Berechnung der prozentualen Relaxation.

In einem weiteren Organbad-Versuch wurde zusätzlich der spezifische NO-GC Inhibitor ODQ (10 μ M) verwendet. Um eine vollständige Inhibition der NO-GC zu gewährleisten wurde nach Zugabe von ODQ 20 min gewartet bevor mit dem Erstellen der kumulativen Dosis-Konzentrations-Kurven begonnen wurde.

3.2.5.2 Spannungs-Dehnungs-Test

Ein Versuch zur Messung der Gefäßsteifigkeit und damit Charakterisierung der Materialeigenschaften, ist der Spannungs-Dehnungs-Test. Hierbei werden die isometrischen Kräfte während der Dehnung des Gewebes gemessen. Da die Geometrie der Aorten-Ringe einen direkten Einfluss auf die gemessene Kraft und die einzustellende Auslenkung hat, mussten reduzierte Einheiten verwendet werden. Um Daten für die murine Aorta zu erhalten, die nur von der Struktur des Gefäßes und nicht von dessen geometrischen Abmessungen abhängen, musste bei allen Ringen die gleiche Schnittlänge (2 mm) gewählt werden. Durch Berechnung der Dehnung werden die Messungen vom Durchmesser unabhängig gemacht. Um weiterhin das Materialverhalten zu beschreiben, ist es notwendig, die gemessenen Kräfte durch die wirkende Querschnittsfläche A zu dividieren. Dafür wird vorausgesetzt, dass die Schnittlänge und die Wanddicke bei allen Proben gleich sind, wodurch die gemessenen Kraftwerte direkt miteinander vergleichbar sind und daraus die Spannung berechnet werden kann. Das daraus resultierende Spannungs-Dehnungs-Diagramm beschreibt das Materialverhalten und ist unabhängig von den geometrischen Eigenschaften der einzelnen Aorten-Ringe.

Nachdem die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran getötet wurden, wurde die Aorta entnommen und in Carbogen-begaster KH-Lösung, präpariert und der Aortendurchmesser wie in 3.2.3 bestimmt. Die Ringe wurden dehnungsfrei über die beiden Haken der Organbadkammern gezogen und die Vordehnung auf 0 gestellt. Abhängig vom Aortendurchmesser wurden die Ringe unterschiedlich stark gespannt, um bei allen Gewebsstücken die gleiche Dehnung zu erreichen. Mit folgender Formel wurde zunächst die einzustellende Auslenkung berechnet:

$$L = \frac{\pi * d}{2} * (\varepsilon - 1)$$

L Auslenkung (μm)

- ε Dehnung (einheitenlos)
- d Durchmesser (mm)

Durch drehen der Stellschraube des Organbads wurde die jeweilige Länge eingestellt. Erreichte die Kurve ein Plateau, wurde erneut gedehnt. Maximal wurde eine Dehnung von 16% eingestellt, jedoch rissen einige Aorten-Ringe bereits bei niedriger Dehnung. So konnte die Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion der Aorten-Ringe gemessen und mit einem PowerLab System und der Chart Software für Windows digitalisiert werden. Aus den gemessenen Kräften wurde mit folgender Formel die Spannung berechnet:

$$U = \frac{F}{t * l}$$

U	Spannung (mN/mm ²)
F	Kraft (mN)
t	Wanddicke (mm)
I	Länge des Aortenstücks (mm)

Da lediglich der Vergleich zwischen den beiden KO-Mauslinien und den Kontroll-Tieren von Interesse war, wurde auf den Spannungswert bei 16% Dehnung der Kontroll-Tiere normiert. Dieser Wert war der maximal erreichbare Wert, denn bei höheren Dehnungen rissen die Aorten-Ringe. Aus den so erhaltenen Werten wurde ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm erstellt

3.2.6 Messung der Pulswellengeschwindigkeit mittels MRT

Die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) beschreibt die Ausbreitungsgeschwindigkeit, mit der die Druckwelle die Arterien durchläuft. Sie ist nicht nur abhängig vom Blutdruck, sondern auch von der Elastizität und dem Durchmesser der Gefäße, weshalb sie ein wichtiges Maß für die lokale Gefäßsteifigkeit darstellt. Bei vielen Krankheiten, wie z.B. Arteriosklerose, kommt es zur Zunahme der PWV. Sie ist somit auch klinisch von großer Relevanz und ein Indikator für kardiovaskuläre Risiken.

Die Magnetresonanztomographie ist ein computergestütztes bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Struktur und Funktion von Gewebe und Organen. Es beruht physikalisch auf dem Prinzip der Kernspinresonanz, also dem Drehimpuls bestimmter Protonen. Im Körper der Säugetiere sind dies hauptsächlich Wasserstoffatome (H⁺). Die unterschiedliche Menge an H⁺-Atomen und ihre Relaxationszeit in verschiedenen Geweben nach einem Hochfrequenz-Impuls sind ausschlaggebend für den Bildkontrast und geben damit Hinweise auf die Morphologie. Die Pulswellengeschwindigkeit wurde mit der QA-Methode bestimmt, d.h. sie wurde lokal aus der Änderung des Volumenflusses und der Querschnittsfläche des Gefäßes während der frühen Systole errechnet (Vulliemoz *et al.*, 2002; Herold *et al.*, 2009). Der gesamte Versuch, von Präparation über Messung bis hin zur Auswertung, erfolgte unter Anleitung von Dr. Volker Herold aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 der Universität Würzburg.

3.2.6.1 Tierpräparation und Messung

Die Messungen wurden an einem Spektrometer in einem vertikalen MR-System mit einer Feldstärke von 17,6 T und einer Kerngröße von 89 mm durchgeführt. Der Versuchsaufbau des gesamten Systems ist in Abbildung 4A dargestellt. Während den Messungen wurden die Tiere kontinuierlich mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (1,5-2%) narkotisiert. Die Körpertemperatur konnte mithilfe des Gradientenkühlsystems konstant auf 38 °C gehalten werden. Die Mäuse wurden in eine Spule mit einem Innendurchmesser von 25 mm gezogen, weshalb für die PWV-Messungen ausschließlich Tiere mit einem Gewicht kleiner als 30 g verwendet werden konnten.

Um die Datenerfassung des Scanners mit der Eigenbewegung des Herzens und der Atmung zu synchronisieren und somit Bewegungsartefakte und Reflexionen zu minimieren, mussten Atem- und Herzsignal mittels Druckballon aufgezeichnet werden. Der Ballon wurde auf der Haut oberhalb des Mausherzens positioniert. Durch ein Stück Schaumstoff zwischen Spule und Ballon konnte neben dem Atem- auch das Herzsignal dargestellt werden. Diese beiden Drucksignale wurden mittels Signalwandler in elektrische Signale umgewandelt und diese auf einer EKG-Einheit dargestellt. Neben der kardialen Triggerung, wurde auch ein Atemgating durchgeführt, d.h. die Messung wurde während der Atembewegung unterbrochen und erst nach Ende des Atemzuges fortgesetzt. Außerdem wurde das Trigger-Delay so eingestellt, dass die Messung in der frühen Systole stattfand. Da Elastizität und Durchmesser der Aorta von zentral nach peripher abnehmen, war es wichtig die PWV immer an der gleichen Stelle zu bestimmen. Als Orientierungspunkt diente hierbei das Diaphragma. Somit wurden die lokalen PWVs oberhalb des Zwerchfells im thorakalen Teil der Aorta bestimmt. Um den vollen Durchmesser der thorakalen Aorta und damit die zur Errechnung der PWV notwendigen Parameter zu messen, wurden mit Longitudinal- und Transversalwellen verschiedene Längs- und Querschnitte durch die Aorta gelegt. In 4B ist ein Frontal-Sagittal-Schnitt durch die Maus-Aorta dargestellt. Man sieht die gesamte Aorta mit aufsteigendem Teil, Aortenbogen und dem absteigenden Teil bis kurz vor dem Zwerchfell. Oberhalb dieser Stelle wurde die Schnittebene für den Transversal-Schnitt gewählt, um so einen Querschnitt des Gefäßes zu erhalten (Schnittebene siehe Abb. 4B). Anhand dieser



Abb. 4: Magnetresonanztomographie der Maus-Aorta

A) Schematischer Aufbau des mechanischen Triggersystems. Für weitere Erklärungen siehe Text.

B) Frontal-Sagittal-Schnitt durch den Bauchraum einer Maus. Um die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) in der absteigenden Aorta zu bestimmen, wurde die transversale Schnittebene auf Höhe des Zwerchfells gewählt und aus dem Aortenquerschnitt und dem Volumenfluss die PWV errechnet.

Aortenquerschnitte und den darin enthaltenen frühsystolischen Fluss- und Flächenpulsdaten, konnte die lokale PWV berechnet werden. Bei allen Messungen wurden folgende Parameter eingestellt: Matrixgröße 160x160, Echozeit 1,7 ms, Schnittdicke 1 mm, maximale Geschwindigkeit 166,66 cm/s und Gesamtzahl der Aufnahmen 40.

3.2.6.2 Auswertung

Mit einem speziellen Makro im Programm MATLAB in Kombination mit der kommerziellen Software AMIRA wurde die PWV anhand der aufgenommen Aorten-Bilder während der Systole berechnet. Hierzu wurde die Segmentierung des Aortenquerschnitts (A) für jede Aufnahme viermal mit der Software Amira durchgeführt und diese Werte gemittelt. Der Volumenfluss (Q) wurde durch die Integration der Geschwindigkeitswerte jedes Pixels des Gefäßquerschnitts bestimmt. Die PWV wurde anschließend über die lineare Kalibriergerade der Werte von A und Q berechnet.

3.2.7 Biochemische Untersuchungen der Aorta

Blutgefäße wie die Aorta bestehen aus einer Vielzahl an Strukturproteinen (Wagenseil & Mecham, 2009), welche die mechanischen Eigenschaften des Gefäßes bedingen. Kollagen und Elastin sind die in der Aorta am häufigsten vorkommenden Proteine. Kollagen ist verantwortlich für die Zugfestigkeit des Gefäßes, während Elastin die elastischen Eigenschaften der Aorta vor allem während der systolischen Phase des Herzschlags vermittelt.

3.2.7.1 Elastin-Assay

Zur Quantifizierung von Elastin wurde der kommerziell erhältliche "Fastin Elastin Assay" von Biocolor verwendet. Der Assay wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Zunächst wurde der thorakale Teil der Aorta entnommen, von Bindegewebe und Fett freipräpariert und gespült. Das Gewebe wurde in kleine Stücke geschnitten und in 150 µl 0,25 M Oxalsäure bei 100 °C gekocht. Nach 60 min wurden die Proben bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese beiden Schritte wurden mit 100 µl Oxalsäure wiederholt, die Überstände vereinigt und 100 µl als zu analysierende Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus α-Elastin Lösung wurden die Standard-Proben mit bekanntem Elastin-Gehalt in Duplikaten hergestellt, die im Folgenden wie die zu analysierenden Proben behandelt wurden. Zu allen Proben wurde das gleiche Volumen "Elastin Precipitating Reagent" gegeben und gevortext. Nach 10 min wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit einem Wattestäbchen vorsichtig die restliche Flüssigkeit entfernt. Zu dem gelartigen Pellet

wurden 1 ml "Dye Reagent" pipettiert und die Reaktionsgefäße für 90 min auf einem Schüttler invertiert. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der Flüssigkeit, war ein rot-brauner Rückstand sichtbar. Um das ausgefallene Elastin zu lösen, wurden 250 µl "Dye Dissociation Reagent" zugegeben und gut gevortext, bis sich der Rückstand vollständig gelöst hatte. Die Absorption der Proben und Standards (200 µl in Mikrotiterplatte) wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Anhand des gemessenen Standards konnte der Elastin-Gehalt der Aorten-Proben pro mg Trockengewicht errechnet werden.

3.2.7.2 Kollagen-Assay

Die Quantifizierung des Strukturproteins Kollagen erfolgte nach einer erweiterten Methode ursprünglich von Woessner (1961), modifiziert durch Stegemann and Stalder (1967). Es handelt sich hierbei, wie auch beim Elastin-Assay, um eine kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung bestimmter Proteine. In diesem Fall wird die α -Aminosäure Hydroxyprolin nachgewissen, die chemisch gebunden zu etwa 13,5% im Kollagen vorkommt Durch Säurehydrolyse werden die Polypeptide des Kollagens in ihre Aminosäuren zerlegt. Hydroxyprolin wird durch Chloramin T schrittweise zu Pyrrol oxidiert, welches zusammen mit dem im Ehrlich's Reagenz enthaltenen Farbstoff Dimethylaminobenzaldehyd ein rosafarbenes Kondensationsprodukt bildet. Dieses Chromophor hat sein Absorptionsmaximum bei 565 nm und kann photometrisch vermessen werden.

Der thorakale Teil der Aorta wurde entnommen, von Bindegewebe und Fett freipräpariert, gespült und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit Gummidichtung überführt. Das Gewebe wurde zunächst getrocknet, um das Trockengewicht zu bestimmen. Anschließend wurde es in 6 M Salzsäure bei 115 °C für mindestens 18 h gekocht. Der Überstand wurde abgenommen und vollständig in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der abgelagerte Rückstand wurde in 200 µl Wasser resuspendiert und die Proben 1:10 mit Wasser verdünnt. Aus einer Trans-4-Hydroxy-L-Prolin-Stocklösung (1 mg/ml in Wasser) wurde eine Verdünnungsreihe als Standard in Duplikaten hergestellt. Zu 200 µl der Proben bzw. Standards wurden 100 µl Chloramin-T Reagenz pipettiert und in den Reaktionsgefäßen mit offenem Deckel bei RT inkubiert. Nach 20 min wurde in alle Proben 100 µl Ehrlich's Reagenz gegeben und das Gemisch 15 min bei 60 °C inkubiert. Daraufhin wurden erneut 50 µl 6 M HCl zugegeben und die Proben nochmals 15 min bei 60 °C inkubiert. Abschließend wurden 200 µl der Proben/Standards in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption in einem Photometer bei 560 nm gemessen. Anhand des gemessenen Standards konnte der Hydroxyprolin-Gehalt und daraus der Kollagen-Gehalt der Aorten pro mg Trockengewicht errechnet werden.

3.2.8 Immunhistochemie

Die Aorten und *Arteria carotis* wurden wie unter 3.2.1.4 beschrieben präpariert und in ein Reaktionsgefäß mit 3% Paraformaldehyd (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) überführt. Nach 1 h wurde das Gewebe mit 20% Saccharose versetzt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Aorten wurden mit PBS gewaschen und in TissueTek eingebettet. Anschließend wurden mit einem Kryotom 10 µm Gewebsschnitte angefertigt, diese luftgetrocknet und mit Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit der NO-GC zusammen mit einem Fluoresceinisothiocyanat-markierten-Antikörper für anti- α -Glattmuskel-Aktin-Antikörper (α -SMA) versetzt. Der m β_1 -Antikörper wurde zuvor mit einem Alexa 555-konjugierten Antikörper für eine Stunde inkubiert. Die Schnitte wurden in Mowiol eingedeckt und mit einem Mikroskop mit Fluoreszenzfilterset für Alexa 555 und FITC ausgewertet.

3.2.9 Histologie

Der thorakale Teil der Aorta wurde wie oben beschrieben entnommen und von Fett-und Bindegewebe und Blutresten befreit. Die präparierten Aorten wurden 24 h in 3%igem gepuffertem Formalin eingelegt und bis zur Verwendung (maximal 1 Woche) in 1 M KCI gelagert. Nach der Fixierung in Formalin wurde das Gewebe in einem Halbautomaten über Nacht entwässert, um es anschließend in Paraffin einzubetten. Diese Blöcke waren nach einem Tag ausgehärtet und wurden mit einem Schlittenmikrotom in die gewünschte Dicke geschnitten.

Das Entparaffinieren der Schnitte erfolgte in Roth-Histol a, Roth-Histol b, Xylol und Xylol/abs. Alkohol (1:1) für jeweils fünf Minuten. Daraufhin folgte eine absteigende Alkoholreihe mit 96%, 75% und 50% Ethanol über je fünf Minuten. Vor der Färbung wurden die Schnitte 2-3 mal mit Aqua dest. gespült.

Nach der Färbung und vor dem Einbetten wurde das Gewebe entwässert. Dazu wurden die Schritte zum Entparaffinieren in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt, wobei die Objektträger lediglich 1-2 min in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben wurden. Am Ende wurden die Schnitte in DePex mit einem Deckglas eingedeckelt und unter dem Abzug getrocknet. Mit einem Mikroskop wurden die Schnitte bei Durchlicht ausgewertet. Die genauen Färbeprotokolle sind im Anhang aufgeführt.

3.2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine gängige Methode zur morphologischen Untersuchung von Gewebsstrukturen. Dabei werden alle sauren bzw. basophilen Strukturen durch Hämalaun blau und alle basischen bzw. acidophilen Strukturen durch Eosin rosa-rot gefärbt. Somit werden Zellkerne dunkelblau eingefärbt, während die anderen Zellbestandteile hellrosa erscheinen.

Zur HE-Färbung wurden von den in Paraffin-eingebetteten Aorten 5 µm dicke Schnitte angefertigt, diese auf Objektträger gezogen und zunächst wie oben beschrieben entparaffiniert. Dann erfolgte die 10-minütige Färbung mit Hämalaun mit anschließendem Bläuen unter Leitungswasser. Durch den niedrigen pH-Wert der Hämatoxylin-Lösung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun; erst durch das Bläuen und damit durch erhöhen des pH-Wertes schlägt der Farbton ins blau-violett um. Vor dem Färben mit Eosin (5 min) wurden die Schnitte zweimal mit dest. Wasser gespült. Zum Schluss wurden die Präparate entwässert und mit DePex eingedeckelt.

3.2.9.2 Pikrosiriusrot-Färbung

Bei dieser Färbemethode handelt sich um eine Einzelfärbung mittels Pikrosiriusrot (PSR) zum Nachweis von Kollagen. Siriusrot ist ein stark anionischer Farbstoff, der mit den Sulfonsäuregruppen des Kollagens reagiert und dieses dadurch rot einfärbt (Junqueira *et al.*, 1978).

Für diese Färbemethode wurden 7 µm dicke Gewebsschnitte auf Objektträgern gezogen, entparaffiniert und genau 20 min in PSR-Lösung gefärbt. Die gefärbten Präparate wurden entwässert und eingedeckelt.

3.2.10 Statistik

Von allen Daten wurde der Mittelwert mit SEM ("standard error of the mean") als Fehlerbalken ermittelt. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Zuerst wurden die Daten mit dem Kruskal-Wallis Test auf Normalverteilung untersucht und anschließend ein zweiseitiger Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Wurden nur 2 Gruppen miteinander verglichen, wurde lediglich der Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade trägt entscheidend zur Regulation des Tonus der glatten Muskulatur in vielen Organen bei. Der Tonus ergibt sich aus einem komplexen Zusammenspiel von Relaxation und Kontraktion der glatten Muskelzellen. Das Signalmolekül NO vermittelt dabei durch Stimulierung der NO-GC und Synthese des sekundären Botenstoffs cGMP die Relaxation der Zellen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die PDE3 für den cAMP/cGMP-Crosstalk in der glatten Muskulatur der Aorta untersucht werden. In einem weiteren Teil sollte die Rolle der NO-GC bei der Steifigkeit der Gefäße erforscht werden.

4.1 Ausschnitt der NO-GC

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Deletion der NO-GC in der glatten Gefäßmuskulatur überprüft werden. Dafür wurden zwei verschiedene Gefäße gewählt: zum einen die Aorta als größte Arterie und zum anderen die *Arteria carotis*.

4.1.1 Immunhistochemie der glatten Muskulatur

Zunächst wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Dafür wurden glatte Muskelzellen (SMC) von Aorta und A. carotis mit einem spezifischen Antikörper gegen α-Glattmuskel-Aktin (α-SMA; grüne Färbung) gefärbt. Die Expression der NO-GC wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen deren B1-Untereinheit nachgewiesen (B1; rote Färbung). Als Kontrolle wurde ein heterozygotes Tier verwendet, das mindestens 50 Tage zuvor mit Tamoxifen behandelt wurde. Hierdurch sollte untersucht werden, ob Tamoxifen in Mäusen einen unspezifischen Effekt hervorruft. Wie in den Abbildungen 5 und 6 zu sehen, führte die Inkubation mit dem B1-Antikörper zu starken Signalen in der Aorta und A. carotis der Kontroll-Tiere. Es bestätigte sich auch, dass Tamoxifen in Kontroll-Tieren keinen Einfluss auf die NO-GC-Expression hatte. Die Inkubation mit dem a-SMA-Antikörper zeigte starke Signale in den SMC der beiden Gefäße aller drei Genotypen. Jedoch trat ausschließlich in den Kontroll-Gefäßen eine Kolokalisation der NO-GC- und α-SMA-Immunfluoreszenzen auf, was die Expression der NO-GC in SMC bestätigt. Die Gefäße von GCKO- und SMC-GCKO-Mäusen zeigten keine NO-GCspezifischen Immuno-Signale in den α-SMA-positiven Zellen. Zudem konnte in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass auch in den kleinen Gefäßen und Kapillaren im Musculus cremaster von GCKO-Tieren kein NO-GC-Signal nachweisbar ist. Aus diesen immunhistochemischen Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die NO-GC in



Abb. 5: Immunhistochemische Analyse des NO-GC-Ausschnitts in der Aorta Aorten von Kontroll-, GCKO- und SMC-GCKO-Tieren wurden mit PFA fixiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit Hilfe des Kryotoms Schnitte (20 μm) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen NO-GC und α-SMA gefärbt. (ctrl = Kontroll-Tiere)



Abb. 6: NO-GC-Ausschnitt in der Arteria carotis

A. carotis von Kontroll-, GCKO- und SMC-GCKO-Tieren wurden mit PFA fixiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit Hilfe des Kryotoms Schnitte (20 μ m) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen NO-GC und α -SMA gefärbt. (ctrl = Kontroll-Tiere)

der glatten Gefäßmuskulatur der beiden KO-Mauslinien tatsächlich vollständig deletiert ist.

4.1.2 NO-induzierte Relaxation der Gefäße

Als nächstes wurde das Fehlen der NO-GC funktionell in Organbadexperimenten untersucht. Dafür wurden Aorten-Ringe im Organbad auf 5 mN, die A. carotis-Ringe auf 2 mN vorgespannt und durch Zugabe von Phenylephrin, einem α_1 -Adrenorezeptor-Agonisten, eine Kontraktion der glatten Muskulatur induziert. Das geschah in Anwesenheit von L-NAME, zur Blockade der endothelialen NO-Synthase, und Diclofenac, einem Hemmstoff der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2. Durch diese beiden Inhibitoren wird die endogene Produktion von NO und eine durch Prostaglandine vermittelte Relaxation unterbunden. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus wurden steigende Konzentrationen des NO-Donors Glyceroltrinitrat (GTN) hinzugegeben und die hervorgerufenen Relaxationen gemessen. Die Werte der Kontroll-Tiere wurden auf 100% gesetzt (Abb. 7 und 8). In den Kontroll-Aorten zeigte sich wie zu erwarten eine konzentrationsabhängige NO-induzierte Relaxation (siehe Abb. 7A). Im Gegensatz dazu blieb in den KO-Aorten die Relaxation durch den NO-Donor GTN aus. Die statistische Auswertung der Relaxations-Kurven bestätigte den Verlust der NO-induzierten Relaxation in GCKO- und SMC-GCKO-Aorten (siehe Abb. 7B). Die Organbadversuche mit A. carotis lieferten die gleichen Ergebnisse: lediglich die Kontroll-Gefäße relaxierten bei Zugabe von GTN; die A. carotis der KO-Tiere blieben kontrahiert (siehe Abb. 8). Der Verlust der NO-vermittelten Relaxation in den KO-Modellen bestätigt somit die vollständige Deletion der NO-GC und damit das Ausschalten der NO/cGMP-Signalkaskade in der glatten Gefäßmuskulatur.

4.2 cAMP/cGMP-Crosstalk

Durch die Deletion der NO-GC kommt es zu einer Verminderung der NO-stimulierten cGMP-Synthese (Friebe *et al.*, 2007). Der sekundäre Botenstoff cGMP hat viele Effektorproteine; so reguliert er z.B. Phosphodiesterasen (PDEs) in ihrer Akitivität. PDEs katalysieren nicht nur den Abbau von cGMP, sondern auch den des zweiten sekundären Botenstoffs cAMP. Sie stellen somit eine Verknüpfung der beiden Signalwege her. Deshalb sollte im Weiteren der Einfluss der reduzierten cGMP-Synthese auf die cAMP-induzierte Signalkaskade untersucht werden.



Abb. 7: Verlust der NO-induzierten Relaxation in KO-Aorten

A) Original-Spuren der GTN-vermittelten Relaxation von Aorten der GCKO-, SMC-GCKO- und Kontroll-Tiere. Aortenringe wurden mit PE (1 μ M) vorkontrahiert und durch steigende GTN-Konzentrationen relaxiert.

B) Quantitative Analyse der NO-induzierten Relaxation. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von n=5 (*p<0,05; **p<0,01; gilt für beide KOs). (ctrl = Kontroll-Tiere)



Abb. 8: NO-induzierten Relaxation der Arteria carotis

A) Original-Spuren der GTN-vermittelten Relaxation der *A. carotis* von GCKO-, SMC-GCKO- und Kontroll-Tieren. Ringe der *A. carotis* wurden mit PE (1 μ M) vorkontrahiert und durch steigende Konzentrationen von GTN relaxiert.

B) Quantitative Analyse der NO-induzierten Relaxation. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von n=5 (*p<0,05, gilt für beide KOs). (ctrl = Kontroll-Tiere)

В

4.2.1 cAMP-Signalkaskade

4.2.1.1 Messung des cAMP-Spiegels mittels Radioimmunoassay

Zunächst sollte festgestellt werden, ob das Fehlen der NO-GC die cAMP-Produktion und damit den cAMP-Gehalt beeinflusst. Dafür wurde in Aorten-Homogenaten mittels Radioimmunoassay (RIA) die cAMP-Konzentration gemessen. Zunächst wurde die Proteinkonzentration der Aorten-Homogenate bestimmt, um den cAMP-Gehalt anschließend auf das Gesamtprotein zu normieren und so die Konzentrationen vergleichen zu können. Der basale cAMP-Spiegel in den Aorten der GCKO- und SMC-GCKO-Tiere unterschied sich mit 0,22 bzw. 0,32 pmol/mg Protein nicht signifikant von dem der Kontroll-Tiere mit 0,3 pmol/mg Protein (siehe Abb. 9). Nach Stimulation der Adenylyl-Cyclase (AC) mit 1 μ M des nicht-selektiven Stimulators Forskolin stieg der cAMP-Gehalt etwa um das 100-fache auf ca. 30 pmol/mg Protein an. Jedoch ergab sich auch hier kein Unterschied zwischen den Kontroll- und KO-Tieren. Somit scheinen die basale sowie die Forskolin-stimulierte Enzymaktivität der AC und damit die cAMP-Produktion unbeeinflusst von der Deletion der NO-GC zu sein.

4.2.1.2 Effekt von Forskolin auf die Relaxation der Aorta

Um eine eventuelle Änderung der AC-Aktivität im ganzen Gewebe zu untersuchen, wurde als nächstes die AC in der glatten Muskulatur der Aorta in Organbad-Experimenten mit Forskolin als AC-Aktivator untersucht. Dafür wurden Aorten-Ringe in die Organbadkammern eingespannt und unter Anwesenheit von Diclofenac und L NAME mit Phenylephrin (PE) kontrahiert. Anschließend wurde Forskolin in steigenden Konzentrationen hinzugegeben und die hervorgerufene Relaxation gemessen. Wie die Originalspuren in Abbildung 10 zeigen, relaxierten die Aorten aller Genotypen bereits bei einer Forskolin-Konzentration von 0,01 µM. Steigende Aktivator-Konzentrationen führten zu einer stärkeren Relaxation der Aorten-Ringe. Die statistische Auswertung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 11) zeigt keinen Unterschied zwischen den Aorten der beiden KO-Mauslinien und denen der Kontroll-Tiere. Somit wird deutlich, dass die cAMP-vermittelte Relaxation der Aorta nach Stimulation mit Forskolin durch die NO-GC-Deletion nicht beeinflusst wird.

4.2.2 PDE3-vermittelter cAMP/cGMP-Crosstalk

Da es auf Ebene der cAMP-Bildung nicht zu einer Veränderung kam, sollte im Folgenden der Abbau des Botenstoffs untersucht werden. Phosphodiesterasen (PDEs) bauen cAMP und/oder cGMP ab und stellen somit eine Verknüpfung dieser beiden Signalwege her. Von besonderer Bedeutung sind hierbei PDEs mit gemischter Substratspezifität, wie



Abb. 9: Basal und Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion

Der basale oder durch Forskolin-stimulierte cAMP-Gehalt in Aortenhomogenaten der von Kontroll-, GCKO- und SMC-GCKO-Tieren wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n=5. (ctrl = Kontroll-Tiere)



В



Abb. 10: Effekt von Forskolin auf die Relaxation der Aorta

Abgebildet sind repräsentative Original-Spuren einer Forskolin Konzentrations-Wirkungskurve von **A**) GCKO und **B**) SMC-GCKO mit ihren jeweiligen Geschwistertieren. Aortenringe wurden in Anwesenheit von L-NAME und Diclofenac mit PE (1 μ M) kontrahiert und durch die Zugabe steigender Forskolin-Konzentrationen relaxiert.



Abb. 11: Forskolin-induzierte Relaxation der Aorta

Statistische Auswertung der zuvor gezeigten Original-Spuren einer Forskolin-Konzentrations-Wirkungskurve von GCKO-, SMC-GCKO- und Kontroll-Tieren. Aufgrund der Übereinstimmung der WT- und Kontrollwerte wurde lediglich die Kontrollkkurve (ctrl) zum Vergleich herangezogen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von n=6.

beispielsweise die PDE3, die auch als cGMP-inhibierte cAMP-abbauende PDE bezeichnet wird (Bender & Beavo, 2006). Daher wurde der Einfluss der NO-GC-Deletion auf die PDE3 und den PDE3-vermittelten cAMP/cGMP-Crosstalk untersucht.

4.2.2.1 PDE3-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur

Da von der PDE3 zwei Isoformen (PDE3A und PDE3B) existieren, sollte zunächst untersucht werden, welche der beiden Isoenzyme in der Gefäßmuskulatur vorkommt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die PDE3A vornehmlich in glatter Muskulatur lokalisiert ist, während die PDE3B stark in Fett- und Nierengewebe exprimiert wird (Bender & Beavo, 2006). Daher wurden als Positivkontrollen die glatte Muskulatur der Aorta zum Nachweis der PDE3A und Nierengewebe mit dem umgebenen Fett zum Nachweis der PDE3B gewählt. Die Proteine wurden mittels spezifischer Antikörpern gegen PDE3A und PDE3B im Western Blot sichtbar gemacht. In Abbildung 12A ist das Ergebnis dieses Western Blots dargestellt. Der PDE3A-Antikörper zeigt deutliche Proteinbanden in der Aorta bei 100 und 120 kDa und auch im Nierenhomogenat bei 100 kDa. Im Gegensatz dazu ist bei Verwendung des PDE3B-Antikörpers nur im Nierenhomogenat eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 124 kDa zu erkennen. Im Aortenhomogenat hingegen bindet der PDE3B-Antikörper nicht.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden PFA-behandelte Aorten schockgefroren und mit Hilfe des Kryotoms 20 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Die Gewebsschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA; grüne Färbung) gefärbt. Die Expression der PDE3A bzw. B wurde mit den spezifischen Antikörpern nachgewiesen, die bereits im Western Blot verwendet wurden (PDE3A bzw. PDE3B; rote Färbung). Abbildung 12B zeigt die Färbung mit PDE3A- und α-SMA-Antikörpern. Die blauen Punkte stellen die Zellkerne dar, die zuvor mit DAPI angefärbt wurden. Eine Gelbfärbung der Zellen zeigt eine Kolokalisation von PDE3A und α -SMA. Es wird somit deutlich, dass das A-Isoenzym der PDE3 in glatten Muskelzellen vorkommt. Zusätzlich ist die PDE3A in einer Zellschicht exprimiert, die nicht α-SMA-positiv ist. Hierbei handelt es sich um die einschichtige, aus Endothelzellen bestehende Tunica intima (siehe Pfeil in Abb. 12B). Die PDE3A ist in der Aorta somit nicht nur in glatten Muskelzellen, sondern auch Endothelzellen exprimiert. Betrachtet man im Gegensatz dazu die Färbung mit PDE3B (Abb. 12C) in Kombination mit α-SMA, lässt sich keine Kolokalisation der beiden Proteine erkennen. Stattdessen ist bei Einsatz des PDE3B-Antikörpers ein Signal in den die Aorta umgebenden Fettzellen zu sehen. Diese immunhistochemischen Analysen bestätigen daher die im Western Blot erhobenen Ergebnisse. Insgesamt zeigt sich, dass



В



С



Abb. 12: Expression der PDE3

A) Für die Western Blot-Analyse wurden Aorta- und Nierenhomogenate von einem WT-Tier auf ein 7,5%-iges Gel aufgetragen. Mit spezifischen Antikörpern wurde die Expression von PDE3A und PDE3B untersucht.

B), **C**) Aorten wurden entnommen, in PFA fixiert und Kryoschnitte (20 μ m) angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte mit spezifischen Antikörpern gegen α -SMA und PDE3A (**B**) bzw. PDE3B (**C**) angefärbt. Die blauen Punkte stellen die mit DAPI angefärbten Zellkerne dar. Der weiße Pfeil in **B**) zeigt die PDE3A-Expression in einer nicht α -SMA positiven Zellschicht.

lediglich die PDE3A und nicht die PDE3B in den glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde im Weiteren nur noch die PDE3A untersucht.

4.2.2.2 Rolle der PDE3A bei der Relaxation der Aorta

Nach dem Nachweis der PDE3A-Expression in der Aorta sollte die Wirkung des Enzyms bei der Relaxation der SMC in der Aorta untersucht werden. Zur Untersuchung der Wirkweise von Enzymen können diese pharmakologisch mittels Akitvatoren stimuliert oder durch Hemmstoffen blockiert werden. Da es für die PDE3 keine Aktivatoren gibt, mussten Hemmstoffe eingesetzt werden. Als Hemmstoffe der PDE3 eignen sich Milrinon und Cilostamid. Um die Wirkung der PDE3A-Blockade auf die Relaxationsfähigkeit der Aorta zu untersuchen, wurden Aorten-Ringe in die mit KH-Lösung gefüllten Organbadkammern eingespannt und in Anwesenheit von Diclofenac und L-NAME mit Phenylephrin kontrahiert. Nach dem Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus wurden steigende Konzentrationen des PDE3-Hemmers Milrinon zugegeben. Bereits in den Originalkurven erkennt man, dass durch steigende Milrinon-Konzentrationen eine Relaxation der Aorta induziert wird (Abb. 13). Die statistische Auswertung bestätigt diese Beobachtung und zeigt zusätzlich, dass die Relaxationskurven von GCKO- und SMC-GCKO-Tieren nach links verschoben sind (Abb. 14). So sind beispielweise bei einer Milrinon-Konzentration von 0,1 µM die Aorten der beiden KO-Tiere bereits um etwa 40% relaxiert, während die Aorta der Kontroll-Tiere noch ein Kontraktionsniveau von 90% hat. Die Sensitivität der PDE3A im Aorten-Gewebe der Kontroll-Tiere entsprach mit einem IC₅₀-Wert von 0,8 μM in etwa dem publizierten Wert für das gereinigte Enzym (Harrison *et al.*, 1986). Der IC₅₀-Wert der KO-Tiere betrug lediglich 0,2 μ M. Somit ist in den KO-Aorten weniger PDE3-Blocker notwendig, um die gleiche Relaxation zu erreichen wie im Kontroll-Gewebe. Auch bei Verwendung des zweiten PDE3A-Hemmstoffs Cilostamid kam es zu einer Linksverschiebung der Relaxationskurven der Aorten der beiden KO-Mauslinien (Daten nicht gezeigt). Die Linksverschiebung deutet auf eine Veränderung der PDE3A-vermittelten Signalweiterleitung in den SMC der NO-GC-defizienten Mäusen hin.

4.2.2.3 Effekt von ODQ auf die Milrinon-induzierte Relaxation

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie sich ein akutes Abschalten der NO-GC auf die PDE3A-vermittelte Relaxation auswirkt. Dafür wurde ein pharmakologischer Weg gewählt und die NO-GC durch den spezifischen Inhibitor ODQ blockiert. In die mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Organbadkammern wurden die Aorten-Ringe eingespannt, äquilibriert und Diclofenac und L-NAME zugegeben. Nach Zugabe von Phenylephrin (1 μ M) und dem Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus erfolgte die



Abb. 13: Effekt von Milrinon auf die Relaxation der Aorta

Abgebildet sind repräsentative Original-Spuren einer Mirinon-Konzentrations-Wirkungskurve von Aorten aus **A**) GCKO und **B**) SMC-GCKO mit ihren jeweiligen Geschwistertieren. Aortenringe wurden in Anwesenheit von L-NAME und Diclofenac mit PE (1 μ M) kontrahiert und durch die Zugabe steigender Milrinon-Konzentrationen relaxiert.

В



Abb. 14: Milrinon-induzierte Relaxation der Aorta

Statistische Auswertung der zuvor gezeigten Original-Spuren einer Mirinon-Konzentrations-Wirkungskurve von Aorten aus Kontroll-, GCKO- und SMC-GCKO-Tieren. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von n=6 Tieren (*/+p<0,05; **/++p<0,01). (ctrl = Kontroll-Tiere) Inkubation mit ODQ (10 µM). 20 min später wurden steigende Konzentrationen Milrinon zugegeben und die dadurch ausgelöste Relaxation gemessen. Milrinon führte in WTund GCKO-Aorta zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation (Abb. 15). Die Relaxationskurve der Aorta von GCKO-Mäusen war jedoch nach Links verschoben. Die Relaxationskurve der GCKO-Tiere nach ODQ-Behandlung zeigte, wie zu erwarten, keinen Unterschied zur Kurve der unbehandelten GCKO-Aorta; beide Kurven lagen direkt aufeinander. Im Gegensatz dazu zeigte die Relaxationskurve der Aorten aus WT-Tieren mit ODQ eine wie zu erwartende Linksverschiebung. Diese Linksverschiebung ergibt sich dadurch, dass Milrinon, durch die Zugabe von ODQ, nicht mit cGMP um die PDE3A-Bindung konkurrieren muss und somit weniger Milrinon nötig ist, um den gleichen Effekt wie im unbehandelten Kontroll-Gewebe hervorzurufen. Die Annahme, dass die Kontroll-Kurve durch ODQ so weit nach links verschoben wird, dass sie auf die des GCKO-Tieres fällt, trat nicht ein. Dieser Unterschied ergibt sich aus den Versuchsbedingungen: Die NO-GC-Deletion im GCKO-Tier stellt eine chronische Hemmung dar, die nicht der akuten Hemmung durch ODQ im Kontroll-Tier entspricht. Insgesamt wird deutlich, dass die PDE3A in den GCKO-Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Tieren durch einen anderen Mechanismus beeinflusst wird. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen nach Veränderung der PDE3A-Expression und -Aktivität gesucht.

4.2.2.4 Abnahme der PDE3A-Expression

Zunächst wurde die Expression der PDE3A in der Aorta näher untersucht. Dafür wurden aus den Aorten der verschiedenen Genotypen Homogenate hergestellt, die darin mittels SDS-PAGE enthaltenen Proteine aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran Anschließend wurden unter übertragen. Verwendung spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz die Proteine PDE3A, NO-GC und GAPDH sichtbar gemacht. Das "House-keeping"-Protein GAPDH diente hierbei zur Quantifizierung des PDE3-Signals. "House-keeping"-Gene codieren für Proteine, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen sind. Sie unterliegen keiner Regulation und werden unabhängig vom Zelltyp, der Zellzyklusphase oder äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert (Eisenberg & Levanon, 2013). Sie können daher zur Quantifizierung für die Expression anderer Proteine herangezogen werden.

In Abbildung 16A ist ein exemplarischer Western Blot dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass das PDE3A-Signal in GCKO- und SMC-GCKO-Homogenaten im Vergleich zu den Homogenaten der Kontroll-Tiere deutlich reduziert ist. Diese Reduktion wurde durch die statistische Auswertung bestätigt. Die PDE3A-Expression in den Aorten-Homogenaten der GCKO- und SMC-GCKO-Mäuse war im Vergleich zu den Homogenaten der Kontroll-



Abb. 15: Effekt von ODQ auf die Relaxation der Aorta

Aorten-Ringe aus GCKO- und Kontroll-Tieren wurden mit PE (1 μ M) kontrahiert und anschließend 20 min mit ODQ inkubiert. Anschließend wurden die Ringe mit steigenden Konzentrationen von Milrinon relaxiert. In **A**) sind die Orginal-Spuren von WT- und GCKO-Aorten dargestellt. Abbildung **B**) zeigt die statistische Auswertung mit Mittelwerten ± SEM von je n=6 (*p<0,05). Zum Vergleich wurden die in Abb. 14 gezeigten Daten ohne ODQ in **B**) eingefügt.



В



Abb. 16: Quantifizierung der PDE3A-Expression

Mittels Western Blot wurde die Expression der PDE3A in Aorta-Homogenaten der verschiedenen Genotypen untersucht. Als Ladekontrolle und zur Quantifizierung diente das House-keeping Gen GAPDH.

A) Exemplarischer Western Blot für die in B) gezeigte Quantifizierung.

B) Quantifizierung der Western Blot Analysen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=6. (ctrl = Kontroll-Tiere)

Tiere um 50% reduziert (Abb. 16B). Zusätzlich wurde in den Homogenaten die NO-GC mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen. Wie bereits in Abbildung 5 immunhistochemisch dargestellt, konnte lediglich in Aorten von Kontroll-Mäusen die Expression der NO-GC bestätigt werden. Im Gegensatz dazu gab es in den beiden KO-Aorten kein NO-GC-Signal, da die NO-GC in der Aorta dieser beiden KO-Mäuse nicht mehr exprimiert wird.

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob der Rückgang der PDE3A-Expression in direktem Zusammenhang mit der NO-GC-Deletion stand. Hierzu wurde die PDE3A-Expression mit der zeitabhängigen Abnahme der NO-GC-Expression in SMC-GCKO-Aorten verknüpft (Abbildung 17). Das Zeitschema für diesen Versuch ist in Abbildung 17A dargestellt. Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des SMMHC-Promotors exprimieren, wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen (1 mg i.p.) injiziert. Der letzte Tag der Tamoxifen-Injektion wurde als Tag 0 definiert. Unbehandelte heterozygote Glattmuskel-spezifische Tiere dienten als Kontrolle (pre). Die Western Blot-Untersuchungen fanden 5 und 50 Tage nach den Tamoxifen-Injektionen statt. Dafür wurden Aorten aus den gespritzten Tieren entnommen, Homogenate hergestellt und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurden NO-GC und PDE3A mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Abbildung 17B zeigt die statistische Auswertung dieses Versuchs. Es wird deutlich, dass die PDE3A-Expression bereits nach 5 Tagen um 50% reduziert war. Dies ging einher mit einer deutlichen Reduktion der NO-GC-Expression von 80% an Tag 5. Bis zu Tag 50 reduzierte sich die NO-GC-Expression um weitere 20% (von 20% auf 0%), während sich die PDE3A-Expression nicht mehr änderte. Die 50% ige Abnahme der PDE3A-Expression verlief also parallel mit dem Rückgang der NO-GC-Expression. In unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor bereits nachgewiesen werden, dass der Rückgang der NO-GC-Expression mit einer Reduktion der NO-stimulierten cGMP-Konzentration einhergeht (Groneberg et al., 2010). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Reduktion der PDE3A-Exression durch die NO-GC-Deletion und dem damit verbundenen Rückgang der cGMP-Synthese bedingt ist.

4.2.2.5 PDE3A-Aktivität

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die verminderte PDE3A-Expression in der glatten Muskulatur auch mit einer Reduktion ihrer Enzymaktivität einhergeht. Dafür wurden erneut Aorten-Homogenate hergestellt und die cAMP-abbauende Aktivität der PDE3A im PDE-Assay gemessen. Die Bestimmung der PDE3A-Aktivität wurde bei einer) durchgeführt. Hierbei wurde eine relativ niedrige Substrat-Konzentration (1 µM



В



Abb. 17: Zusammenhang zwischen NO-GC- und PDE3A-Expression

A) Zeit-Schema zur Generierung Glattmuskel-spezifischer Mäuse (SMC-GCKO). An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden Cre-exprimierende SMMHC-Mäusen jeweils 1 mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Der letzte Tag der Tamoxifen-Injektion wurde als Tag 0 definiert. Unbehandelte heterozygote Glattmuskelspezifische Tiere dienten als Kontrolle (pre). Die Western Blot-Untersuchungen fanden 5 und 50 Tage nach den Tamoxifen-Injektionen statt.

B) Western Blot-Analysen von Aortenhomogenaten von SMC-GCKO-Tieren. Zu sehen sind die Abnahme der NO-GC- und PDE3A-Expression 5 bzw. 50 Tage nach Tamoxifen-Injektion. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von n=6.

cAMP) gewählt. Damit konnte gewährleistet werden, dass lediglich die PDE3A am Abbau beteiligt ist, da andere cAMP-abbauende PDEs erst bei deutlich höheren Konzentrationen katalytisch aktiv sind (Bender & Beavo, 2006). Durch die Aktivität der PDE3A wird in den cAMP-Molekülen die Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe und der Ribose gespalten. Das so entstandene ³²P-AMP wird anschließend durch die Alkalische Phosphatase in Adenosin und ³²P-Phosphat gespalten. Die abgespaltenen freien radioaktiven Phosphatreste werden in einem β-Counter gezählt und die Enzymaktivität anhand des abgebauten cAMPs pro mg Gesamtprotein berechnet. Bei der Auswertung wurde bezüglich der Kontroll-Tiere normiert. In Abbildung 18 ist die statistische Auswertung dieses Versuches dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden KO-Mauslinien die PDE3-Aktivität gegenüber den Kontroll-Tieren signifikant reduziert war. In SMC-GCKO-Mäusen betrug diese Reduktion ca. 30%, während in GCKO-Mäusen die Aktivität sogar um 50% reduziert war. Diese Reduktion geht einher mit der verminderten PDE3A-Expression in beiden Mauslinien (siehe Abb. 16).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch Deletion der NO-GC in glatten Muskelzellen keine Beeinflussung der AC und damit des cAMP-Signalweges gibt. Allerdings kommt es in Folge der Deletion zu einer Verminderung der PDE3A-Expression und -Aktivität.

4.3 Einfluss der NO-GC auf die Steifigkeit der Aorta

Aus der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass sowohl durch den globalen, wie auch durch den zellspezifischen glattmuskulären Knock-out der NO-GC einen Blutdruckanstieg um 30 mmHg erfolgt. Somit sollte im dritten Teil dieser Arbeit untersucht werden, in welcher Verbindung die NO-GC-Deletion mit der auftretenden Blutdruckerhöhung steht. Da eine Erhöhung des Blutdrucks mit einer erhöhten Gefäßsteifigkeit einhergeht, wurden verschiedene Versuche zur Steifigkeit der Aorta und zum Aufbau ihrer Wand durchgeführt.

4.3.1 Messung des spezifischen Herzgewichtes

Bisher konnte gezeigt werden, dass der arterielle Blutdruck in beiden KO-Mauslinien im Vergleich zu den Kontroll-Tieren deutlich erhöht war. Die verminderte Relaxationsfähigkeit der Gefäße und der Hypertonus erfordern eine Anpassung des Herzens, um weiterhin eine kontinuierliche Versorgung der Organe und der Peripherie mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Deswegen wurde untersucht, ob es in Folge der Druckbelastung zu einer Myokardhypertrophie kam. Dazu wurden der linke Ventrikel (LV) und das gesamte Herz der KO- und WT-, und Kontroll-Tiere gewogen.


Abb. 18: cAMP-abbauende PDE3A-Aktivität

Aus Aortengewebe wurden Homogenate hergestellt und die cAMP-abbauende PDE3A-Aktivität in Abhängigkeit von Milrionon mittels PDE-Assay gemessen. Es handelt sich um prozentuale Werte \pm SEM bezogen auf die Kontrolltiere von n=5 (*p<0,05). (ctrl = Kontroll-Tiere)

Zusätzlich wurde die Tibialänge bestimmt und das LV-Gewicht/ bzw. Gesamt-Herzgewicht/Tibia-Verhältnis ermittelt (Abb. 19). Diese relativen Werte waren für die GCKO-Mäuse im Vergleich mit ihren WT-Kontrollen identisch und betrugen 4 (LV/Tibia) bzw. 5 (Gesamtherz/Tibia) relative Einheiten. Auch zwischen dem Verhältnis der SMC-GCKO-Mäuse bestand im Vergleich zu ihren heterozygoten Kontrollen kein Unterschied. Hier waren die Verhältnisse etwas höher; 4,5 (LV/Tibia) bzw. 5,5 (Gesamtherz/Tibia) relative Einheiten. Vergleicht man die Verhältnisse der beiden KO-Mauslinien ist auch hier kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Damit lässt sich festhalten, dass der durch NO-GC-Deletion ausgelöste Hypertonus der beiden KO-Mauslinien zumindest in einem Alter von etwa 4 Monaten (GCKO-Mäuse) und 6 Monaten (SMC-GCKO-Mäuse) weder eine Linksherzhypertrophie noch eine das ganze Herz betreffende Hypertrophie zur Folge hat.

4.3.2 Aortensteifigkeit

Ein erhöhter Blutdruck ist die Konsequenz einer erhöhten arteriellen Gefäßsteifigkeit. Diese Versteifung wird durch Umbauprozesse in den Gefäßwänden ausgelöst. Bei anhaltendem mechanischem Stress werden weitere Umbauprozesse ausgelöst, die zu Arteriosklerose und letztlich zu einer Vielzahl kardiovaskulärer Krankheiten führen können. Um zu ermitteln, ob es in Folge der NO-GC-Deletion zu einer erhöhten Gefäßsteifigkeit kam, wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt.

4.3.2.1 Spannungs-Dehnungs-Test

Zunächst wurde ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm von Aorten-Ringen erstellt. Dieser Versuch wird angewendet, um die Eigenschaften eines Materials hinsichtlich seiner Festigkeit und Elastizität zu charakterisieren. Das in Abbildung 20 dargestellte Spannungs-Dehnungs-Diagramm ist nur von der Struktur der Aorten und nicht von den geometrischen Abmessungen des Gefäßes abhängig. Es lassen sich somit direkte Rückschlüsse auf die Gefäßsteifigkeit ziehen. Bei Betrachtung der Kurve fällt zunächst auf, dass bei allen drei Genotypen, die Spannung der Aorta mit erhöhter Dehnung zunimmt. Die Spannungskurve der SMC-GCKO Aorta lag ein wenig oberhalb der Kontroll-Tiere. Diese Erhöhung war jedoch statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte die GCKO-Aorta eine deutliche Spannungserhöhung; diese trat schon bei sehr niedrigen Dehnungen (1%) auf. Zudem hielten im Gegensatz zu den Aorten der anderen Genotypen einige GCKO-Aorten den höheren Spannungen nicht stand und rissen bereits bei einer Dehnung von 14% (siehe Zahlen über der Kurve). Dies und die höherliegende Kurve deuten im Vergleich zur Kontroll- oder auch SMC-GCKO-Aorta auf eine steifere GCKO-Aorta hin.



В



Abb. 19: Spezifisches Herzgewicht

Herzgewichte von etwa fünf Monate alten KO- und Kontrollmäusen wurden bestimmt. In **A**) ist die Relation des linken Ventrikels und in **B**) das Gesamt-Herzgewicht normiert auf Tibialängen dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n = 5-12.

Α



Abb. 20: Spannungs-Dehnungs-Diagramm

Aorten wurden in Ringe geschnitten, der Durchmesser bestimmt und daraus die für die entsprechende Dehnung einzustellende Länge berechnet. Im Organbad wurde die daraus resultierende Kraft gemessen. Aus der Kraft wurde unter Berücksichtigung der Schnittlänge und Wanddicke die Spannung berechnet. Die Werte von SMC-GCKO und GCKO wurden auf die Kontrollwerte normiert. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von n=5-6 mit Ausnahme der letzten drei GCKO-Werte (*p<0,05; **p<0,01). (ctrl = Kontroll-Tiere)

4.3.2.2 Pulswellengeschwindigkeit

Ein weiteres und häufig verwendetes Maß für Gefäßsteifigkeit ist die Pulswellengeschwindigkeit (PWV). Sie beschreibt die Ausbreitungsgeschwindigkeit, mit der die Druckwelle durch die Arterien läuft. Diese Geschwindigkeit ist nicht nur abhängig von der Kontraktionsfähigkeit des Herzens, sondern auch von der Elastizität und dem Durchmesser der großen Arterien wie der Aorta.

Die Bilder zur Errechnung der PWV wurden mittels Magnetresonanztomographie aufgenommen und die Geschwindigkeit mit der QA-Methode bestimmt, d.h. sie wurde lokal aus der Änderung des Volumenflusses und der Querschnittsfläche des Gefäßes während der frühen Systole errechnet. In Abbildung 21 sind diese Parameter und die aus ihnen bestimmte PWV dargestellt. Zunächst wurde die prozentuale Zunahme der aortalen Querschnittsfläche berechnet (siehe Abb. 21A). Dabei ergibt sich zwischen den einzelnen Genotypen kein Unterschied, d.h. die Zunahme während der frühen Systole verlief in allen Mauslinien gleich. Betrachtet man jedoch die Zeit, in der diese Zunahme stattfand, so ergibt sich bei den GCKO-Tieren ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (siehe Abb. 21B). Dies spiegelt sich auch in den in Abbildung 21C dargestellten PWV wieder. Während in der Aorta der Kontroll-Tiere eine lokale PWV von 2,3 m/s herrscht, ist diese bei GCKO-Tieren mit 4,0 m/s fast doppelt so hoch. In SMC-GCKO-Mäusen ist keine Erhöhung der PWV zu erkennen; sie betrug 2,1 m/s. Die erhöhte aortale PWV in GCKO-Mäusen deutet auf ein steiferes Gefäß in diesen Tieren hin. Diese Tatsache stimmt mit den Ergebnissen des Spannungs-Dehnungs-Diagramms überein. Es lässt sich zusammenfassen, dass lediglich der globale KO der NO-GC zu einer steiferen Aorta führt. Da jedoch die Aorta der SMC-GCKO-Tiere keine erhöhte Steifigkeit aufweist, kann die in beiden KO-Mauslinien auftretende Hypertonie nicht in direktem Zusammenhang mit der erhöhten PWV stehen.

4.3.3 Messung der Aorten-Geometrie

Bereits bei der Messung des Durchmessers zur Erstellung des Spannungs-Dehnungs-Diagramms fiel auf, dass die GCKO-Aorten insgesamt kleiner waren als die der Kontrolloder SMC-GCKO-Tiere. Der Durchmesser ist für die Entstehung der PWV ein wichtiger Parameter. Bei konstantem Blutvolumen und Blutdruck gilt: Je kleiner das Rohr, desto größer die Fließgeschwindigkeit des Blutes. Deswegen wurden Wanddicke und Durchmesser der Aorta gemessen und auf die Tibialänge der Tiere normiert (Abb. 22) Bei den Ergebnissen handelt es sich somit um *ex vivo*-Werte, die nicht den Größen im Tier gleichen, da die Dehnung durch das durchfließende Blut wegfällt. Aufgrund des unterschiedlichen Alters und dem sich daraus ergebenden Größenunterschied konnten die Daten der WT- und heterozygoten Kontroll-Tiere nicht zusammengefügt werden. Die



В

Α



Genotyp	PWV (m/s)	
ctrl	$2,3 \pm 0.2$	
GCKO	4,0 ± 0.5 *	
SMC-GCKO	2,1 ± 0.3	

Abb. 21: Pulswellengeschwindigkeit

Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert, in einer Spule fixiert und Atmung und Herzschlag mittels EKG überwacht. In einem MRT wurde die Querschnittsfläche der thorakalen Aorta bildlich dargestellt. Zur Errechnung der Pulswellengeschwindigkeiten (PWV) wurden **A**) die prozentuale Flächenzunahme und **B**) die Zeit, in der die Zunahme stattfindet, gemessen. Aus diesen Werten wurden die in **C**) dargestellten PWVs errechnet. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von n=5 (*p<0,05). (ctrl = Kontroll-Tiere)



Abb. 22: Geometrie der Aorta

Aorten wurden entnommen, in KH-Lösung freipräpariert und in dünne Ringe geschnitten. Diese Ringe wurden in einem Tropfen KH-Lösung auf einem Objektträger mit Lineal unter dem Binokular fotografiert. Mit der Software ImageJ wurde anhand der Bilder **A**) der Durchmesser und **B**) die Wanddicke der Ringe bestimmt und auf die Tibialänge normiert (*p<0,05).

В

Messung der Wanddicke ergab bei den KO-Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen kein Unterschied. Jedoch waren die GCKO-Aorten, wie erwartet, deutlich kleiner als die der WT-Tiere. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Größe der SMC-GCKO-Aorta nicht von der ihrer Kontrolle. Es scheint, dass ein globaler KO der NO-GC zu der Ausbildung einer kleineren Aorta führt.

4.3.4 Messung der ECM-Proteine

Aus den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass die GCKO-Aorten steifer sind als jene von Kontroll- oder SMC-GCKO-Tieren. Für die Elastizität der Gefäße sind die Proteine der ECM verantwortlich. In der Aorta und den großen Arterien sind das hauptsächlich Elastin und Kollagen. Kollagen verleiht den Gefäßen ihre Zugfestigkeit, während Elastin für die Dehnbarkeit verantwortlich ist. Da die veränderte Dehnbarkeit von GCKO-Aorten sowohl durch eine vermehrte Kollagen- wie auch eine verminderte Elastin-Expression bedingt sein kann, sollte im Folgenden der aortale Gehalt der beiden Proteine bestimmt werden.

Um den Anteil an Kollagen zu untersuchen wurde zunächst die Pikrosiriusrot-Färbung angewendet (Daten nicht gezeigt). Da die Färbung der Schnitte unterschiedlich stark ausfiel, abhängig vom Platz der Objektträger in den Färbeschalen und der dadurch unterschiedlich starken Entfärbung, konnte keine Quantifizierung der angefärbten Kollagenfasern durchgeführt werden. Deshalb musste ein anderer, diesmal biochemischer Ansatz gewählt werden. Die Quantifizierung des Strukturproteins Kollagen erfolgte mittels kolorimetrischer Messung nach einer modifizierten Methode von Stegemann and Stalder (1967). In Abbildung 23A sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt. Die Werte der Kontroll-Tiere wurden als 100% definiert. Bei diesen Messungen konnten die Daten von WT- und heterozygoten Kontroll-Tieren nicht zusammengefasst werden. SMC-GCKO- und ihre Kontroll-Mäuse wurden erst im Alter von 6-8 Wochen mit Tamoxifen behandelt und konnten erst 50 Tage später in den Versuch eingesetzt werden. Dadurch ergab sich eine Altersdifferenz zwischen den GCKO- und SMC-GCKO-Tieren mit zugehöriger Kontrolle. Im Alter kommt es zu einer Veränderung der ECM-Zusammensetzung, die u.a. mit einer Erhöhung des Kollagenund einer Erniedrigung des Elastin-Gehalts einhergeht (Brooke et al., 2003). Diesen Sachverhalt bestätigten auch die absoluten Kollagen- und Elastin-Mengen (nicht dargestellt). Betrachtet man nun die prozentualen Kollagen-Werte der KO-Aorten im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen, so ist kein Unterschied erkennbar. Es kam sogar an Stelle der erwarteten Erhöhung des Kollagen-Gehalts zu einer minimalen Reduktion desselben. Diese Reduktion betrug jedoch weniger als 10% und ergab in der



В



Abb. 23: Biochemische Messung von Elastin und Kollagen

Aortenproben wurden in Säure gekocht, um die Struktur aufzulösen und die ECM-Proteine Kollagen und Elastin mittels verschiedener kolorimetrischer Methoden quantifizieren zu können.

A) Der Kollagen-Gehalt wurde in einer veränderten Weise nach Stegmann und Stalder (1967) anhand der Hydroxyprolin-Konzentration bestimmt.

B) Der Elastin-Gehalt wurde mit dem kommerziellen Elastin-Assay von Biocolor gemessen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=4-6.

statistischen Auswertung keine Signifikanz. Der Kollagen-Gehalt war in beiden KO-Mauslinien nicht verändert.

Als nächstes wurde das zweithäufigste ECM-Protein der Gefäßwand gemessen: Elastin. Dafür wurde ein kommerzieller Elastin-Assay von Biocolor verwendet. Auch hierbei handelt es sich um eine biochemische Methode, die auf der Farbreaktion der Proben und des zur Quantifizierung notwendigen Standards beruht. Die Absorptionen der Proben und Standards wurden mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen und der Elastin-Gehalt der Aorten-Homogenaten anhand des mitgeführten Elastin-Standards errechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23B dargestellt. Die Werte der Kontroll-Tiere wurden als 100% definiert. Wie auch bei der Kollagen-Messung konnten die Werte der WT- und heterozygoten WT-Tiere nicht zusammengefasst werden. Bei Betrachtung der prozentualen Elastin-Werte ergibt sich das gleiche Bild wie im Kollagen-Diagramm. Auch hier gibt es zwischen den KO-Tieren und ihren jeweiligen Kontrollen keinen Unterschied. Zwar kam es hier zu dem erwarteten Rückgang des Proteins, der jedoch mit ca. 5% nicht signifikant war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion der NO-GC weder zu einer Veränderung des Kollagen- noch des Elastin-Gehalts in Aorten führt.

4.3.5 Struktur der Aorta

Zusätzlich zu den äußeren Abmessungen der Aorta sollte auch deren Struktur näher untersucht werden. Dafür wurden 7 µm dünne Paraffinschnitte der Aorten hergestellt und diese mit Eosin und Hämatoxylin angefärbt. Eosin färbt alle basischen Zellstrukturen rot, während Hämatoxylin in seiner oxidierten Form alle sauren Strukturen, somit die DNA, blau färbt. In Abbildung 24 und 25 sind die aufgenommen Durchlichtbilder dargestellt. Zunächst fällt auf, dass der Durchmesser der GCKO-Aorten kleiner war im Vergleich zu den Aorten aller anderen Genotypen. Damit bestätigt sich die in 4.3.3 gemessene Durchmesser-Reduzierung der GCKO-Aorten. Außerdem scheint die Wand der GCKO-Aorten verändert zu sein. Die Anzahl der "elastic lamellae" (EL) in den Aorten aller Genotypen ist gleich; sie beträgt 5-7. Jedoch ist die Struktur der EL in den GCKO-Aorten deutlich verändert. Während die EL der WT-Aorten eine große Anzahl an Windungen aufweisen, besitzen die GCKO-Tiere viele gerade Abschnitte (siehe Abb. 24). Vor allem die innerste, dem Lumen zugewandte Schicht ist in den Kontroll-Tieren stark gewunden. Dies ist in GCKO-Mäusen nicht der Fall; zusätzlich scheinen die EL näher zusammen zu liegen, also die gesamte Aorta komprimierter zu sein als es im WT der Fall ist. Bei SMC-GCKO- und ihren Kontroll-Mäusen sind diese Unterschiede nicht zu sehen (siehe Abb. 25). Die Aorten der SMC-GCKO-Tiere besitzen ähnlich viele Windungen wie ihre Kontroll-Tiere und auch der Abstand zwischen den EL scheint gleich. Somit scheint nur



Abb. 24: Veränderte Struktur der "elastic lamellae" in GCKO-Aorten Aorten von WT- und GCKO-Tieren wurden in Paraffin eingebettet, Schnitte (7 μm) angefertigt und diese mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.



Abb. 25: Struktur der "elastic lamellae" in SMC-GCKO-Aorten Aorten von heterozygoten Kontroll- und SMC-GCKO-Tieren wurden in Paraffin eingebettet, Schnitte (7 μm) angefertigt und diese mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

der globale KO der NO-GC zu einer veränderten Geometrie und Struktur der Aorta zu führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nur in den Aorten der GCKO-Tieren zu einem reduzierten Durchmesser, einer veränderten Geometrie und einer erhöhten Steifigkeit kommt (Abb. 26). Diese Steifigkeit ist unabhängig von Kollagen und Elastin und scheint nicht durch die Hypertension hervorgerufen zu sein.

	GCKO	SMC-GCKO
Durchmesser	Ļ	0
Steifigkeit	1	0
PWV	1	O
Blutdruck	1	1
Kollagen	0	0
Elastin	0	O
"EL"-Struktur	1	O

Abb. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil 4.3 Dargestellt sind die beobachteten Veränderungen der KO-Aorten. ("EL" elastic lamellae, durchgestrichener Kreis: keine Veränderung blauer Pfeil: erniedrigt, roter Pfeil: erhöht)

5 Diskussion

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) wird durch das Signalmolekül NO aktiviert und katalysiert die Bildung des intrazellulären Botenstoffs cGMP. Als Schlüsselenzym in der NO/cGMP-Signalkaskade ist sie bei vielen physiologischen Prozessen, z.B. der Relaxation der glatten Muskulatur, von entscheidender Bedeutung. Im kardiovaskulären System ist die NO-GC durch das Zusammenspiel von Relaxation und Kontraktion der glatten Muskelzellen an der Regulation des Blutdrucks beteiligt.

Um die Bedeutung der NO/cGMP-Signalkaskade genauer zu untersuchen wurden in unserem Labor globale Knockout-Mäuse für das Enzym erzeugt (GCKO). Zusätzlich wurde eine zellspezifische Knockout-Linie mit Hilfe des Cre-LoxP-Systems hergestellt. Injektion von Tamoxifen führt in diesem induzierbaren KO-Modell ausschließlich in glatten Muskelzellen zur Deletion der NO-GC (SMC-GCKO).

5.1 Deletion der NO-GC in den Gefäßen

In dieser Arbeit sollte zunächst die erfolgreiche NO-GC-Deletion in den Gefäßen auf Proteinebene und funktionell in Organbadexperimenten untersucht werden. Hierzu wurde sowohl die Aorta, als auch die *Arteria carotis* verwendet. Die Aorta als größte Arterie im Säugetierkörper entspringt direkt aus der linken Herzkammer. Aufgrund der großen Elastizität ihrer Gefäßwand verwandelt die Aorta das schubweise aus dem Herz ausgestoßenen Blut in einen kontinuierlichen Blutstrom ("Windkesselfunktion"). Der Druck des Blutes wird dabei ständig durch Drucksensoren, den Barorezeptoren, gemessen. Auch in der Gefäßwand des *Sinus carotis* der *A. carotis* sitzen Barorezeptoren mit gleicher Funktion. Diese Drucksensoren leiten bei Veränderung des arteriellen Blutdrucks nervale Impulse in das Kreislaufsystem des autonomen Nervensystems in der *Medulla oblongata*. Hier werden, wenn nötig, reflektorisch Herzfrequenz und Blutdruck gesenkt. Beide Arterien sind somit von großer Bedeutung für die Regulation des Blutdrucks.

Um die NO-GC auf Proteinebene und in glatten Muskelzellen (SMC) nachzuweisen, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Dadurch konnte die Deletion der NO-GC in den SMC der Aorta und *A. carotis* der GCKO- und SMC-GCKO-Tiere bestätigt werden (siehe Abb. 5 und 6). Um zusätzlich den funktionellen Verlust der NO-GC und damit der NO/cGMP-Signalkaskade zu untersuchen, wurden Aorta- bzw. *A. carotis*-Ringe in das Organbad eingespannt und nach Kontraktion mit NO relaxiert (siehe Abb. 7 und 8). In beiden KO-Mauslinien blieb im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren eine NO-vermittelte Relaxation vollständig aus. Durch den Verlust der NO-Responsivität und des

Proteinsignals kann die Deletion der NO-GC in den Gefäßen der GCKO- und SMC-GCKO-Tiere bestätigt werden. Beide KO-Mausmodelle könnten deshalb verwendet werden, um den Wegfall des NO-GC-Signals in den folgenden Zusammenhängen näher zu untersuchen:

- (1) Einfluss der NO-GC-Deletion auf den cAMP/cGMP-Crosstalk
- (2) Bedeutung der NO-GC für die Steifigkeit der Aorta

5.2 Einfluss der NO-GC-Deletion auf den cAMP/cGMP-Crosstalk

Durch die Relaxation der glatten Muskelzellen trägt die NO/cGMP-Signalkaskade entscheidend zur Regulation des Blutdrucks bei. Mäuse mit einer Deletion der NO-GC leiden an einer Vielzahl gastrointestinaler und vaskulärer Erkrankungen. Auch der KO der cGMP-abhängige Protein-Kinase I in Mäusen führt zu ähnlichen Symptomen. Der fehlerfreie Ablauf des cGMP-Signalwegs ist somit wichtig für die Erhaltung der gesunden Körperfunktion. Neben dem von der NO-GC synthetisierten sekundären Botenstoff cGMP gibt es noch einen weiteren v.a. für die Blutdruckregulation wichtigen Botenstoff: cAMP. Dieses Signalmolekül wird von der Adenylyl-Cyclase produziert und bewirkt durch Aktivierung der cAMP-abhängige Protein-Kinase eine Relaxation der glatten Muskelzellen. Phosphodiesterasen (PDEs) beenden die Relaxationssignale durch Abbau der beiden sekundären Botenstoffe. Sie bilden somit den Verknüpfungspunkt im cAMP- und cGMP-Signalweg. Dieser sogenannte Crosstalk findet in vielen verschiedenen Zelltypen statt. Da beide Signalwege über die PDEs mit gemischter Substratspezifität verknüpft sind, sollte untersucht werden, ob die Deletion der NO-GC zu einem Kompensationsmechanismus in der cAMP-Signalkaskade führt.

Um etwaige Veränderungen in diesem Signalweg zu untersuchen, wäre es von Vorteil die Expression der Adenylyl-Cyclase (AC) in den verschiedenen KO-Tieren im Vergleich zu Kontroll-Tieren zu untersuchen. Allerdings ist es aufgrund der vielen Isoenzyme der AC schwierig, geeignete Antikörper zu finden. Um dennoch eine eventuell auftretende Modifikation der AC festzustellen, wurde der von der AC synthetisierte sekundäre Botenstoff cAMP näher untersucht. Dafür wurde zunächst der cAMP-Spiegel in Aorten-Homogenaten basal und nach Zugabe von Forskolin gemessen (siehe Abb. 9). Der basale cAMP-Gehalt war in GCKO-, SMC-GCKO- und Kontroll-Tieren Protein in allen Genotypen gleich. Durch die Stimulation der AC mit Forskolin stieg die intrazellulären cAMP-Konzentration zwar um das 10fache an, zeigte jedoch auch hier keinen Unterschied zwischen den beiden KO-Mauslinien und den Kontroll-Tieren. Auch die im Organbad gemessene Forskolin-induzierte Relaxation der Aortenmuskulatur ergab zwischen den KO- und Kontroll-Tieren keinen Unterschied; alle im Organbad erzeugten

Relaxationskurven lagen direkt aufeinander (siehe Abb. 11). Die cAMP-Synthese und die cAMP-vermittelte Relaxation scheinen somit unverändert. Dies deutet darauf hin, dass der cAMP-Signalweg nicht von der Deletion der NO-GC und der dadurch reduzierten cGMP-Synthese beeinflusst wird. Da jedoch die cAMP- und die cGMP-Signalkaskade über PDEs miteinander verknüpft sind, stellte sich die Frage, ob bei diesen Enzymen eine Veränderung durch NO-GC-Deletion stattfindet.

Die für den cAMP-Abbau in glatten Muskelzellen wichtigste PDE ist die PDE3 (Bender & Beavo, 2006). Sie gehört zur Gruppe der PDEs mit gemischter Substratspezifität, wobei die Bindungsaffinität für cGMP höher ist als für cAMP. Allerdings ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit für cAMP 10 fach höher als für cGMP, weshalb sie auch als cGMP-inhibierte PDE bezeichnet wird. Die PDE3 baut beide sekundären Botenstoffe schon bei sehr niedrigen intrazellulären Konzentrationen ab (Km-Wert ca. 0,2). Die PDE3 ist somit einer der wichtigsten Vermittler zwischen dem cGMP- und dem cAMP-Signalweg. Sie spielt dadurch bei vielen Körperfunktionen eine wichtige Rolle. So trägt sie beispielsweise zu der Kontraktilität des Herzens bei. In gesunden Menschen wird sie stark im Myokard exprimiert (Hambleton et al., 2005; Vandeput et al., 2009). In insuffizienten Herzen ist die Expression der PDE3 hingegen vermindert und die Apoptoserate der Kardiomyozyten stark erhöht (Ding et al., 2005). Auch ist die PDE3 ein klinisch relevantes Target. Der spezifische PDE3-Inhibitor Milrinon wird zur Therapie der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt (Packer et al., 1991). Durch Hemmung der PDE3 akkumuliert der sekundäre Botenstoff cAMP. Dieser aktiviert die Proteinkinase A, was zu einer Phosphorylierung von Ca2+-Kanälen führt. Durch den Ca2+-Einstrom kommt es zu einer Kontraktion des Herzmuskels und zusätzlich durch Gefäßdilatation zur Reduktion des peripheren Widerstandes. Ein weiterer spezifischer PDE3-Inhibitor (Cilostamid) wird zur Behandlung peripherer arterieller Verschlusskrankheiten, die durch Arteriosklerose entstanden sind, eingesetzt (Kanlop et al., 2011). Ist die PDE3A durch Deletion auf genetischer Ebene nicht mehr vorhanden, so kommt es sogar zu einer Fehlregulation der Proliferation vaskulärer Myozyten (Begum et al., 2011). Auch führt die genetische Mutation der PDE3A zu einer Brachydaktylie in Kombination mit einer Hypertension (Houslay, 2015; Maass et al., 2015). Es zeigt sich, dass die PDE3 von großer Bedeutung für das Herz-Kreislaufsystem ist. Deshalb wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der cAMP/cGMP-Crosstalk auf Ebene der PDE3 untersucht.

Von der PDE3 existieren zwei Isoformen, die von zwei verschiedenen Genen gebildet werden. Mittels Western Blot und immunhistochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die PDE3A und nicht die PDE3B in Aortengewebe exprimiert wird (siehe Abb. 12). Zusätzlich zeigte durch immunhistchemischen Aufnahmen eine Kolokalisation der PDE3A in α-Glattmuskel Aktin-exprimierenden

Zellen, was die Expression der PDE3A in glatten Muskelzellen beweist. Die PDE3B hingegen wird in dem die Aorta umgebenden Fettgewebe exprimiert und spielt somit in glatten Muskelzellen keine Rolle (siehe Abb. 12C). Diese Ergebnisse werden auch von der Literatur bestätigt, in der es heißt, dass die PDE3A die Kontraktilität des Herzens, die Thrombozyten-Aggregation und die Kontraktion der glatten Muskelzellen reguliert. Die PDE3B hingegen sei für den Effekt von Insulin und den Zellzyklus verantwortlich (Bender & Beavo, 2006). Für die Gefäße und damit relevant für die Blutdruckregulation ist somit lediglich die PDE3A.

Die Relevanz der PDE3A für die Funktionalität der Gefäße bestätigte sich auch in Organbadexperimenten. Durch Zugabe von Milrinon (10 µM) konnten zuvor kontrahierte Aorten-Ringe nahezu vollständig relaxiert werden (siehe Abb. 14). Überraschenderweise waren die Relaxationskurven von GCKO- und SMC-GCKO-Tieren im Vergleich zu der Kurve der Kontroll-Tiere nach links verschoben. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität der KO-Aorten für den Inhibitor Milrinon hin, was sich folgendermaßen erklären lässt: Durch die Deletion der NO-GC kommt es zu einem verminderten intrazellulären cGMP-Spiegel (Groneberg et al., 2010). Somit blockiert Milrinon direkt die PDE3A und muss nicht mit cGMP um die Blockade konkurrieren. Deshalb reicht bereits eine geringere Milrinon-Konzentration aus, um den gleichen Effekt wie im WT-Tier hervorzurufen. Auch bei der Verwendung des PDE3-Inhibitors Cilostamid ergibt sich diese Linksverschiebung, was einen zufällig auftretenden Milrinon-Effekt ausschließt. Die oben genannte Vermutung bestätigte sich auch bei einer akuten Blockade der NO-GC durch den spezifischen Inhibitor ODQ (siehe Abb. 15). Bei Inkubation der WT-Aorta mit ODQ verschob sich die Relaxationskurve nach links, jedoch fiel sie dabei nicht auf die der GCKO-Tiere. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein noch vorhandener basaler cGMP-Spiegel sein, der noch mit Milrinon um die PDE3A-Blockade konkurriert und somit den Sensitivitätseffekt auf Milrinon vermindert. Diese Vermutungen sind schematisch und zusammenfassend in Abbildung 27 dargestellt. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der NO-GC-Inhibition mit ODQ um eine akute Blockade der NO-GC handelt und nicht wie in den GCKO-Tieren um eine chronische Deletion und damit Reduktion des cGMP-Spiegels.

Allerdings stellte sich die Frage, ob nicht auch eine Veränderung der PDE3A auf Ebene ihrer Expression oder Aktivität der Grund für die sensitivere Reaktion der KO-Aorten auf Milrinon sein könnte. Derzeit ist wenig über die Regulation der PDE3A-Expression bekannt, wobei es in der Literatur einige Hinweise auf eine Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade gibt. In Ratten kam es in Folge einer Herzinsuffizienz zu einer erhöhten vaskulären PDE3A-Expression (Hubert *et al.*, 2014). In isolierten glatten Muskelzellen von Ratten bewirkten NO-Donatoren und NO-GC-Stimulatoren eine Erhöhung der



Abb. 27: Einfluss von Milrinon auf den PDE3A-vermittelten cAMP/cGMPCrosstalk

Dargestellt ist der Ablauf des PDE3-vermittelten cAMP/cGMP-Crosstalks in den Glattmuskelzellen (SMC) der Aorta von WT-Tieren mit und ohne ODQ und GCKObzw. SMC-GCKO-Tieren in Anwesenheit von Milrinon (Mil). Weitere Erklärungen siehe Text. (cG = cGMP, cA = cAMP) PDE3A-Expression und -Aktivität. Hingegen führte die Blockade der NO-GC durch ODQ zu einer verminderten PDE3A-Expression (Busch *et al.*, 2010). Auch in dieser Arbeit konnte ein Einfluss der NO/cGMP-Signalkaskade auf die PDE3A-Expression gezeigt werden. Aus Western Blot Analysen ergab sich im Vergleich zu den Kontroll-Tieren eine 50%ige Reduktion der PDE3A in GCKO- und SMC-GCKO-Aorten. (siehe Abb. 16). Um die Frage zu klären, ob diese Reduktion mit der NO-GC-Deletion und der damit verminderten cGMP-Synthese verbunden war, wurden Expressions-Verlaufsstudien mit SMC-GCKO-Tieren durchgeführt (siehe Abb. 17). Mittels Western Blot Analysen ließ sich bereits nach 5 Tagen neben der verminderten NO-GC-Expression auch eine Reduzierung der PDE3A-Expression feststellen. Die 50%ige Abnahme der PDE3A-Expression an Tag 5 ging einher mit einer 80%igen Verminderung der NO-GC-Expression der PDE3A.

Wie zu erwarten kam es in Folge der verminderten PDE3A-Expression auch zu einer geringeren cAMP-abbauenden Aktivität (siehe Abb. 18). Diese ergab sich sehr wahrscheinlich aus der geringeren Konzentration an PDE3A-Molekülen. Durch das Fehlen der NO-GC ist die PDE3A somit in ihrer Expression und Aktivität reduziert. Dieser Kompensationsmechanismus dient vermutlich dazu das cAMP-Signal weitgehend zu erhalten und so eine cAMP-induzierte Relaxation der Gefäße zu gewährleisten. Würde es keine Rückkopplung zwischen dem cAMP- und cGMP-Signalweg und keinen internen Ausgleich bei Verlust eines der beiden Signale geben, würde der Blutdruck durch fehlende Gefäß-Relaxation möglicherweise noch weiter ansteigen.

All diese Daten weisen auf eine direkte Regulation der PDE3A in glatten Muskelzellen durch die NO/cGMP-Signalkaskade und einen PDE3A-vermittelten cAMP/cGMP-Crosstalk hin. Der genaue Mechanismus dieser Expressionsregulation muss allerdings noch aufgeklärt werden. Hier könnte es, analog zum "cAMP-responsive element" (Montminy *et al.*, 1990; Bourtchuladze *et al.*, 1994), eine cGMP-vermittelte Transkriptionsregulation geben. Erste Hinweise auf ein solches "cGMP-responsive element" gibt es bereits im Zusammenhang mit der Guanylyl-Cyclase A-Expression (Hum *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2010). Alternativ wäre auch eine Modulation der Translation der PDE3A denkbar.

5.3 Bedeutung der NO-GC für die Steifigkeit der Aorta

Glatte Muskulatur befindet sich in verschiedenen Systemen, wie den Gefäßen und dem gesamten Gastrointestinaltrakt. Sie steuert durch geregelte Kontraktionen und Relaxationen der einzelnen glatten Muskelzellen die grundlegenden Funktionen des Körpers, so z.B. die Regulation des Blutdrucks. Eine Dysregulation des Blutdrucks, die

arterielle Hypertonie, ist als Risikofaktor verantwortlich für Arteriosklerose und führt darüber hinaus zu einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz oder Schlaganfall. Die der Entstehung der Hypertonie zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit nicht vollends bekannt und werden kontrovers diskutiert. Da die NO/cGMP-Signalkaskade bei der Relaxation der glatten Muskulatur eine entscheidende Rolle spielt, trägt sie wesentlich zur Regulation des Blutdrucks bei. Anhand verschiedener KO-Maus-Modelle der NO/cGMP-Signalkaskade wird die Bedeutung der an diesem Signalweg beteiligten Komponenten deutlich. So zeigen globale KO-Maus-Linien der eNOS, der PKG und des BK-Kanals einen erhöhten Blutdruck (Nelson et al., 1995; Pfeifer et al., 1998; Brenner et al., 2000). Auch die pharmakologische Inhibition der NO-GC durch die Gabe von L-NAME führt zu einer Hypertonie (Van Vliet et al., 2003). Dies zeigte sich auch bei Untersuchungen in unserem Labor. Hier wurde L-NAME dem Trinkwasser der Tiere zugesetzt und der Blutdruck an drei Tagen mittels Schwanz-Plethysmographie gemessen. Bereits am ersten Tag nach L-NAME Gabe kam es in WT-Tieren zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks um 20 mmHg. Im Gegensatz dazu zeigten die SMC-GCKO-Tiere auch 5 Tage nach der Behandlung keine Veränderung des Blutdrucks. Daraus lässt sich schließen, dass die Blutdruck-regulierende Wirkung von NO exklusiv über die NO-GC in glatten Muskelzellen vermittelt wird (Groneberg et al., 2010). Auch bei genetischem Knock-out der NO-GC kommt es zur Erhöhung des systolischen Blutdrucks. Die in unserem Labor erzeugten NO-GC-defizienten und in dieser Arbeit verwendeten GCKO- und SMC-GCKO-Mäuse besitzen im Vergleich zu ihren Kontrollen einen um 30 mmHg erhöhten systolischen Blutdruck (Friebe et al., 2007; Groneberg et al., 2010). All diese Untersuchungen bestätigen eine enorme Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade an der Blutdruckregulation.

Eine Erhöhung des Blutdrucks ist die Konsequenz eines pathologischen arteriellen Wandumbaus (Cohn, 2006). Das heißt eine erhöhte Aortensteifigkeit geht der Hypertonie zeitlich voraus (Kaess *et al.*, 2012). Bei zunehmender Gefäßsteifigkeit geht die Windkesselfunktion der Aorta verloren und führt zu einer erhöhten systolischen Pulswellengeschwindigkeit. Dadurch kommt es zur erhöhten Reflexion von Pulswellen einschließlich der Überlagerung dieser bereits in der Systole und nicht wie bei normal elastischen Gefäßen erst in der Diastole. Daraus resultiert ein Anstieg des systolischen und eine Abnahme des diastolischen Blutdrucks und somit eine Erhöhung des Pulsdrucks (London, 1997). Diese negativen hämodynamischen Veränderungen führen zu einer verstärkten Nachlast für das Herz und einem verminderten diastolischen Fluss in den Koronararterien. Eine anhaltende kardiale Nachlast kann zu einer Hypertrophie des Herzens und einem Verlust der geordneten Struktur der Myozyten und Myofibrillen

führen. Dieser Vorgang stellt einen Kompensationsmechanismus an die vermehrt zu leistende Herzarbeit dar. Im Laufe der bestehenden Hypertonie kommt es bei gleichbleibender Zellzahl zu einer Zunahme des Zellvolumens, also zu einer Erhöhung der Wanddicke bei unveränderter Muskelmasse (prähypertrophierte Symptome). Bei weiterhin bestehender erhöhter Blutdruckbelastung entwickelt sich eine echte Hypertrophie. Meist entsteht zuerst eine konzentrische Hypertrophie mit normaler Größe der linken Herzkammer aber deutlich zu dicken Muskelwänden und anschließend eine exzentrische Hypertrophie mit Vergrößerung der Herzkammer aber wieder relativ normaler Wanddicke (Hennersdorf & Strauer, 2007).

Trotz der systolischen Blutdruckerhöhung von 30 mmHg in den untersuchten GCKOund SMC-GCKO-Mäusen kam es weder zu einer Zunahme der Masse des linken Ventrikels, noch zu einer Gesamtherz-Hypertrophie (siehe Abb. 19). Auch die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels war in unseren GCKO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren nicht erhöht (Zhu *et al.*, 2015). Somit lag noch keine konzentrische oder exzentrische Hypertrophie vor. Erst diese Stadien gehen mit einer Zunahme der Muskelmasse bzw. einer erhöhten Auswurfleistung einher. Eine mögliche Begründung für die fehlende Hypertrophie ist vermutlich das Alter der verwendeten Mäuse. Die Tiere waren nicht älter als 6 Monate und die Hypertrophie des Herzgewebes vermutlich noch nicht feststellbar ausgeprägt. Histologische Untersuchungen könnten Aufschluss über ein bereits in diesem Alter der Tiere auftretendes prähypertrophiertes Stadium geben. Auch sollten ältere Tiere auf eine Hypertrophie des Herzens untersucht werden.

Die Erhöhung des Blutdrucks ist die späte Folge einer erhöhten Gefäßsteifigkeit. Um Gefäßschäden früher zu entdecken und somit dem Auftreten kardiovaskulärer Krankheiten frühzeitig entgegen wirken zu können, sind Methoden zur Gefäßbeurteilung von großer klinischer Relevanz. Als mögliche Ursache für die Blutdruckerhöhung von 30 mmHg in GCKO- und SMC-GCKO-Tieren wurde daher eine erhöhte Aortensteifigkeit in Betracht gezogen. Da beide KO-Mausmodelle einen erhöhten Blutdruck aufweisen war zu erwarten, dass auch die Aorten beider Mauslinien eine erhöhte Steifigkeit aufweisen. Um die Steifigkeit zu untersuchen wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde *ex vivo* die Materialeigenschaft der Aorten im Spannungs-Dehnungs-Test untersucht. Die Erstellung eines Spannungs-Dehnungs-Diagramms gibt Aufschluss über die Zugfestigkeit und Elastizität eines Materials (siehe Abb. 20). Unter Berücksichtigung der geometrischen Größen der unterschiedlichen murinen Aorten, konnten Daten erzeugt werden, die nur von der Struktur der Gefäße abhängig waren. Es zeigte sich, dass lediglich die Aorten der GCKO-Tiere im Vergleich zu den Kontroll-Tieren weniger elastisch waren. Die deutlich erhöhte Zugfestigkeit zeigte sich bereits bei der geringsten Dehnung von 1%. Auch waren die Aorten deutlich weniger belastbar als die der SMC-GCKO- und Kontroll-Tiere, denn sie rissen deutlich früher. Ein weiteres und häufig verwendetes Maß für eine erhöhte Gefäßsteifigkeit ist die Pulswellengeschwindigkeit (PWV). Sie beschreibt die Ausbreitungsgeschwindigkeit, mit der die Druckwelle durch die Arterien läuft. Bei der Versteifung der Gefäße kommt es zur Zunahme der PWV und dadurch zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks. Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt ein nicht-invasives Verfahren zur Bestimmung der PWV dar und wird deshalb auch in der Humanmedizin angewendet. Die Pulswellengeschwindigkeit wurde mit der QA-Methode bestimmt, d.h. sie wurde lokal aus der Änderung des Volumenflusses und der Querschnittsfläche des Gefäßes während der frühen Systole errechnet. Wider erwartend zeigte sich auch hier lediglich bei den GCKO-Tieren eine erhöhte Aortensteifigkeit. Die PWV in diesen Tieren war im Vergleich zu den SMC-GCKO- und Kontroll-Tieren beinahe verdoppelt (siehe Abb. 21). Allerdings ist die PWV nicht nur abhängig von der Kontraktionsfähigkeit des Herzens und der Elastizität des Gefäßes, sondern vor allem von dessen Durchmesser. Die ausschließlich in GCKO-Tieren auftretende PWV-Erhöhung, könnte auch mit dem reduzierten Aorten-Durchmesser dieser Mäuse erklärt werden (siehe Abb. 22). Bei gleichem Blutdruck und gleicher Ejektionsfraktion, aber kleinerem Gefäß-Durchmesser erhöht sich die PWV (Gesetz von Hagen-Poiseulles). In SMC-GCKO-Tieren ist der Durchmesser im Vergleich zu den Kontroll-Tieren nicht reduziert und möglicherweise auch deshalb die PWV nicht erhöht. Jedoch zeigten die SMC-GCKO-Tiere auch keine erhöhte Aortensteifigkeit im Spannungs-Dehnungs-Diagramm. Als mögliche Begründung für die veränderte Dehnbarkeit der GCKO-Aorten wäre eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Gefäßmatrix (ECM) denkbar gewesen. Für die Elastizität der Gefäße sind hauptsächlich die ECM-Proteine Elastin und Kollagen verantwortlich. Kollagen verleiht den Gefäßen ihre Zugfestigkeit, während Elastin für die Dehnbarkeit verantwortlich ist. Die Gefäßsteifigkeit kann somit sowohl durch eine vermehrte Kollagen- als auch eine verminderte Elastin-Expression bedingt werden. Wider erwartend waren beide Proteine in den GCKO-Aorten im Vergleich zu den WT-Tieren unverändert (siehe Abb. 23). Eine erhöhte Aortensteifigkeit ist charakterisiert durch den Verlust ihrer Windkesselfunktion. Betrachtet man die Struktur der Aorten (siehe Abb. 24 und 25), so fällt auf, dass die Struktur der "elastic lamellae" (EL) in den GCKO-Aorten verändert ist. Während die EL der WT-Aorten eine große Anzahl an Windungen aufweisen, besitzen sie in den GCKO-Tieren viele gerade Abschnitte und scheinen näher zusammen zu liegen. Durch die Reduzierung der Windungen und der Kompression der GCKO-Aorta, geht der Windkesseleffekt des Gefäßes verloren, es kann sich weniger stark dehnen und somit nicht mehr den zyklisch-pulsatilen in einen kontinuierlichen-phasischen Blutfluss umwandeln. Dies führt zu einer Zunahme der Pulswellengeschwindigkeit, wodurch es zu einem erhöhten Pulsdruck und letztlich zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks kommt. Somit scheint in den GCKO-Tieren der reduzierte Durchmesser und die veränderte EL-Struktur verantwortlich für die Steifigkeit der Aorta zu sein und damit den erhöhten Blutdruck zu bedingen. Die SMC-GCKO-Tiere hingegen zeigen keine Durchmesser- oder EL-Veränderung und weisen passend dazu auch keine erhöhte Aortensteifigkeit auf. Anhand dieser Datenlage kann nicht erklärt werden, wodurch der erhöhte systolische Blutdruck in den SMC-GCKO-Tieren entsteht und warum trotz der gleichen Blutdruckerhöhung lediglich die GCKO-und nicht die SMC-GCKO-Tiere steifere Gefäße und eine veränderte Gefäßstruktur aufweisen. Einige Hypothesen zur Erklärung dieser Diskrepanz sollen im Folgenden aufgestellt werden:

Ein äußerst wichtiger Unterschied zwischen den GCKO- und SMC-GCKO-Mäusen ist der Zeitpunkt der NO-GC-Deletion. Während diese in GCKO-Tieren während der Ontogenese stattfindet, wird sie in SMC-GCKO-Tieren erst im Alter von 6-8 Wochen durch Injektion von Tamoxifen induziert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Mäuse adult und die Ontogenese abgeschlossen. Weitere 50 Tage später ist die NO-GC sowohl funktionell ausgeschaltet, als auch auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar. Der Blutdruck hingegen steigt bereits 10 Tage nach Induktion der NO-GC-Deletion an und erreicht an Tag 50 sein Maximum. Möglicherweise können die SMC-GCKO-Tiere diese verhältnismäßig schnelle hämodynamische Veränderung nicht durch Anpassungsmechanismen, wie die Bildung neuer Kapillaren, ausgleichen. Erste Beobachtungen einer verminderten Angio- und Arteriogenese in SMC-GCKO-Tieren wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits gemacht (Bettaga et al., 2015). Die GCKO-Tiere hingegen können eventuell in ihrer Entwicklungsphase bis zum adulten Tier die Wachstums- und Regenerationsfähigkeit nutzen, um zusätzliche Gefäße auszubilden und so den Blutdruck trotz steifer Gefäße relativ niedrig halten.

Denkbar ist auch, dass die Blutdruckerhöhung um 30 mmHg in beiden KO-Mauslinien, trotz unterschiedlicher Mechanismen, zufällig den gleichen Wert hat. In GCKO-Tieren könnte dies durch die steiferen Gefäße bedingt sein, wohingegen in SMC-GCKO-Tieren eine Veränderung der Gefäße in der Peripherie als mögliche Ursache in Frage kommt.

Ein weiterer Grund könnte eine veränderte Regulation des Tonus der Widerstandsgefäße sein. Viele verschiedene Mechanismen, wie z.B. die myogene Aktivität der Schrittmacherzellen, die im Blut zirkulierende Hormone oder die Erregungsübertragung aus Gefäßnerven, greifen in das Wechselspiel von Relaxation und Kontraktion ein. In den SMC-GCKO-Tieren könnten diese Mechanismen im Vergleich zu den GCKO-Tieren verändert sein, was bei ihnen zu einer reduzierten Vasodilatation der kleinen Gefäße und somit zu einem erhöhten peripheren Widerstand führen könnte.

Diese Hypothesen können allerdings nicht abschließend bewiesen werden, da der Einfluss der oben beschriebenen Parameter auf die Regulation des Blutdrucks unklar ist. Um eine abschließende Erklärung für den Unterschied zwischen GCKO- und SMC-GCKO-Mäusen zu finden, sollten in weiteren Untersuchungen die kleinen Gefäße der Peripherie untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die NO/cGMP-vermittelte Signalkaskade ist im vaskulären System entscheidend an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Innerhalb der Kaskade nimmt die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) eine Schlüsselfunktion als wichtigster Rezeptor für das Signalmolekül Stickstoffmonoxids (NO) ein. NO wird endogen von verschiedenen Isoformen der NO-Synthase produziert. Die Bindung von NO an die NO-GC führt zur Produktion des sekundären Botenstoffs cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieser Botenstoff aktiviert verschiedene Effektor-Moleküle und bewirkt letztlich eine Relaxation der glatten Muskulatur. Ein weiterer sekundärer Botenstoff, das Signalmolekül cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), ist ebenfalls an der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur und dadurch an der Blutdruckregulation beteiligt. Unterschiedliche Phosphodiesterasen (PDE) bauen die sekundären Botenstoffe ab und beenden dadurch die Signalkaskaden. Die PDE3 spielt hierbei eine besondere Rolle, da sie eine gemischte Substratspezifität besitzt. Um den Einfluss der NO-GC auf das kardiovaskuläre System zu untersuchen, wurden NO-GC Knockout(KO)-Mäuse mit globaler (GCKO) oder Glattmuskel-spezifischer (SMC-GCKO) Deletion der NO-GC generiert.

Um das Zusammenspiel von cAMP und cGMP näher zu beleuchten, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die PDE3 genauer untersucht. Im Gefäßsystem wird lediglich die PDE3A und nicht die PDE3B exprimiert. Die Aorten von GCKO- und SMC-GCKO-Tieren reagieren sensitiver auf PDE3A-Blockade als die Kontroll-Tiere. Auch die akute Blockade der NO-GC führt zu diesem Sensitivitätseffekt. Die PDE3A ist in Folge der NO-GC-Deletion sowohl in ihrer Expression, als auch ihrer Aktivität um die Hälfte reduziert. Dies dient vermutlich kompensatorisch dazu, das cAMP-Signal weitgehend zu erhalten und so eine cAMP-induzierte Relaxation der Gefäße zu gewährleisten. Ohne Rückkopplung zwischen den beiden Signalwegen käme es vermutlich zu weiteren negativen Konsequenzen für das Herz-Kreislaufsystem. Diese Daten weisen auf eine direkte Regulation der PDE3 in glatten Muskelzellen durch die NO/cGMP-Signalkaskade und einen PDE3-vermittelten cAMP/cGMP-Crosstalk hin. Der genaue Mechanismus dieser Expressionsregulation ist noch unklar. Denkbar wäre eine cGMP-vermittelte Transkriptionsregulation oder eine Modulation der Translation der PDE3A.

Der Verlust der NO-GC führt in GCKO- und SMC-GCKO-Mäusen zu einem erhöhten systolischen Blutdruck von ~30 mmHg. Bei der Entwicklung der arteriellen Hypertonie könnte eine erhöhte Aortensteifigkeit beteiligt sein, die im zweiten Teil dieser Arbeit

näher untersucht wurde. In GCKO-Mäusen ist die aortale Steifigkeit und daraus resultierend die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) deutlich erhöht. Die Steigerung der PWV wird in den GCKO-Tieren zusätzlich durch den verminderten Aorten-Durchmesser bedingt. Außerdem weisen die Aorten dieser Tiere eine veränderte Wandstruktur auf, die zu einer Verminderung der aortalen Windkesselfunktion führt. Diese Veränderungen könnten die Blutdruckerhöhung in GCKO-Mäusen erklären. In SMC-GCKO-Tieren tritt keine dieser Gefäß-Modifikationen auf. Eine Aortensteifigkeit als mögliche Ursache für den erhöhten systolischen Blutdruck in den SMC-GCKO-Tieren kann somit ausgeschlossen werden. Zur Aufklärung müssen weitere Versuche zum Aufbau der Gefäßwände und zur Bestimmung des peripheren Widerstands gemacht werden. Auch der Einfluss anderer Zelltypen, wie z.B. Perizyten oder Fibroblasten, auf die Blutdruckregulation sollte untersucht werden.

7 Summary

The NO/cGMP-mediated signaling cascade is crucially involved in the regulation of blood pressure. Within the cascade, NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC) plays a key role as the most important receptor for the signaling molecule nitric oxide (NO).

NO is endogenously produced by three different isoforms of NO synthase. Binding of NO to NO-GC stimulates the production of the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP). cGMP, in turn, activates various effector molecules, finally leading to smooth muscle relaxation. Another second messenger, the signalling molecule cyclic adenosine monophosphate (cAMP), also participates in the regulation of smooth muscle tone and is thus also involved in the regulation of blood pressure. Phosphodiesterases (PDE) degrade cyclic nucleotides thereby ending their signalling. In order to investigate the effect of NO-GC on the cardiovascular system, mice with global (GCKO) or smooth muscle-specific (SMC-GCKO) deletion of NO-GC have been generated.

To shed light into the interplay of cAMP and cGMP, PDE3 was studied in the first part of this thesis. PDE3 plays a special role in cGMP/cAMP crosstalk based on its mixed substrate specificity. From the two PDE3 isoenzymes (PDE3A and PDE3B), only PDE3A is expressed in the aorta. The aortas of GCKO- and SMC-GCKO animals are more sensitive to PDE3A inhibition than those from control animals. The acute blockade of NO-GC using ODQ also leads to this sensitivity effect. As a result of NO-GC deletion, PDE3A expression and activity are reduced by approx. 50%. This is probably a

compensatory response in order to maintain functional cAMP signalling and to guarantee cAMP-induced relaxation of blood vessels. These results indicate a direct regulation of PDE3A in smooth muscle cells by the NO/cGMP-signalling cascade and a PDE3-mediated cAMP/cGMP crosstalk. The exact mechanism how NO-GC/cGMP regulates PDE3A expression remains unclear; conceivable options are a cGMP-mediated regulation of transcription or a modulation of PDE3A translation.

Loss of NO-GC in GCKO and SMC-GCKO mice leads to an elevated systolic blood pressure by around 30 mmHg. In the second part of this thesis, stiffness of aortae from these KO animals was examined. In GCKO mice, the pulse wave velocity (PWV) was significantly faster than in control animals indicating an increased aortic stiffness. The increase in PWV in GCKO animals is likely to be explained by a reduced aortic diameter. Even though elastin and collagen content were unchanged, the aortas of these animals have an altered wall structure. SMC-GCKO animals show neither an increase in PWV nor morphological changes of the aorta. Thus, an increased aortic stiffness can be excluded as cause for the elevated systolic blood pressure in GCKO animals.

8 Literaturverzeichnis

- Ahlner J, Andersson RG, Torfgard K & Axelsson KL. (1991). Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacological reviews* **43**, 351-423.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P & Toro L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K+ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *The Journal of biological chemistry* **273**, 32950-32956.
- Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L & Lompre AM. (1994). In situ mRNA distribution of sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms during ontogeny in the rat. *Journal of molecular and cellular cardiology* **26**, 539-550.
- Ashman DF, Lipton R, Melicow MM & Price TD. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochemical and biophysical research communications* **11**, 330-334.
- Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM & Dalkara T. (2016). What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 451-455.
- Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, van Bodegom JW & Bruining HA. (1998). Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Critical care medicine* **26**, 660-667.
- Baim DS, McDowell AV, Cherniles J, Monrad ES, Parker JA, Edelson J, Braunwald E & Grossman W. (1983). Evaluation of a new bipyridine inotropic agent--milrinone-in patients with severe congestive heart failure. *The New England journal of medicine* **309**, 748-756.
- Begum N, Hockman S & Manganiello VC. (2011). Phosphodiesterase 3A (PDE3A) deletion suppresses proliferation of cultured murine vascular smooth muscle cells (VSMCs) via inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling and alterations in critical cell cycle regulatory proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**, 26238-26249.
- Bender AT & Beavo JA. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* **58**, 488-520.
- Bettaga N, Jager R, Dunnes S, Groneberg D & Friebe A. (2015). Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice. *Angiogenesis* **18**, 245-254.
- Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V & Hofmann F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3505-3509.
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A & Hofmann F. (1999). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **135**, 151-171.
- Bohme E, Jung R & Mechler I. (1974). Guanylate cyclase in human platelets. *Methods in enzymology* **38**, 199-202.
- Bootman MD, Berridge MJ & Roderick HL. (2002). Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7320-7322.

- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G & Silva AJ. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**, 59-68.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT & Aldrich RW. (2000). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**, 870-876.
- Brooke BS, Bayes-Genis A & Li DY. (2003). New insights into elastin and vascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* **13**, 176-181.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH & Valtschanoff JG. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 8961-8970.
- Busch CJ, Graveline AR, Jiramongkolchai K, Liu H, Sanchez LS & Bloch KD. (2010). Phosphodiesterase 3A expression is modulated by nitric oxide in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **61**, 663-669.
- Butcher RW & Sutherland EW. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *The Journal of biological chemistry* 237, 1244-1250.
- Capecchi MR. (1994). Targeted gene replacement. Scientific American 270, 52-59.
- Charbonneau H, Beier N, Walsh KA & Beavo JA. (1986). Identification of a conserved domain among cyclic nucleotide phosphodiesterases from diverse species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 9308-9312.
- Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Hess DT & Stamler JS. (2005). An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12159-12164.
- Chien S. (2007). Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1209-1224.
- Cohn JN. (2006). Arterial stiffness, vascular disease, and risk of cardiovascular events. *Circulation* **113**, 601-603.
- Dai X & Faber JE. (2010). Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circulation research* **106**, 1870-1881.
- Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D & Friebe A. (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **8**, 1343-1352.
- Davies PF. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological reviews* **75**, 519-560.

- Davis MJ. (1993). Myogenic response gradient in an arteriolar network. *The American journal of physiology* **264**, H2168-2179.
- Davis MJ, Ferrer PN & Gore RW. (1986). Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *The American journal of physiology* **250**, H291-303.
- Davis MJ & Hill MA. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological reviews* **79**, 387-423.
- Denninger JW & Marletta MA. (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta* **1411**, 334-350.
- Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC & Yan C. (2005). Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* **111**, 2469-2476.
- Eisenberg E & Levanon EY. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in genetics : TIG* **29**, 569-574.
- Fesenko EE, Kolesnikov SS & Lyubarsky AL. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I & Kleinert H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* **23**, 1121-1131.
- Forstermann U & Sessa WC. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* **33**, 829-837, 837a-837d.
- Francis SH & Corbin JD. (1999). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci* **36**, 275-328.
- Francis SH, Turko IV & Corbin JD. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **65**, 1-52.
- Friebe A & Koesling D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research* **93**, 96-105.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A & Koesling D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7699-7704.
- Frings S, Seifert R, Godde M & Kaupp UB. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**, 169-179.
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B & Keef KD. (1999). Cyclic GMPdependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *The Journal of biological chemistry* 274, 10927-10935.
- Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K & Mayer B. (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Molecular pharmacology* **48**, 184-188.

- Gerzer R, Bohme E, Hofmann F & Schultz G. (1981a). Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS letters* **132**, 71-74.
- Gerzer R, Hofmann F & Schultz G. (1981b). Purification of a soluble, sodiumnitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *European journal* of biochemistry / FEBS **116**, 479-486.
- Groneberg D, Konig P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D & Friebe A. (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation* **121**, 401-409.
- Groneberg D, Lies B, Konig P, Jager R & Friebe A. (2013). Preserved fertility despite erectile dysfunction in mice lacking the nitric oxide receptor. *J Physiol* **591**, 491-502.
- Guirguis E, Hockman S, Chung YW, Ahmad F, Gavrilova O, Raghavachari N, Yang Y, Niu G, Chen X, Yu ZX, Liu S, Degerman E & Manganiello V. (2013). A role for phosphodiesterase 3B in acquisition of brown fat characteristics by white adipose tissue in male mice. *Endocrinology* **154**, 3152-3167.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M & Attwell D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55-60.
- Hambleton R, Krall J, Tikishvili E, Honeggar M, Ahmad F, Manganiello VC & Movsesian MA. (2005). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *The Journal of biological chemistry* **280**, 39168-39174.
- Hanoune J & Defer N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual* review of pharmacology and toxicology **41**, 145-174.
- Harper JF & Brooker G. (1975). Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *Journal of cyclic nucleotide research* **1**, 207-218.
- Harrison SA, Chang ML & Beavo JA. (1986). Differential inhibition of cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes by cardiotonic drugs. *Circulation* **73**, lii109-116.
- Haslam RJ, Davidson MM, Davies T, Lynham JA & McClenaghan MD. (1978). Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Advances in cyclic nucleotide research* **9**, 533-552.
- Hennersdorf MG & Strauer BE. (2007). [The heart in hypertension]. *Der Internist* **48**, 236-245.
- Herold V, Parczyk M, Morchel P, Ziener CH, Klug G, Bauer WR, Rommel E & Jakob PM. (2009). In vivo measurement of local aortic pulse-wave velocity in mice with MR microscopy at 17.6 Tesla. *Magn Reson Med* **61**, 1293-1299.
- Hidaka H, Hayashi H, Kohri H, Kimura Y, Hosokawa T, Igawa T & Saitoh Y. (1979). Selective inhibitor of platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase, cilostamide, inhibits platelet aggregation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **211**, 26-30.
- Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T & Mikoshiba K. (2005). Amplification of Ca2+ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *The Journal of biological chemistry* **280**, 11723-11730.

- Hofmann F, Biel M & Kaupp UB. (2005). International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. *Pharmacological reviews* **57**, 455-462.
- Houdebine LM. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **360,** 163-202.
- Houslay M. (2015). Hypertension linked to PDE3A activation. *Nature genetics* **47**, 562-563.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA & Fishman MC. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-242.
- Hubert F, Belacel-Ouari M, Manoury B, Zhai K, Domergue-Dupont V, Mateo P, Joubert F, Fischmeister R & Leblais V. (2014). Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol* **171**, 5361-5375.
- Hum D, Besnard S, Sanchez R, Devost D, Gossard F, Hamet P & Tremblay J. (2004). Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* **43**, 1270-1278.
- Hunter WM & Greenwood FC. (1964). A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *The Biochemical journal* **91**, 43-56.
- Ignarro LJ. (1990). Haem-Dependent Activation of Guanylate Cyclase and Cyclic GMP Formation by Endogenous Nitric Oxide: A Unique Transduction Mechanism for Transcellular Signaling. *Pharmacology & Toxicology* **67**, 1-7.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 9265-9269.
- Jager R, Groneberg D, Lies B, Bettaga N, Kummel M & Friebe A. (2013). Radioimmunoassay for the quantification of cGMP levels in cells and tissues. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **1020,** 63-72.
- Jain RK. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* 9, 685-693.
- Junqueira LC, Cossermelli W & Brentani R. (1978). Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum histologicum Japonicum* = *Nihon soshikigaku kiroku* **41**, 267-274.
- Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS & Mitchell GF. (2012). Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *Jama* **308**, 875-881.
- Kanlop N, Chattipakorn S & Chattipakorn N. (2011). Effects of cilostazol in the heart. Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md) **12**, 88-95.
- Kantor DB, Lanzrein M, Stary SJ, Sandoval GM, Smith WB, Sullivan BM, Davidson N & Schuman EM. (1996). A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science (New York, NY)* **274**, 1744-1748.
- Kaupp UB & Seifert R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews* 82, 769-824.

- Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G & Offermanns S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *The Journal of cell biology* **144**, 745-754.
- Klatt P, Schmidt K & Mayer B. (1992). Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *The Biochemical journal* **288 (Pt 1),** 15-17.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laher I & Bevan JA. (1987). Protein kinase C activation selectively augments a stretchinduced, calcium-dependent tone in vascular smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **242**, 566-572.
- Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B & Boutouyrie P. (2003). Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* **34**, 1203-1206.
- Lies B, Groneberg D, Gambaryan S & Friebe A. (2013). Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* **170**, 317-327.
- Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM & Moncada S. (1990). Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **144,** 4794-4797.
- Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA & Cornwell TL. (1995). cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* **34**, 305-322.
- Loesch A & Burnstock G. (1995). Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. *Cell and tissue research* **279**, 475-483.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U & De Jonge HR. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in biochemical sciences* **22**, 307-312.
- London GM. (1997). Large arteries haemodynamics: conduit versus cushioning function. Blood pressure Supplement **2**, 48-51.
- Lu YF, Kandel ER & Hawkins RD. (1999). Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 10250-10261.
- Maass PG, Aydin A, Luft FC, Schachterle C, Weise A, Stricker S, Lindschau C, Vaegler M, Qadri F, Toka HR, Schulz H, Krawitz PM, Parkhomchuk D, Hecht J, Hollfinger I, Wefeld-Neuenfeld Y, Bartels-Klein E, Muhl A, Kann M, Schuster H, Chitayat D, Bialer MG, Wienker TF, Ott J, Rittscher K, Liehr T, Jordan J, Plessis G, Tank J, Mai K, Naraghi R, Hodge R, Hopp M, Hattenbach LO, Busjahn A, Rauch A, Vandeput F, Gong M, Ruschendorf F, Hubner N, Haller H, Mundlos S, Bilginturan N, Movsesian MA, Klussmann E, Toka O & Bahring S. (2015). PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nature genetics* 47, 647-653.
- Martel G, Hamet P & Tremblay J. (2010). GREBP, a cGMP-response element-binding protein repressing the transcription of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1/GCA). *The Journal of biological chemistry* **285**, 20926-20939.

- Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M & Manganiello V. (2004). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *The Journal of clinical investigation* **114**, 196-205.
- Mayer B, John M & Bohme E. (1990). Purification of a Ca2+/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS letters* **277**, 215-219.
- Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL & Kadowitz PJ. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADPinduced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**, 946-955.
- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G & Koesling D. (2003). Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cellular signalling* **15**, 189-195.
- Metzger D & Feil R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current opinion in biotechnology* **10**, 470-476.
- Michel JB, Li Z & Lacolley P. (2012). Smooth muscle cells and vascular diseases. *Cardiovasc Res* **95**, 135-137.
- Montminy MR, Gonzalez GA & Yamamoto KK. (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends in neurosciences* **13**, 184-188.
- Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC & Huang PL. (1998). Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *The Journal of clinical investigation* **101**, 1225-1232.
- Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F & Koesling D. (2003). Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *The Journal of cell biology* **160**, 719-727.
- Mullis KB & Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335-350.
- Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S & Kimura H. (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Advances in cyclic nucleotide research* **9**, 145-158.
- Murthy KS. (2006). Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. Annual review of physiology **68**, 345-374.
- Naik JS, Earley S, Resta TC & Walker BR. (2005). Pressure-induced smooth muscle cell depolarization in pulmonary arteries from control and chronically hypoxic rats does not cause myogenic vasoconstriction. *Journal of applied physiology* (*Bethesda, Md : 1985*) **98**, 1119-1124.
- Nakamura T & Gold GH. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**, 442-444.
- Narayanan J, Imig M, Roman RJ & Harder DR. (1994). Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol. *The American journal of physiology* **266**, H1840-1845.
- Nathan C & Xie QW. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.

- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM & Snyder SH. (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* **378**, 383-386.
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML & et al. (1991). Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England journal of medicine* **325**, 1468-1475.
- Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R & Hofmann F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal* **17**, 3045-3051.
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS & Sessa WC. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of clinical investigation* **101**, 731-736.
- Russwurm M, Behrends S, Harteneck C & Koesling D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *The Biochemical journal* **335 (Pt 1),** 125-130.
- Russwurm M, Wittau N & Koesling D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 44647-44652.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE & Beavo JA. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation research* **93**, 280-291.
- Safar ME & Lacolley P. (2007). Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H1-7.
- Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH, Jr. & Erlich HA. (1988a). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *The New England journal of medicine* **319**, 537-541.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA. (1988b). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)* **239**, 487-491.
- Sanders KM, Ward SM, Thornbury KD, Dalziel HH, Westfall DP & Carl A. (1992). Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Japanese journal of pharmacology* **58 Suppl 2**, 220p-225p.
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P & Hofmann F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circulation research* **87**, 825-830.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F & Ruth P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase lbeta. *Nature* 404, 197-201.

Schmidt HH & Walter U. (1994). NO at work. Cell 78, 919-925.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D & Mayer B. (1996). Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Molecular pharmacology* **50**, 1-5.
- Schubert R, Lidington D & Bolz SS. (2008). The emerging role of Ca2+ sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **77**, 8-18.
- Schultz K, Schultz K & Schultz G. (1977). Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* **265**, 750-751.
- Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E & Manganiello V. (2001). Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **66**, 241-277.
- Shull GE. (2000). Gene knockout studies of Ca2+-transporting ATPases. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 5284-5290.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological reviews* **83**, 1325-1358.
- Son H, Lu YF, Zhuo M, Arancio O, Kandel ER & Hawkins RD. (1998). The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **5**, 231-245.
- Stegemann H & Stalder K. (1967). Determination of hydroxyproline. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **18**, 267-273.
- Steiner AL, Wehmann RE, Parker CW & Kipnis DM. (1972). Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Advances in cyclic nucleotide research* 2, 51-61.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF & Nathan CF. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7773-7777.
- Sutherland EW & Rall TW. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *The Journal of biological chemistry* **232**, 1077-1091.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR & Alexander RW. (1998). Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *The Journal of biological chemistry* **273**, 19772-19777.
- Van Vliet BN, Chafe LL & Montani JP. (2003). Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57BI/6J control mice. *J Physiol* **549**, 313-325.
- Vandeput F, Krall J, Ockaili R, Salloum FN, Florio V, Corbin JD, Francis SH, Kukreja RC & Movsesian MA. (2009). cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil

in normal and failing human and mouse myocardium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **330**, 884-891.

- Vulliemoz S, Stergiopulos N & Meuli R. (2002). Estimation of local aortic elastic properties with MRI. *Magn Reson Med* **47**, 649-654.
- Wagenseil JE & Mecham RP. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews* **89**, 957-989.
- Wagner AH, Hildebrandt A, Baumgarten S, Jungmann A, Muller OJ, Sharov VS, Schoneich C & Hecker M. (2011). Tyrosine nitration limits stretch-induced CD40 expression and disconnects CD40 signaling in human endothelial cells. *Blood* **118**, 3734-3742.
- Waldman SA, Rapoport RM & Murad F. (1984). Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *The Journal of biological chemistry* **259**, 14332-14334.
- Walter U & Gambaryan S. (2004). Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood* **104**, 2609.
- Wang X, Huang G, Luo X, Penninger JM & Muallem S. (2004). Role of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in Ca(2+) oscillations and adaptation of Ca(2+) signaling to reduce excitability of RGS2-/- cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 41642-41649.
- Webb RC. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education* **27**, 201-206.
- Wechsler J, Choi YH, Krall J, Ahmad F, Manganiello VC & Movsesian MA. (2002). Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **277**, 38072-38078.
- Winquist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F & Rapoport RM. (1984). Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**, 7661-7664.
- Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS & Offermanns S. (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature medicine* 14, 64-68.
- Woessner JF, Jr. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of biochemistry and biophysics* **93**, 440-447.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ & Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248.
- Yeon DS, Kim JS, Ahn DS, Kwon SC, Kang BS, Morgan KG & Lee YH. (2002). Role of protein kinase C- or RhoA-induced Ca(2+) sensitization in stretch-induced myogenic tone. *Cardiovasc Res* 53, 431-438.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA & Catterall WA. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological reviews* **57**, 387-395.

- Zaccolo M & Movsesian MA. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circulation research* **100**, 1569-1578.
- Zhao Y, Brandish PE, Di Valentin M, Schelvis JP, Babcock GT & Marletta MA. (2000). Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* **39**, 10848-10854.
- Zhu G, Groneberg D, Sikka G, Hori D, Ranek MJ, Nakamura T, Takimoto E, Paolocci N, Berkowitz DE, Friebe A & Kass DA. (2015). Soluble guanylate cyclase is required for systemic vasodilation but not positive inotropy induced by nitroxyl in the mouse. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 65, 385-392.

Publikationen

- Straubinger J, Schöttle V, Bork N, Subramanian H, Dünnes S, Russwurm M, Gawaz M, Friebe A, Nemer M, Nikolaev VO, Lukowski R. (2015)
 Sildenafil Does Not Prevent Heart Hypertrophy and Fibrosis Induced by Cardiomyocyte Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 354 (3), 406-416.
- Bettaga N, Jäger R, Dünnes S, Groneberg D, Friebe A. (2015). Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice. *Angiogenesis.* 18 (3), 245-254.
- Dünnes S, Karlisch K, Aue A, Groneberg D, Friebe A. (2016). Role of PDE3A in cGMP/cAMP crosstalk in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase. *Eingereicht*

Abstracts

- Dünnes S., Jäger R., Friebe A. Role of phosphodiesterase 3 and cGMP/cAMP FOR 2060 Meeting, 16. - 17.02.2014, Göttingen
- Dünnes S., Groneberg D., Herold V., Jakob P., Friebe A. Vascular remodeling in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase. FOR 2060 Meeting: New Developments in Signal Transduction & cGMP Research, 18. - 20.01.2015, Rottenburg am Neckar
- Dünnes S., Groneberg D., Herold V., Jakob P., Friebe A. Arterial stiffness and collagen expression in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase. 7th International Conference on cGMP, 19. - 21.06.2015, Trier
- Friebe A., Dünnes S., Nikolaev V., Lies B., Groneberg D. Modulation of cGMP/cAMP crosstalk on the level of PDE3 in animals lacking NOsensitive guanylyl cyclase. 7th International Conference on cGMP, 19. - 21.06.2015, Trier

Dünnes S., Groneberg D., Herold V., Jakob P., Friebe A.
 Arterial stiffness and pulse wave velocity in mice lacking NO-sensitive guanylyl cyclase.
 95th Annual Meeting of the German Physiological Society, 03. - 05.03.2016, Lübeck (Vortrag)

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die durch ihre fachliche und moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. *Andreas Friebe* für die Überlassung des Dissertationsthemas und das Vertrauen in meine Arbeit. Ich bin sehr dankbar, dass mich meine Wege und meine Suche nach einer geeigneten Promotionsstelle nach Würzburg und in Dein Büro führten. Ich danke Dir für Deine stets offene Tür, Deine wertvollen Ratschläge und konstruktiven Ideen. Das alles hat mir spannende und vor allem lehrreiche Einblicke in die Wissenschaft ermöglicht.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. *Erhard Wischmeyer*, für die Bereitschaft als mein Zweitgutachter zu fungieren, bedanken. Ich danke Dir für Deine Zeit und Motivation dich mit meiner Arbeit auseinanderzusetzen.

Herrn Dr. *Volker Herold* vom Lehrstuhl für experimentelle Physik 5 der Universität Würzburg danke ich für die Erklärung und Hilfe bei den MRT-Messungen und deren Auswertung. In diesem Kontext danke ich auch *Sabine Voll*, die mir in dieser Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der AG Friebe, die mir den Alltag nicht nur durch ihre unerschütterliche Expertise, sondern auch durch ihr sonniges Gemüt versüßten: Danke, *Dieter Groneberg*, *Barbara Voußen*, *Katharina Beck*, *Annemarie Aue*, *Linda Holzer*, *Fabian Schwiering*, *Nadine Mauro* und *Noomen Bettaga*. Danke, für Eure wertvollen Ratschläge, Anregungen und Tipps, die herausragenden Diskussionen, die tolle Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Danke, liebstes Spaßlabor. Weiterhin bedanken möchte ich mich bei *Marco Abeßer*, *Benjamin Aßmus*, *Melanie Ullrich*, *Annemarie Augustin und Kai Schuh* sowie *Estefania Prentki Santos*, *Katarina Spiranec* und *Erick Miranda Laferte*. Ich danke Euch für die wunderbaren Ablenkungen, die vielen tollen & überaus lustigen Stunden und die insgesamt wunderschöne Zeit in Würzburg. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen übrigen Mitarbeitern des physiologischen Instituts für das tolle Arbeitsklima und die gesprächigen Pausen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei *Gudrun Müller* und *Regine Knitsch* ohne die ich nicht so leicht an diesen Punkt gekommen wäre. Danke Euch beiden für die tolle, manchmal nervige, sehr interessante, aufregende und überaus lustige Studienzeit und eure Freundschaft auch jetzt noch.

Ein ganz großer Dank geht an eine Handvoll außergewöhnlicher Menschen: *Annika Weigl-Strebel, Magdalena Kasper, Sarah Zimmermann* und *Anna-Maria Ebling.* Ihr begleitet mich schon mehr als mein halbes Leben und seid darin ein wesentlicher und wertvoller Bestandteil. Ihr habt mich immer wieder aufgebaut, mit mir geweint, getanzt und besonders viel gelacht. Danke meine "magic 5". Ein weiterer wichtiger und einzigartiger Lieblingsmensch, den ich niemals missen möchte, ist *Verena Ilgen.* Ich danke Dir für Deine Zuverlässigkeit, unverhohlene Ehrlichkeit, Deinen immerwährenden Zuspruch und Deinen bedingungslosen Beistand in den letzten 14 Jahren und erst recht in der letzten Zeit, die wirrer, lustiger, berührender und aufregender nicht hätte sein können. Mädels, ich bin Euch überaus dankbar und freue mich auf viele fabelhafte Jahre mit Euch. Zwei weitere tolle, liebe und wichtige Menschen habe ich auch hier treffen dürfen: *Katharina Beck* und *Estefania Prentki Santos.* Ihr seid der HIT! Ich danke Euch für Eure Offenheit, Eure Gelassenheit, Euren Humor, zusammengefasst für Eure Freundschaft. Eins habe ich mit Euch gelernt "wie man es auch dreht, am Ende zählt wir ham gelebt".

Nur auf dem Papier zuletzt möchte ich meiner gesamten tollen Familie danken. Allen voran danke ich meiner großartigen *Mama Barbara*, die mir ein echtes Vorbild ist, meiner unglaublichen und bewundernswerten Schwester *Melanie* und meiner starken und wundervollen Schwester *Nadia*. Auch meinem Neffen *Gabriel* und meiner Nichte *Elora* möchte ich Danke sagen, weil sie mich so wunderbar ablenken und aufheitern. Weiterhin danke ich meinem brillanten und liebenswerten Onkel *Andreas*. Liebste Familie, ich danke euch für Eure grenzenlose Unterstützung, Euer Verständnis, Euer Mitgefühl, Euer Vertrauen, Eure Liebe. Ihr seid die beste Familie, die man sich nur wünschen kann. Danke auch an meinen Freund *Steffen*. Ich danke Dir unendlich für Deine Geduld, Deine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, Deine Motivation, Deinen Humor, für Alles. Ich freu mich auf die Zukunft mit Dir und bin gespannt auf alles was da kommen mag.