

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Untersuchung der funktionellen Interaktion
zwischen der sarkolemmalen Calcium-ATPase
und der neuronalen NO-Synthase

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Myriam Telkamp
aus Stolberg

Würzburg, Januar 2002

Referent: Prof. Dr. L. Neyses

Korreferent: Prof. Dr. M.J. Lohse

Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2003

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
2	FRAGESTELLUNG	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Transgene Ratten	13
3.2	Zellkultur	13
3.2.1	Allgemeines	13
3.2.2	Neonatale Kardiomyozyten	14
3.2.3	N1E 115-Zellen	15
3.2.4	HEK 293-Zellen	15
3.3	Proteinextrakte	15
3.3.1	Herstellung aus Zellen	15
3.3.2	Herstellung aus Herzen	16
3.3.3	Messung nach BioRad-Methode	16
3.3.4	Western-Blot Analyse	16
3.4	NO-Bestimmung	18
3.5	Immunfluoreszenzfärbung	18
3.6	NOS-Aktivitätsmessung	19
3.7	cGMP-Bestimmung	20
3.8	Transiente Transfektion mittels Liposomen	21
3.9	Statistische Auswertung	22

4	RESULTATE	23
4.1	Nachweis von NO-Synthase in Kardiomyozyten	23
4.1.1	Western-Blot	23
4.1.2	Immunfluoreszenzbilder	24
4.2	Veränderte NO-Produktion durch PMCA-Aktivität	27
4.2.1	NO-Messung an N1E-Zellen	27
4.2.2	NOS-Aktivität von Kardiomyozyten	27
4.2.3	cGMP-Messung	29
4.2.3.1	Neonatale Ganzherzen	29
4.2.3.2	Stimulierte Kardiomyozyten	30
4.2.3.3	Transfizierte Kardiomyozyten	31
4.2.3.4	Transfizierte HEK 293-Zellen	33
5	DISKUSSION	36
5.1	NOS in Kardiomyozyten	36
5.2	Veränderte NO-Produktion durch PMCA-Aktivität	37
6	ZUSAMMENFASSUNG	42
7	LITERATURVERZEICHNIS	44
8	ANHANG	56
8.1	Abkürzungen	56
8.2	Verwendete Lösungen und Puffer	58
8.3	Materialien	61
8.4	Geräteverzeichnis	63
9	DANKSAGUNG	
10	LEBENS LAUF	

1 Einleitung

Kalzium und seine Funktion bei der Signalübertragung

Kalziumionen gehören neben Diacylglycerol, IP₃, cAMP, cGMP und NO zu den wichtigsten sekundären Botenstoffen der Signalübertragung der Zellen (Übersicht in Clapham, 1995). Sie regulieren eine Vielzahl von wichtigen Zellfunktionen, z.B. Muskel-contraktionen, Übertragung neuronaler Impulse, Sekretion verschiedener Substanzen, Wachstums- und Differenzierungsprozesse und Apoptose. Damit diese wichtigen zellulären Prozesse ablaufen können, bedarf es einer genauen Steuerung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese liegt im Ruhezustand der Zelle bei 10 – 100nM und kann nach Stimulation im Herzen auf Werte im µM-Bereich ansteigen.

Kalzium im Herzmuskel

Die Kontraktilität des Herzmuskels wird durch die zytosolische Kalziumkonzentration der Zellen gesteuert. Während der Depolarisationsphase der Zellen kommt es zu einem Kalziumeinstrom, der ein Aktionspotential auslöst, das über elektrische Signale am sarkoplasmatischen Retikulum den kontraktilem Apparat der Zelle aktiviert. Dabei strömt Kalzium über spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanäle der depolarisierten Plasmamembran ein. Diese lokale Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration induziert die Öffnung der Ryanodin-sensitiven Ca²⁺-Kanäle des als Kalziumspeicher fungierenden sarkoplasmatischen Retikulums. Das nun ins Zytosol strömende Kalzium führt zur elektromechanischen Kopplung der Herzkontraktion. Dazu bindet Kalzium an Troponin C, das über eine Konformationsänderung des Troponin/Tropomyosinkomplex die Aktivierung des kontraktilem Apparat auslöst.

Die freie zytosolische Kalziumkonzentration wird anschließend schnell auf niedrige diastolische Werte durch Kalziumrückstrom in die Kalziumspeicher und den Extrazellulärraum gebracht. Dazu stehen folgende Systeme zur Verfügung: die Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums, der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher der Plasmamembran, der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher der Mitochondrien und die Calmodulin-abhängige Kalzium-ATPase der Plasmamembran.

Im gesunden Myokard wird die bei der Depolarisation freigesetzte Menge an zytosolischem Kalzium vor jedem neuen Kontraktionszyklus wieder vollständig in den Extrazellulärraum bzw. die Kalziumspeicher transportiert. Jede Störung dieses Kalziumgleichgewichtes hat eine Veränderung der kontraktile Eigenschaften des Myokards zur Folge. Bei der Herzhypertrophie z.B. ist die Kalziumhomöostase signifikant verändert (Dhalla *et al.*, 1996). Im chronisch überlasteten und insuffizienten Myokard ist eine Dysregulation des Kalziumgleichgewichtes in der Herzmuskelzelle, die auch mit einer erhöhten Arrhythmieanfälligkeit assoziiert sein kann, ein wesentlicher Faktor für eine systolische und diastolische Funktionsstörung. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits Veränderungen in der Expression der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums, des Ryanodin-Rezeptors, der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher beschrieben (siehe Übersicht Dhalla *et al.*, 1996). Die genauen Mechanismen sind allerdings noch unklar.

Zusätzlich zur Signalfunktion von Kalzium bei der elektromechanischen Kopplung gibt es Hinweise auf eine Rolle von Kalzium bei der Wachstums- und Differenzierungsregulation von Kardiomyozyten (Goldspink und Russell, 1994; Hammes *et al.*, 1998; Molkenkin *et al.*, 1998)

Kalzium-Transportsysteme

a) Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der Plasmamembran

Dieses Kationen-Transportsystem wurde erstmals von Caroni und Mitarbeitern beschrieben (Caroni *et al.*, 1980) und von der Arbeitsgruppe um Philipson kloniert (Nicoll *et al.*, 1990). Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher befindet sich hauptsächlich in erregbarem Gewebe, wo er für das Kalziumgleichgewicht essentiell ist. Er transportiert 1 Ca^{2+} - Ion gegen 3 Na^+ -Ionen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum.

b) Die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA)

Die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums wurde von Mac Lennan erstmals aus dem Skelettmuskel von Kaninchen isoliert und kloniert (Mac Lennan *et al.*, 1985). Die SERCA ist Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängig und spielt eine wichtige Rolle bei der

Regulation der Muskelkontraktion. Im Ruhezustand reduziert das Enzym den zytosolischen Kalziumspiegel, indem es das Kalzium ins Sarkoplasmatische Retikulum pumpt.

c) Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)

Die Calmodulin-abhängige Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase wurde erstmals von Schatzmann in Erythrozyten beschrieben (Schatzmann, 1966). Die PMCA ist für den Kalziumtransport aus der Zelle verantwortlich. Das Enzym wird ubiquitär in allen eukariontischen Zellen exprimiert und ist verantwortlich für die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle. Es existieren verschiedene Isoformen des Enzyms, die auch in erregbaren Zellen wie Neuronen und Myozyten zu finden sind. Auf die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase wird näher im nächsten Abschnitt der Einleitung eingegangen.

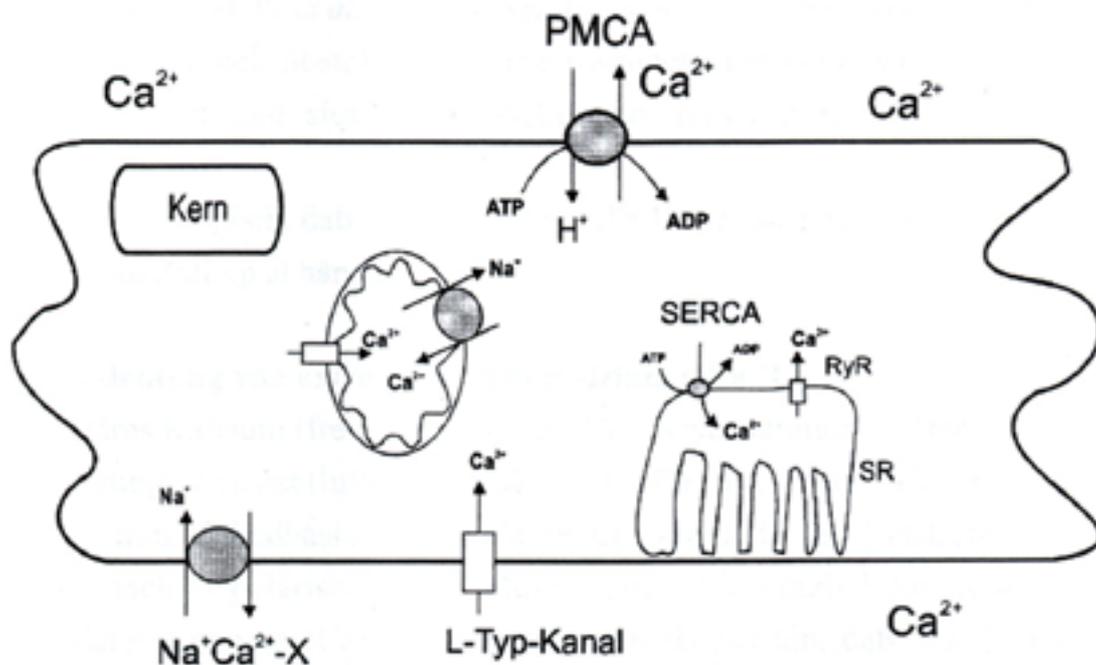


Abbildung 1: Überblick über die Ca^{2+} -Transportsysteme der Zelle

PMCA = Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -X = $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der Plasmamembran, SERCA = Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, SR = sarkoplasmatisches Retikulum, L-Typ-Kanal der Plasmamembran, der Ca^{2+} -Uniporter und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für die Mitochondrien.

Funktion und Lokalisation der PMCA

Die PMCA gehört zu den Transmembranproteinen. Sie macht nur einen geringen Anteil aus, weniger als 0,1% der Membranproteine in Erythrozyten (Strehler, 1990). Sie kommt jedoch in den meisten eukariontischen Zellen vor und ist oft das einzige Transportsystem für Kalzium in den Extrazellularraum. Das Polypeptid hat ein Molekulargewicht von 130 – 150 kDa, je nach Isoform und Splicingvariante. Die cDNA Sequenzen von vier humanen Isoformen der PMCA (Verma *et al.*, 1988; Heim *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1996; Strehler *et al.*, 1990) und vier Isoformen der Ratten-PMCA sind beschrieben (Shull und Greeb, 1988; Greeb und Shull, 1989; Keeton und Shull, 1995). Die verschiedenen Isoformen werden gewebs- und differenzierungs-spezifisch exprimiert. Die PMCA Isoformen 1 und 4 werden als „housekeeping forms“ bezeichnet, da sie fast ubiquitär exprimiert werden (Strehler, 1991). In erregbaren Zellen wie den Neuronen, Skelett- und Herzmuskelzellen kommen alle vier Isoformen vor (Carafoli und Stauffer, 1994; Hammes *et al.*, 1994). Daten von Stauffer (Stauffer *et al.*, 1994) weisen darauf hin, daß das Enzym homogen auf die Plasmamembran von quergestreiften Muskelzellen verteilt ist. Die Gruppe um Fujimoto hat die PMCA in Caveolae verschiedener Zelltypen lokalisiert (Fujimoto, 1993).

Caveolae sind Plasmamembraninvaginationen von 50-100nm (siehe Übersicht Couet *et al.*, 1997). Wichtige Strukturproteine sind die 20-22 kDa große Caveoline 1-3 (Rothberg *et al.*, 1992). In letzter Zeit wurden zahlreiche Proteine der Signaltransduktion in Caveolae lokalisiert, z.B. Rezeptoren für ANP, Muskarin m2, Bradykinin B2, „Plateletderived growth factor“ (PDGF), Insulin, Endothelin, Signalproteine wie Proteinkinase C, die Proteinkinasen ras, src, und raf, die endotheliale und neuronale NO-Synthase und Dystrophin (Übersicht Anderson, 1998). Damit steigt die Bedeutung der Caveolae als wichtiger Ort bei der Signaltransduktion innerhalb der Zelle. Für einige der Proteine wurde schon die funktionelle Interaktion mit Caveolin gezeigt (Übersicht Smart *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang bedeutend für die vorliegende Arbeit ist die Interaktion von endothelialer und neuronaler NO-Synthase mit Caveolin (Garcia-Cardena *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 1999).

Erste Hinweise auf eine Funktion der Caveolae bei der Herzhypertrophie lieferte die Beobachtung von Goto, daß im Myokard spontanhypertensiver Ratten eine vermehrte Zahl von Caveolae nachgewiesen wurden (Goto *et al.*, 1990).

Mehrere Faktoren regulieren die Funktion der PMCA durch Bindung an den C-terminalen Bereich der Pumpe, z.B. Proteinkinase-A-Phosphorylierung (Neyses *et al.*, 1985), Proteinkinase-C-Phosphorylierung (Smallwood *et al.*, 1988), G-Kinase-Phosphorylierung (Yoshida *et al.*, 1991) oder Casein-Kinase II (Carafoli, 1994). Der wichtigste Aktivator ist das Calmodulin, das am C-terminalen Ende der PMCA bindet, und durch eine Konformationsänderung des Enzyms die Pumpe aktiviert (Verma *et al.*, 1994). Diese Calmodulin-Bindungsstelle wird als autoinhibitorische Domäne bezeichnet.

Aufgrund der hohen Kalziumaffinität der PMCA dient sie hauptsächlich der Feinregulation der intrazellulären Kalziumkonzentration im μM -Bereich und der Erhaltung des basalen intrazellulären Kalziumlevels der Zelle (Carafoli, 1994; Montheith und Roufogalis, 1995). Die relativ niedrige Transport-Kapazität der PMCA für Kalziumionen - im Vergleich zum $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher - deutet ebenfalls darauf hin, daß die PMCA eine eher untergeordnete Rolle bei der Reduktion der freien Kalziumkonzentration in Zellen spielt, die den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder die SERCA exprimieren (Bassani *et al.*, 1994). Dies sind vor allem Herzmuskelzellen und Neuronen. In Zellen, in denen die PMCA das einzige Kalziumexportsystem darstellt, wie z.B. Erythrozyten, spielt die PMCA eine bedeutende Rolle in der Reduktion der freien Kalziumkonzentration der Zellen.

Eine weitere wichtige Bedeutung hat die PMCA bei der Signaltransduktion. Kürzlich wurde der Einfluß der PMCA auf das Wachstumsverhalten von Zellen gezeigt. Eine Überexpression der PMCA in Skelettmuskelzellen beschleunigt den Differenzierungsprozeß dieser Zellen, wie in unserer Arbeitsgruppe schon früher gezeigt werden konnte (Hammes *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu gaben Guerini und Mitarbeiter Hinweise auf einen wachstumshemmenden Effekt von hPMCA4Cl überexprimierenden CHO-Zellen (Guerini *et al.*, 1995). Die Arbeitsgruppe um Rosenberg beschrieb Resultate, in denen die Überexpression von PMCA 1 in glatten Muskelzellen die intrazelluläre Kalziumkonzentration senkt und dadurch die

Wachstumsrate der Zellen signifikant verlangsamt (Husain *et al.*, 1997). An neonatalen Kardiomyozyten aus transgenen hPMCA 4b-überexprimierenden Ratten konnte eine erhöhte Proteinsyntheserate im Vergleich zu wildtypischen Kontrollzellen als Antwort auf Inkubation mit verschiedenen Wachstumsstimuli gezeigt werden (Hammes *et al.*, 1998).

In unserer Arbeitsgruppe gibt es Hinweise auf die Verstärkung des Effektes von hypertrophen Stimuli durch den NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methylester) in Kontrollzellen im Gegensatz zu PMCA-überexprimierenden Zellen (unveröffentlichte Ergebnisse). Dies legt die Vermutung einer negativen Kontrollfunktion von NOS auf hypertrophe Stimuli im Myokard nahe, die in PMCA-überexprimierenden Zellen nicht mehr besteht. Diese Ergebnisse machen eine Regulation der NO-Synthase durch die PMCA wahrscheinlich. Kuo und Mitarbeiter beschrieben bereits 1987 eine verminderte Aktivität der PMCA im Myokard von Hamstern mit Kardiomyopathie (Kuo *et al.*, 1987).

Funktion und Lokalisation der NO-Synthase (NOS)

Die NO-Synthase ist ein Enzym, welches die Aminosäure L-Arginin unter Stickstoffmonoxid (NO)-abgabe zu L-Citrullin spaltet. Dazu werden Sauerstoff, NADPH und Calmodulin als Cosubstrate sowie verschiedene andere Redox-Cofaktoren wie Häm, FAD, FMN und Tetrahydrobiopterin benötigt (Michel and Feron, 1997). Das dabei entstehende NO, ein kurzlebige Molekül, hat eine wichtige Bedeutung in der Signaltransduktion der Zellen, ebenso wie bei der Interaktion mit Nachbarzellen und mit anderen Molekülen (Stamler, 1994). Bisher wurden drei Isoformen des Enzyms NO-Synthase gefunden. Sie sind nach den Geweben benannt, in denen sie zuerst beschrieben wurden: nNOS – neuronale NOS – NOS1 - wurde aus Nervengewebe extrahiert (Bredt and Snyder, 1990; Schmidt *et al.*, 1991), ist aber inzwischen auch als wichtiges Enzym in verschiedenen Geweben (Skelettmuskel, glatte Muskeln, Herz, etc.) identifiziert worden; eNOS – endotheliale NOS – NOS2 - ursprünglich in Gefäßendothelzellen gefunden, ist unter anderem auch in Kardiomyozyten, Thrombozyten, Thymus und Nervenzellen zu finden (Förstermann *et al.*, 1991); iNOS – induzierbare NOS – NOS3 - wurde zuerst in einer vom Immunsystem aktivierten Makrophagenzelllinie identifiziert. Inzwischen ist das Enzym aber in vielen anderen

humanen Zellen gefunden worden, unter anderem in Kardiomyozyten, Gliazellen und glatten Gefäßmuskelzellen (Hevel *et al.*, 1991; Yui *et al.*, 1991). Die verschiedenen NOS-Isoformen liegen in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Splicing-Varianten vor. So existiert in Neuronen eine andere nNOS- Splicing-Variante als in Skelettmuskelzellen (Silvagno *et al.*, 1996). eNOS interagiert in Endothelzellen mit anderen Caveolin-Isoformen als in Kardiomyozyten (Feron *et al.*, 1996). Alle drei Isoformen werden über eine Calmodulin-Bindung aktiviert, wobei e- und nNOS eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration zur Calmodulinbindung benötigen, im Gegensatz zu iNOS, das eine hohe Calmodulinbindungsaffinität auch bei niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentrationen besitzt. (Michel and Feron, 1997)

Über die Lokalisation von NOS herrscht noch keine Einigkeit. Bisher gibt es Publikationen, die NOS in praktisch allen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert haben. Die Gruppe um David Brecht lokalisierte nNOS im endoplasmatischen Retikulum von Nervenzellen (Xia *et al.*, 1996). Die gleiche Gruppe fand nNOS in einem Komplex mit Dystrophin des Zytoskeletes in Skelettmuskelzellen (Brenman *et al.*, 1996). Andere Gruppen identifizierten eNOS im Golgi-Apparat (Sessa *et al.*, 1995) und als Bestandteil der Caveolae der Plasmamembran (Shaul *et al.*, 1996; Feron *et al.*, 1996). Diese Komplexbindung von eNOS an das Zytoskelet ist als Mechanismus der Enzymregulation durch mechanochemische Zelloberflächenänderung bei hämodynamischem Scherstress oder Kontraktion der Kardiomyozyten denkbar. Ebenso ist noch unklar ob nNOS in Caveolae vorkommt, aber einige Faktoren deuten darauf hin. nNOS bindet über seine PDZ-Domäne an die PDZ-Domäne von $\alpha 1$ -Syntrophin, das ein Bindungspartner von Dystrophin ist (Brenman *et al.*, 1995; Hillier *et al.*, 1999).

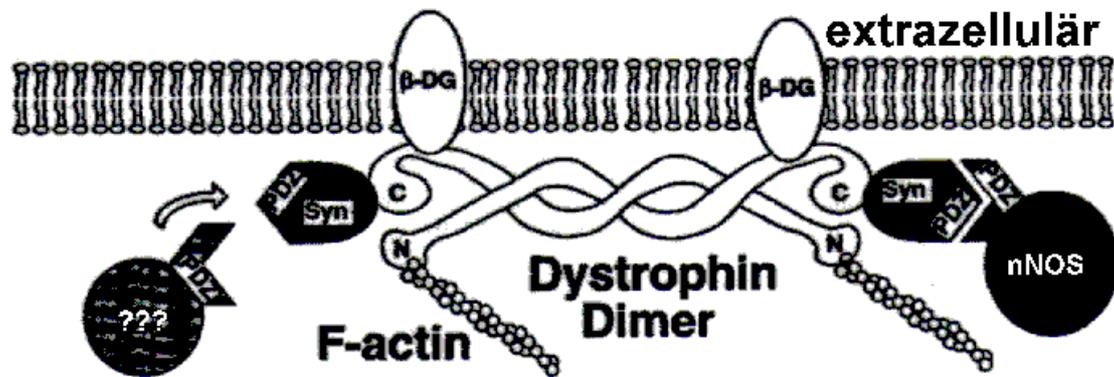


Abbildung 2: Bindung von nNOS über die PDZ-Domäne an den Syntrophin/Dystrophin-Komplex (nach Brenman *et al.*, 1996, modifiziert)

nNOS bindet direkt an Syntrophin über seine PDZ-Domäne. Syntrophin liegt im Komplex gebunden an Dystrophin vor. Die freie PDZ-Domäne eines weiteren im Komplex gebundenen Syntrophins könnte eine mögliche Bindungsstelle für einen Regulator der nNOS darstellen.

Dystrophin ist schon lange als ein in Caveolae lokalisiertes Protein bekannt. Außerdem hat die Gruppe um Thomas Michel herausgefunden, daß nNOS die gleiche Bindungssequenz besitzt, die eNOS zur Interaktion mit Caveolin befähigt und ebenso wie eNOS durch Caveolin inhibiert wird (Feron *et al.*, 1998). Dieser Interaktionseffekt ist aber durch Kalzium-/Calmodulinbindung komplett reversibel (Michel *et al.*, 1997). Kürzlich beschrieb die Gruppe um William Sessa Resultate, daß nNOS und Caveolin1 in glatten Muskelzellen und nNOS und Caveolin 3 in Skelettmuskelzellen von Hamstern kolokalisiert sind (Segal *et al.*, 1999). Dies bestätigt die Resultate der Gruppe um Richard Venema, die nNOS und Caveolin3 aus Skelettmuskelzellen der Ratte koimmunoprecipitiert hat (Venema *et al.*, 1997). Eine andere Gruppe identifizierte kürzlich nNOS mit einer Immunogoldfärbung in Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums von Kardiomyozyten (Xu *et al.*, 1999).

In Neuronen wurde nNOS außerdem in postsynaptischen Vesikeln gefunden; dies unterstreicht die Rolle des Enzyms als Neurotransmitter unterstreicht (Brenman *et al.*, 1996).

Guanylatzyklase

Die Guanylatzyklase ist eine Enzymfamilie, welche die Konversion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert. Intrazelluläres cGMP reguliert die (patho-)physiologischen Prozesse der Zelle durch Aktivierung von Proteinkinasen, durch direktes Öffnen spezieller Ionenkanäle oder durch Veränderung der intrazellulären zyklischen Nukleotidkonzentration durch Regulation der Phosphodiesterasen (Lucas *et al.*, 2000). Bisher sind folgende durch cGMP geregelte pathophysiologischen Prozesse erforscht: die Regulierung der Motilität der Gefäßmuskelzellen (Lee *et al.*, 1997), die Steuerung der Darmsekretion und Einstellung der Elektrolythomöostase der Zellen (Mann *et al.*, 1997) und die Steuerung der Phototransduktion beim Sehprozess in der Retina (Ames *et al.*, 1999). Die Enzymfamilie besteht hauptsächlich aus der schon lange bekannten im Zytosol löslichen- (Gerzer *et al.*, 1981; Kamisaki *et al.*, 1986) und der membrangebundenen Guanylatzyklase (Chang *et al.*, 1989; Schulz *et al.*, 1989), die mit verschiedenen Untereinheiten vorkommen.

Die lösliche Guanylatzyklase ist bisher der einzige definitiv akzeptierte Rezeptor für Stickstoffmonoxid in der Zelle. Die Guanylatzyklase steigert ihre Aktivität durch NO-Bindung um das 200-fache und eignet sich daher gut zum indirekten Nachweis von NO in der Zelle (Stone und Marletta, 1994). Verschiedene andere von Stickstoffmonoxid (NO) benutzte Signaltransduktionswege z.B. Aktivierung des Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanals in Gefäßmuskelzellen, Inhibition von NF-κB und Aktivierung von G-Proteinen werden noch erforscht.

2 Fragestellung

Bisher wurden im Zusammenhang mit der Calmodulin-abhängigen Kalzium-ATPase der Plasmamembran (PMCA) meist Untersuchungen über ihre Regulationsmechanismen durchgeführt. Erst in letzter Zeit wird versucht, die Funktion der PMCA in der Zelle zu klären. Trotzdem ist die funktionelle Bedeutung der PMCA vor allem in Herzmuskelzellen weiterhin ungeklärt. In unserer Arbeitsgruppe wurden Hinweise auf eine mögliche Interaktion von PMCA und NO-Synthase gefunden. In der vorliegenden Arbeit sollte diesen Hinweisen nachgegangen werden. Dazu sollte die NO-Synthase in Herzmuskelzellen nachgewiesen und anschließend die Veränderungen der NO-Produktion von Kardiomyozyten der Ratte untersucht werden. Kardiomyozyten von wildtypischen Ratten sollten hierzu mit denen von transgenen Ratten, die die PMCA Myokard-spezifisch überexprimieren, verglichen werden.

3 Material und Methoden

Alle verwendeten Puffer, Lösungen, Chemikalien, Materialien und Geräte sind im Anhang aufgeführt.

3.1 Transgene Ratten

Zur detaillierteren Untersuchung der Calmodulin-abhängigen Kalzium-ATPase der Plasmamembran wurden von A. Hammes eine transgene hPMCA 4b-überexprimierende Rattenlinie etabliert (Dissertation Hammes, Würzburg 1997, Hammes et al., 1998). Unter Kontrolle des Ventrikel-spezifischen Myosin Light Chain-2v (MLC-2v) Promotors exprimieren die Ratten der Linie 1142 die humane Isoform 4b der PMCA im Myokard. Der MLC-2v Promotor hat den Vorteil, daß er bereits während der fetalen Entwicklung und auch postnatal konstitutiv aktiv ist. Somit ist eine frühe und konstitutive Expression der PMCA gewährleistet.

Die Ratten der Linie 1142 zeigen keinen auffälligen Phänotyp, haben ein normales Herzgewicht, eine normale Herz- zu Körpergewicht-Relation und die gleiche Lebenserwartung wie SD-Kontrollratten.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Allgemeines

Alle benutzten Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in ihrem speziellen Zellkulturmedium kultiviert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde.

Wenn die Zellen eine konfluente Schicht ausgebildet hatten, wurden sie gesplittet, d.h. auf einer neuen Kulturschale weitergezüchtet. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Schale abgelöst. Die gelösten Zellen wurden in ihrem Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen ausplattiert.

3.2.2 Neonatale Kardiomyozyten

Kardiomyozyten sind in Kultur nur wenige Tage haltbar, da es sich um hochdifferenzierte Zellen handelt, die sich nicht mehr teilen können. Neonatale Kardiomyozyten sind im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten länger in Kultur haltbar und einfacher und effizienter zu präparieren.

Zur Kardiomyozytenherstellung wurde das Protokoll nach Simpson (Simpson und Savion, 1982) verwandt. Unter sterilen Bedingungen wurden zwei bis drei Tage alte neonatale Ratten dekapitiert, der Thorax von vorne eröffnet und das so entnommene Herz in mit Heparin versetzter Hank's-Lösung (CBFHH) gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Herzen mechanisch kleingeschnitten und in 10ml Trypsin/Dnase-Lösung 20min vorsichtig gerührt. Nach kräftigem Durchmischen ließ man das Gewebe absinken und verwarf den Überstand, nach Ansicht unter dem Mikroskop, solange noch keine Kardiomyozyten zu sehen waren. Erneut wurden 10ml Verdaulösung zugegeben und der Verdauvorgang wiederholt. Nachfolgend wurden die Verdauschritte in Zeitintervallen von 5min wiederholt, wobei der Überstand, der nun viele Kardiomyozyten enthielt, abgenommen und zu Fetalem Kälber Serum (FCS) (vier Überstände pro 7ml Serum) gegeben wurde. FCS diente zur Inaktivierung des Verdauvorganges. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis mikroskopisch keine Kardiomyozyten mehr zu sehen waren. Bei RT und 1600U/min wurden die Zellen 5min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in phenolrotem Modified Eagle Medium (MEM; 5% FCS; im Folgenden MEM/5) aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden durch einen Zellstrainer (35µm) gegeben, um größere Verunreinigungen herauszufiltern, und auf Kulturschale (10cm Durchmesser) ausplatiert, die anschließend 90min bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert wurden. Dieses sogenannte „preplating“ diente dazu, die schneller anhaftenden Fibroblasten herauszufiltern. Die Kardiomyozyten aus dem Überstand dieser Kulturschale (10cm Durchmesser) wurden mit einer Fuchs-Rosenthalkammer ausgezählt und mit 5 Millionen Zellen pro Kulturschale (10cm Durchmesser) in MEM/5 ausplatiert.

3.2.3 N1E 115-Zellen

N1E 115-Zellen stammen von einer Neuroblastomzelllinie der Maus ab (Schwarz *et al.*, 1998). Sie wurden in phenolrothaltigem Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% FCS, 5ml Gentamycin, 0,825g / (500ml Medium) Glucose und 1ml / (100ml Medium) non-essential amino acids kultiviert.

3.2.4 HEK 293-Zellen

Die Zelllinie stammt von einer immortalisierten Krebslinie von humanen embryonalen Nierenzellen ab (Dare *et al.*, 1998) und läßt sich gut für Transfektionsexperimente nutzen, da sie einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet und anschließend mit Lipofectamin nach Angaben des Herstellers (LifeTechnologies) transfiziert. Die Ergebnisse wurden auf die eingesetzte Proteinmenge abgeglichen.

3.3 Proteinextrakte

3.3.1 Herstellung aus Zellen

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden zwei Methoden angewendet. Damit der Proteingehalt der Zellen noch nach der BioRad-Methode (siehe Kapitel 3.3.3) meßbar war, wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, von den Zellkulturschalen auf Eis abgeschabt, 30sec bei 14000U/min und RT abzentrifugiert und das entstehende Zellpellet einer Kulturschale (10cm Durchmesser) in 300µl RIPA-Puffer (1xPBS, 1% Triton X-100, 1:25 Proteinaseinhibitorcocktail tablets von Boehringer Mannheim) resuspendiert.

Spielte der genaue Proteingehalt der Zellen keine Rolle, so wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und in 1ml Laemmli-Probenpuffer pro Kulturschale (10cm Durchmesser) von dieser abgeschabt.

3.3.2 Herstellung aus Herzen

Bei -80°C gefrorene Herzen von zwei bis drei Tage alten Ratten wurden gewogen (mittleres Herzgewicht $50\mu\text{g}$) und in einem mit Trockeneis gekühlten Mörser zerstoßen. Die Proben wurden in der 10-fachen Menge $0,1\text{ N HCl}$ aufgenommen, d.h. 500 ml . Anschließend wurden sie 5 min bei 3000 U/min und RT zentrifugiert und der Überstand im Verhältnis $1:1$ mit $0,1\text{N HCl}$ gemischt.

3.3.3 Messung nach BioRad-Methode

Zur Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe wurden $800\mu\text{l}$ dest. H_2O mit $200\mu\text{l}$ Dye Reagent Concentrate von BioRad und $2-10\mu\text{l}$ Probe versetzt und im Spectrophotometer bei 595nm gegen eine Leerprobe gemessen. Das Meßprinzip beruht auf der Coomassie Brilliant Blue G-250-Bindung an das Protein, wodurch der Farbstoff sein Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm ändert (Bradford, 1976). Die bei 595 nm absorbierte Lichtmenge ist proportional zum Proteingehalt der Probe.

3.3.4 Western-Blot Analyse

Der Western Blot diente zum Nachweis von Proteinen. Dazu wurden Proteine in einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran überführt und dort mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Western Blot zum Nachweis von NO-Synthase im Herzmuskelzellen genutzt.

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte mit einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) in einer BioRad-Elektrophoresekammer. Es wurde ein 5% iges Sammelgel über ein $7,5\%$ iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen. Der Proteingehalt der Proben wurde nach der BioRad-Methode (siehe Kapitel 3.3.3) bestimmt, die Proben mit Laemmli-Probenpuffer im Volumenverhältnis $1:2$ gemischt und 5min bei 95°C aufgekocht, bevor gleiche Proteinmengen auf das Gel geladen wurden. Die Gelelektrophorese lief für $3-4$ Stunden bei 90V im Laufpuffer. Als Größenvergleich wurden $7\mu\text{l}$ des Fullrange RainbowTM Molecular weight marker auf das Gel geladen.

Anschließend wurde der Elektrotransfer nach Towbin (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Zur Vorbereitung des Transfers wurde das Gel für 20min in Transferpuffers equilibriert, die PVDF-Membran kurz in destilliertem Wasser getränkt und 15min ebenfalls in Transferpuffer equilibriert. Auf einen in Transferpuffer getränkten Schwamm und zwei Whatman-Filter wurde das Gel gelegt, gefolgt von der PVDF-Membran und zwei weiteren Whatman-Filtern sowie einem Schwamm. Dieser Aufbau wurde in einer Klammer zusammen mit einem Kühlakku in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer von BioRad gesetzt und die Proteine bei 100mA über Nacht auf die PVDF-Membran übertragen.

Die mit Protein beladene Membran wurde 20min in 50% Methanol equilibriert und anschließend 1 Stunde bei RT in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren.

Es folgte die Inkubation bei RT mit dem Primärantikörper für nNOS, Verdünnung 1:1000 von Transduction Laboratory (Brenman et al., 1995), und für TroponinT, Verdünnung 1:400 von Sigma, über 1Stunde in Waschlösung. Nach einigen Waschschritten mit Waschlösung zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde die PVDF-Membran 45min mit dem 2. Antikörper inkubiert. In der vorliegenden Arbeit wurde für den nNOS-Nachweis der anti-Hase-Antikörper und für den Troponin T-Nachweis der anti-Maus-Antikörper, beide von Amersham, verwendet. Der zweite Antikörper war dabei an einen Meerrettichperoxidasekomplex gebunden, der zur Chemolumineszenzreaktion mit dem ECL-(enhanced chemoluminescence)-Kit diente, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Der Nachweis beruht auf einer von der Peroxidase katalysierten Reaktion mit H_2O_2 , bei der Licht freigesetzt wird. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Membran für 1min in dem Chemolumineszenzreagenz inkubiert, das sich aus den, im Verhältnis 1:1 gemischten, 2 Lösungen des ECL-Kit zusammensetzte. Die Membran wurde kurz auf einem Whatman-Filter getrocknet, in eine Plastikfolie eingeschweißt und zusammen mit einem X-ray Retina Film in eine Röntgenkassette gelegt. Nach 5min wurde der Film der Kassette entnommen und entwickelt. Je nach Stärke des Signals, d.h. dem Grad der Filmschwärzung entsprechend, wurde der nächste Film länger oder kürzer exponiert.

3.4 NO-Bestimmung

In Flüssigkeiten reagiert entstehendes Stickstoffmonoxid (NO) schnell zu Nitrit und Nitrat (NO_2 , NO_3). Einfacher als der direkte photometrische Nachweis von NO ist der photometrische Nachweis des entstehenden stabileren Nitrits. Daher wurde das entstandene Nitrat mit Hilfe des NADPH-abhängigen Enzyms Nitratreduktase komplett zu Nitrit reduziert. Mit Hilfe des Griess Reagenz (1% Sulfanilamid und 0,1% Naphthylendiamindihydrochlorid in 2% Phosphorsäure) wurde photometrisch bei 540 nm die quantitative Menge des entstandenen Nitrit bestimmt. Damit ließ sich indirekt auf die Menge des Stickstoffmonoxid zurückschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nitric Oxide Assay Kit von Calbiochem verwendet. Zur Probenherstellung wurde eine Million Zellen pro Kavität einer 6er Kulturschale ausplattiert. Stimulanzen wurden ins Nährmedium gegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 200 μl des Überstandes abgenommen. Gemäß Anleitung wurden 80 μl der Probe eingesetzt, mit Nitratreduktase, NADPH und Griess Reagenz versetzt und die Absorption photometrisch gemessen.

3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung bestimmter Proteine in Zellen kann die indirekte Doppelimmunfluoreszenzfärbung verwendet werden. Dabei wird je ein mono- und ein polyklonaler Antikörper, der gegen das entsprechend gesuchte Protein gerichtet ist, auf die Zellen gegeben, die vorher auf einem Objektträger fixiert wurden. Entsprechend der Primärantikörper wurden die Zellen anschließend mit farbmarkierten anti-Maus-Antikörpern (für monoclonale Ak) und anti-Kaninchen-Antikörpern (für polyclonale Ak) inkubiert. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proteine anschließend farblich sichtbar gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurden 0,1 Mio neonatale Kardiomyozyten auf einem vorgelatinisierten Glasobjektträger einer 24iger Kulturschale ausplattiert. Zwei Tage später wurden sie nach kurzem Waschen mit 1xPBS, 10 min mit 2% PFA bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellmembranen 2 min bei RT mit Methanol permeabilisiert. Nach wiederholtem kurzen Waschen mit 1xPBS wurde

15min bei RT Blockierlösung auf die Zellen einwirken gelassen, um dann über Nacht bei 4°C im Dunkeln mit folgenden Primärantikörpern inkubiert zu werden:

- a) polyclonaler nNOS-Antikörper (NOS1 R-20 von Santa Cruz), (Schmidt und Walter,1994);
- b) monoclonaler TroponinT-Antikörper von Sigma

Nach weiterem kurzen Waschen mit 1xPBS wurden die Objektträger eine Stunde im Dunkeln bei 4°C mit den Sekundärantikörpern TexasRed-anti-Kaninchen, von Dianova Verdünnung 1:500, für den nNos-Ak und FITC-anti-Maus, von Sigma Verdünnung 1:250, für den TroponinT-Ak inkubiert und anschließend mit Vectashield Mounting Medium eingedeckt.

3.6 NOS-Aktivitätsmessung

In eukariotischen Zellen entsteht Stickstoffmonoxid (NO) während der enzymatischen Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin durch die NO-Synthase (NOS) in einem bestimmten Milieu. Zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms NO-Synthase macht man sich diese Oxidation zunutze, indem radioaktiv markiertes ³H-L-Arginin eingesetzt und die Menge des entstandenen radioaktiven L-Citrullins gemessen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der NOSdetect™ Assay Kit von Stratagene benutzt. Aus neonatalen Kardiomyozyten, die mit 1 Million Zellen pro Kavität einer 6er Kulturschale ausplattiert wurden, wurde am zweiten Tag Protein nach Anleitung des NOSdetect™ Assay Kit gewonnen. Dazu wurden die Zellen auf Eis in 1xPBS mit 1mM EDTA gewaschen, von den Kulturschalen abgelöst und für 2min bei 3000U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 200µl Homogenisationspuffer gut resuspendiert und 5min bei 14000U/min abzentrifugiert. Im Überstand wird die Proteinkonzentration mit Hilfe der BioRad-Methode (siehe Kapitel 3.3.3) auf Konzentrationen von 5-10µg/µl eingestellt und die Probe auf Eis gelagert.

Anschließend wurden 10µl der Probe mit 40µl auf Eis hergestelltem Reaktionsmix (25µl 2xReaktionspuffer, 5µl 10mM NADPH, 5µl 6mM CaCl₂, 4µl H₂O dest., 1µl ³H-Arginin (1µCi/µl)) eine Stunde bei 27°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 400µl Stoppuffer (pH5,5; 50mM HEPES, 5mM EDTA) beendet und die Probe über

eine mit 100µl Resinharz gefüllte Säule laufen gelassen, die das unverbrauchte ^3H -Arginin durch Bindung herausfilterte. Nach Zentrifugation der Säule über 30sec bei 14000U/min wurde zum Eluat Sintillationsflüssigkeit gegeben und die Probe in einem β -Counter zweimal je 2min gemessen. Die Höhe des Meßwertes entspricht der Aktivität der NO-Synthase.

3.7 cGMP-Bestimmung

Zum indirekten Nachweis von niedrigen NO-Mengen eignet sich die Bestimmung des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), das durch Umsatz des Guanosintriphosphat (GTP) am Enzym Guanylatzyklase entsteht. Dabei wird der Effekt der Enzyminduktion durch NO ausgenutzt – so induziert ein NO-Molekül eine 200-fache Steigerung der Guanylatzyklaseaktivität.

Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß das in der Meßprobe enthaltene cGMP mit einer bestimmten Menge mit alkalischer Phosphatase markiertem GMP um die Bindungsstelle an einem polyclonalen anti-Kaninchen-Antikörper konkurriert. Während der Inkubation bei Raumtemperatur (RT) bindet dieser Komplex (cGMP bzw. markiertes GMP und anti-Kaninchen-Antikörper) an einen auf einer Mikrotiterplatte fixierten sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Alle ungebundenen cGMP-Moleküle und überschüssige Antikörper werden durch Waschen entfernt. Die Detektionsreaktion wird durch Zugabe des Substrates der Alkalischen Phosphatase gestartet. Nach einer Stunde wird die Reaktion gestoppt, und die Absorbtion der entstehenden farbigen Substanz wurde bei einer Wellenlänge von 405nm photometrisch gemessen. Aufgrund der Reaktionsbedingungen ist die gemessene optische Dichte der Probe umgekehrt proportional zu ihrer cGMP-Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde der cGMP (low pH)-Kit von R&D Systems verwendet. Zur Probenherstellung wurden 1 Million Zellen pro Kavität einer 6er Kulturschale ausplatiert. Die Zellen wurden mit 1mM L-Arginin 30 min lang in Lockes-Puffer aufgesättigt und 5 Minuten vor der Lyse wurde das entstehende Stickstoffmonoxid (NO) durch Zugabe von Superoxiddismutase (100 U/ml Kulturmedium) stabilisiert. Parallel dazu wurde 5 Minuten vor der Lyse 1mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) zu der Zellkultur hinzugefügt, um die Phosphodiesteraseaktivität, und damit den cGMP-Abbau, zu hemmen. 3 Minuten vor

der Lyse mit 500µl 0,1N HCl pro Kavität wurden dann verschiedene Substanzen zur Aktivierung bzw. Inhibierung der NO-Synthase zugegeben. Anschließend wurden die Proben 1:1 mit 0,1N HCl verdünnt, um dann nach Anleitung des Herstellers eingesetzt zu werden.

3.8 Transiente Transfektion mittels Liposomen

Um bestimmte Phänomene, die auf Proteinexpression beruhen, leichter untersuchen zu können, wird ein Expressionsvektor für das entsprechende Protein in eine Zelle eingebracht, die dieses Protein normalerweise nicht oder nur gering exprimiert. Dieser Vorgang wird als Transfektion bezeichnet. Dazu werden bei der Liposomtransfektion Lipiddoppelschichten benutzt, die sich in wässrigem Medium automatisch zu geschlossenen Vesikeln anordnen und die DNA einschließen. Diese Lipiddoppelschichten lagern sich gut an die Zellmembranen an und fusionieren mit dieser, so daß ihr Inhalt in die Zelle aufgenommen wird und das Protein exprimiert werden kann.

Im hier beschriebenen Fall wurde die Transfektion mit Lipofectamine PlusTM Reagenz von LifeTechnologies an 500000 Zellen pro Kavität einer 6er Kulturschale durchgeführt. Zur DNA-Verdichtung wurde 1µg DNA (genaue Bezeichnung der verwendeten Plasmide siehe unten) mit 3µl Plus-Reagenz und 100µl OptiMEM vermischt, gleichzeitig wurden 2µl Lipofectamin mit 100µl OptiMEM verrührt und beides 15min bei RT ruhen gelassen. Nach Zusammengabe beider Mischungen wurden sie 15min bei RT inkubiert, damit sich die vollständigen Vesikel mit Inhalt bilden konnten. Anschließend wurde diese Mischung mit 800µl OptiMEM auf die Zellen gegeben und drei Stunden bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert, um die Anlagerung und Fusion der Vesikel mit der Membran zu gewährleisten. Nach einem Mediumwechsel mit dem normalem Zellmedium wurden die Zellen 16 Stunden kultiviert, stimuliert und anschließend ihr cGMP-Gehalt gemessen (siehe Kapitel 3.7). Als Plasmide wurden verwendet:

- der pCMV-hPMCA4b-Expressionsvektor, der von A. Hammes (Dissertation von A. Hammes 1997) in unserem Labor hergestellt wurde,

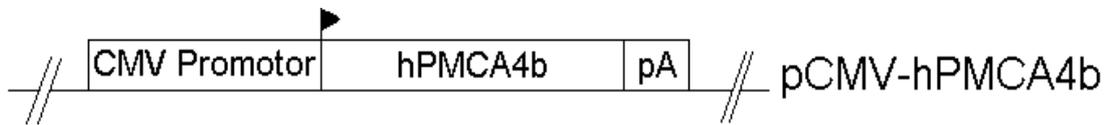


Abbildung 3a: pCMV-hPMCA4b-Expressionsvektor

CMV (Cytomegalievirus) Promoter; hPMCA4b cDNA (humane PMCA, Isoform 4b); pA (Polyadenylierungssignal)

- und der pCMV-NOS-I-Expressionsvektor, freundlicherweise von David S. Bredt zur Verfügung gestellt.

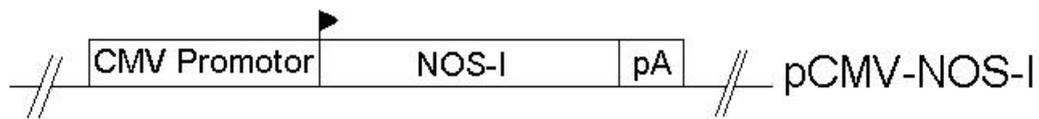


Abbildung 3b: pCMV-NOS-I-Expressionsvektor

CMV (Cytomegalievirus) Promoter; NOS-I cDNA (neuronal NOS); pA (Polyadenylierungssignal)

3.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Student-t Tests durchgeführt. In den Fällen, zu denen keine weiteren Angaben gemacht sind, wurde der zweiseitige und ungepaarte Student-t Test ungleicher Varianz angewandt.

4 Resultate

4.1 Nachweis von NO-Synthase in Kardiomyozyten

4.1.1 Western-Blot

Mittels Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß alle drei NOS-Isoformen auf Proteinebene in Kardiomyozyten exprimiert werden. Dazu wurden die Kardiomyozyten mit dem polyclonalen R-20 Antikörper gegen nNOS (Schmidt *et al*, 1994, Marietta, 1994), dem monoclonalen iNOS-Antikörper (Nathan *et al*, 1994) und dem monoclonalen ecNOS-Antikörper (Brennman *et al*, 1995) analysiert. Als Kontrolle wurden die Membranen mit dem monoclonalen Anti-TroponinT-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper erkennt das für Muskelzellen, in diesem Fall Kardiomyozyten, spezifische Protein Troponin T und dient somit als Nachweis, daß es sich bei den analysierten Zellen um Herzmuskelzellen handelt.

Die Abbildung 4A) zeigt die Signale für die drei NOS-Isoformen in der Höhe ihres erwarteten Molekulargewichts: nNOS bei 160kDa, iNOS bei 130kDa und eNOS bei 140kDa.

Die Abbildung 4B) zeigt dieselben Membranen aus Abbildung 4A), die mit dem monoclonalen Anti-TroponinT-Antikörper inkubiert wurden. Es zeigt sich, wie erwartet, nur ein Signal für Troponin T bei 35kDa in den Spalten TG und N, die das Herzmuskelzellysat enthalten.

Dieses Resultat konnte in mehrfachen Wiederholungen des Western-Blots mit mehreren unabhängigen Präparationen der Membranproteine für unterschiedliche Kardiomyozyten bestätigt werden (n=3).

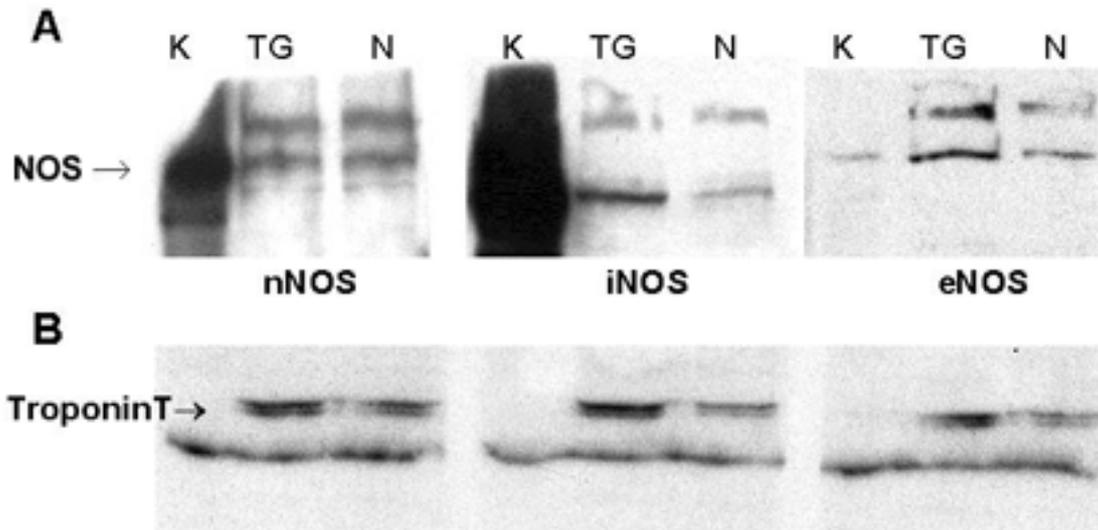


Abbildung 4: Nachweis von neuronaler-, induzierbarer- und endothelialer NO-Synthase in Kardiomyozyten mittels Western Blot Analyse

A) Jeweils 20µg Membranproteine neonataler Kardiomyozyten von SD-Kontrollratten (N) und hPMCA4b-transgener Ratten (TG) wurden mit dem polyclonalen R-20 Antikörper gegen nNOS, dem monoclonalen iNOS-Antikörper und dem monoclonalen ecNOS-Antikörper analysiert. Es zeigte sich, daß alle drei NOS-Isoformen in Herzmuskelzellen vorkommen. In der ersten Spalte der Membranen (K) wurde eine Positivkontrolle zum Nachweis der Funktion des Antikörpers aufgetragen; Ratten Cerebellum für nNOS, ein Maus-Makrophagen-Lysat für iNOS und für eNOS ein humanes- Endothel-Lysat.

B) Dieselben Membranen aus Abbildung A) wurden mit dem monoclonalen Anti-Troponin T Antikörper inkubiert. Banden für Troponin T zeigen sich nur in den Spalten TG und N, die Kardiomyozytenlysate enthalten.

4.1.2 Immunfluoreszenzbilder

Isolierte Kardiomyozyten von neonatalen SD-Ratten wurden am dritten Tag ihrer Kultivierung mit folgenden Antikörpern doppelt gefärbt:

- a) dem polyclonalen nNOS-Antikörper R-20 von Santa Cruz und dem sekundären Antikörper TexasRed-Anti-Kaninchen-Antikörper von Dianova
- b) und dem monoclonalen Anti-TroponinT-Antikörper von Sigma und mit dem sekundären Antikörper FITC-Anti-Maus-Antikörper von Sigma

Anschließend wurden die Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen in einem Konfokalmikroskop schichtweise angeschaut. Die Abbildungen zeigen eine Ebene durch die Zellen. Alle am Gerät einzustellenden Parameter wurden bei allen Färbungen konstant gehalten.

Die Abbildungen 5A)-C) zeigen, daß neuronale NOS in Kardiomyozyten vorkommt. In Abbildung 5A) stellt sich nNOS rot dar, da TexasRed an den sekundären Antikörper gekoppelt war. nNOS ist diffus in der Zelle verteilt zu erkennen. Abbildung 5B) dient als Kontrolle, um die Zellen eindeutig als Herzmuskelzellen zu identifizieren. Zu sehen sind dieselben Zellen aus Abbildung 5A), diesmal mit Anti-Troponin T-Antikörper und FITC gekoppelt an den Sekundärantikörper gefärbt. Daher stellt sich das Troponin T der Zellen grünlich diffus im Zytosol der Zellen verteilt dar. In Abbildung 5C) ist die Überlagerung der beiden Proteine an den doppeltgefärbten Zellen zu sehen, die sich gelb darstellt. Damit ist nNOS eindeutig in Kardiomyozyten nachgewiesen. Abbildung 5D) zeigt das Bild, wenn nur die beiden sekundären Antikörper, TexasRed-Anti-Kaninchen-Antikörper und FITC-Anti-Maus-Antikörper, auf die Zellen gegeben werden. Die schwache Färbung entsteht durch unspezifische Bindungen der Antikörper an die Zellen.

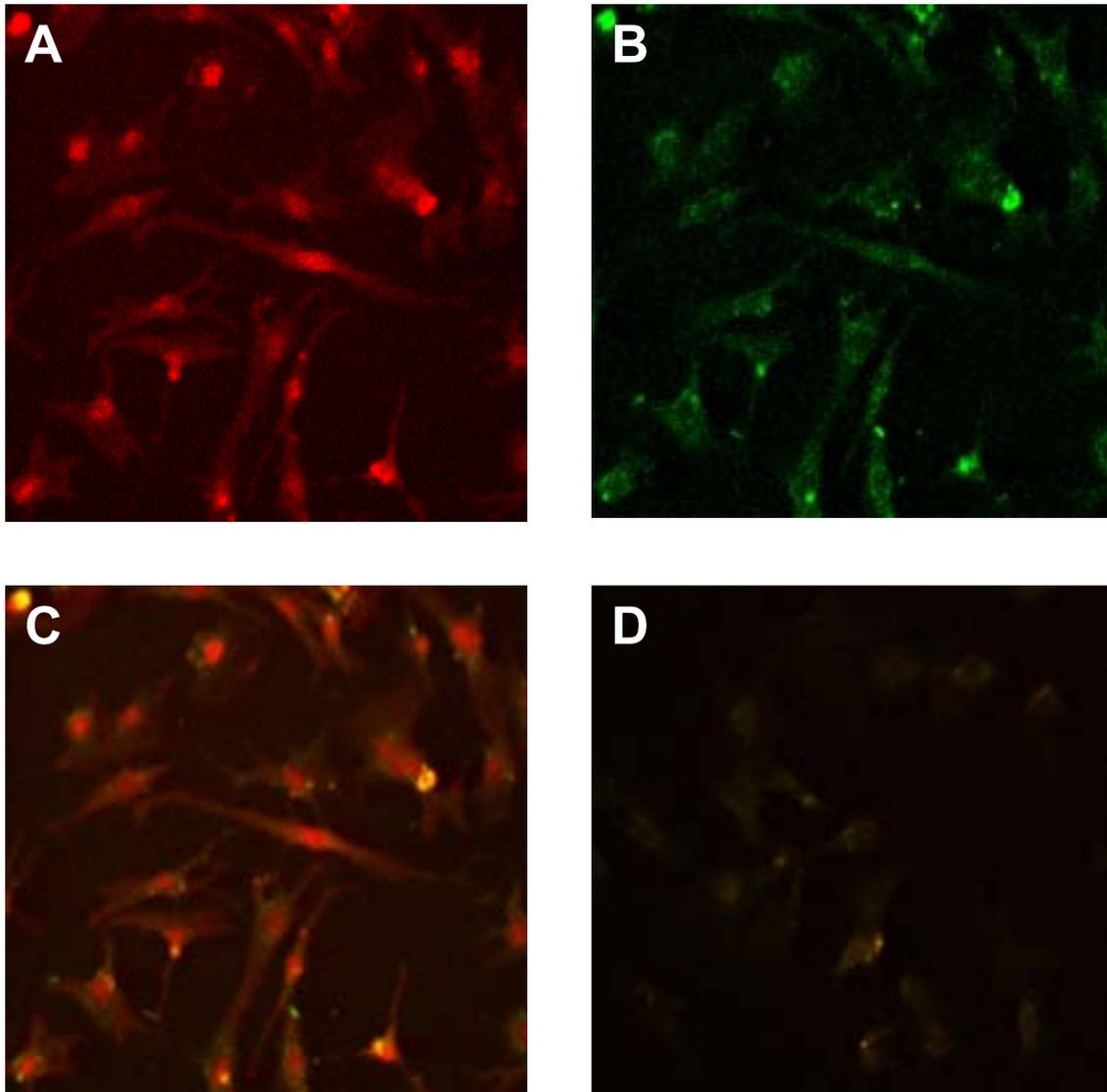


Abbildung 5 A-D: nNOS in Kardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozyten wurden mit R-20, einem Antikörper der die neuronale NOS erkennt, gefärbt. TexasRed war an den Sekundärantikörper gekoppelt (A). Grün (FITC-) gefärbte Bereiche zeigen die Verteilung von Troponin T in der Zelle (B). Abbildung C) zeigt gelb die Überlagerung von nNOS und Troponin T in den Zellen. Abbildung D) zeigt die schwache Hintergrundfärbung der Zellen, wenn nur mit beiden sekundären Antikörpern gefärbt wird.

4.2 Veränderte NO-Produktion durch PMCA-Aktivität

Der Einfluß von PMCA auf das NO-Produktionsverhalten von Zellen ist bisher weitgehend unklar. Um den Hinweisen nachzugehen, wurde in dieser Arbeit eine indirekte Meßmethode zur Bestimmung der Stickstoffmonoxidproduktion der Zellen etabliert, um dann anhand dieser den Einfluß der PMCA zu untersuchen.

4.2.1 NO-Messung an N1E-Zellen

In Vorversuchen wurde die NO-Produktion von N1E-Zellen, die bekanntermaßen die NO-Synthase enthalten, direkt aus dem Zellkulturmedium gemessen (Southan *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1998). Die Daten ergaben trotz verschiedener Veränderungen im Versuchsaufbau nur inkonstante Werte, die am Rand des auswertbaren Bereichs lagen. Daher wurden die Zelllinie und die Meßmethode gewechselt.

4.2.2 NOS-Aktivität von Kardiomyozyten

Die Aktivität des Enzyms NO-Synthase (NOS) sollte Aufschluß über die NO-Entstehung in Kardiomyozyten geben, da die quantitative Menge der NO-Produktion unter den gewählten Bedingungen nicht meßbar war. Um die Frage des Einflusses von PMCA auf die NO-Produktion zu klären, wurden die NOS-Aktivität von wildtypischen Kardiomyozyten und hPMCA4b-überexprimierenden-transgenen Kardiomyozyten der Ratte gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen mit folgenden verschiedenen Substanzen stimuliert: Mit 1µM Calmodulin, als Regulationsprotein der NOS-Aktivität; mit 100µM NOC 18, einem NO-Donor; mit 10µM Carbachol, einem muskarinischem Acetylcholin-Rezeptoragonist, mit 5µM Calmidazolium, einem Inhibitor von Calmodulin-regulierten Enzymen, und mit verschiedenen NOS-Inhibitoren: 100µM N ω -Nitro-L-Arginine-methylester (L-NAME), 100µM N^G-Monomethyl-L-Arginine (NMMA) und 100µM L-N⁵-(1-Iminoethyl)-ornithine (NIO). Die Resultate waren nicht auswertbar, da der Leerwert, das reine Reaktionsgemisch, mit 33374 counts-per-minute (cpm) höhere Werte aufwies als die zu messenden Zellen, die um die 20000 cpm lagen. Da sich in acht Versuchen immer ähnliche Ergebnisse ergaben, wurde die Nachweisgrenze für die

NOS-Aktivität mit diesem Versuchsaufbau nicht erreicht. Die Funktionsfähigkeit des Assays zeigt sich an der Positivkontrolle. 1,5µl des Rattencerebellums, ein stark NOS-haltiges Gewebe, hat eine stark erhöhte Aktivität gegenüber dem Leerwert des Reaktionsgemisches und läßt sich durch den NOS-Inhibitor, 100µM NMMA, in seiner Aktivität deutlich um etwa 40000 cpm mindern.

	NOS-Aktivität normaler Kardiomyozyten in cpm	NOS-Aktivität transgener Kardiomyozyten in cpm
nur Zellen	21093 +/- 7739	22415 +/- 8822
100 µM Nio	19153 +/- 8000	27235 +/- 9146
100 µM NMMA	28792 +/- 14897	25232 +/- 7706
100 µM L-NAME	20458 +/- 6411	25947 +/- 7104
100 µM NOC18	21052 +/- 12218	30339 +/- 3151
10 µM Carbachol	26185 +/- 20309	28168 +/- 1750
5 µM Calmidazolium	14967 +/- 1547	25104 +/- 372
1 µM Calmodulin	18861 +/- 7825	28626 +/- 1335

Kontrollen	NOS-Aktivität in cpm
Leerwert	33374 +/- 4235
1,5 µl rat cerebellum	72302 +/- 8037
1,5 µl rat cerebellum +100 µM NMMA	39517 +/- 2180

Tabelle 1: NOS-Aktivität von wildtypischen/ transgenen Kardiomyozyten und Kontrollen in einem 1-Stundenwert; dargestellt als counts-per-minute (cpm-Werte) (n=8).

Der Leerwert in der Kontrolltabelle zeigt die Radioaktivität des reinen Reaktionsgemisches. Das Rattencerebellum dient als Positivkontrolle. In der Ergebnistabelle zeigt 'Nur Zellen' die NOS-Aktivität unstimulierter Kardiomyozyten. NIO, NMMA, L-NAME, NOC18, Carbachol, Calmidazolium und Calmodulin wurden in der angegebenen Konzentration den Zellen zugegeben.

4.2.3 cGMP-Messung

In der vom Stickstoffmonoxid benutzten Signalkaskade ist die Guanylatzyklase die nächste Stufe. Die Messung von cGMP, dem an der Guanylatzyklase entstehenden Protein, hat zwei Vorteile. Einmal ist cGMP in der Zelle stabiler als NO, und zum Zweiten sind kleinere NO-Mengen durch den Verstärkereffekt leichter meßbar. Dieser entsteht durch die 200-fache Aktivitätssteigerung der Guanulatzyklase durch ein NO-Molekül (Schmidt HH *et al.*, 1993).

4.2.3.1 Neonatale Ganzherzen

Drei Tage alte neonatale Herzen (mittleres Herzgewicht 50µg) von hPMCA4b-transgenen Ratten und SD-Ratten wurden mechanisch zerkleinert (siehe Kapitel 3.3.2) und mit 0,1µM HCl 1:3 verdünnt, um ihre cGMP-Konzentration (siehe Kapitel 3.7) zu bestimmen. Nach acht Versuchen stellte sich heraus, daß transgene neonatale Herzen eine bis zu dreifach höhere cGMP-Konzentration aufweisen als neonatale Herzen von SD-Ratten; dies entspricht einer Signifikanz von $p < 0,028$.

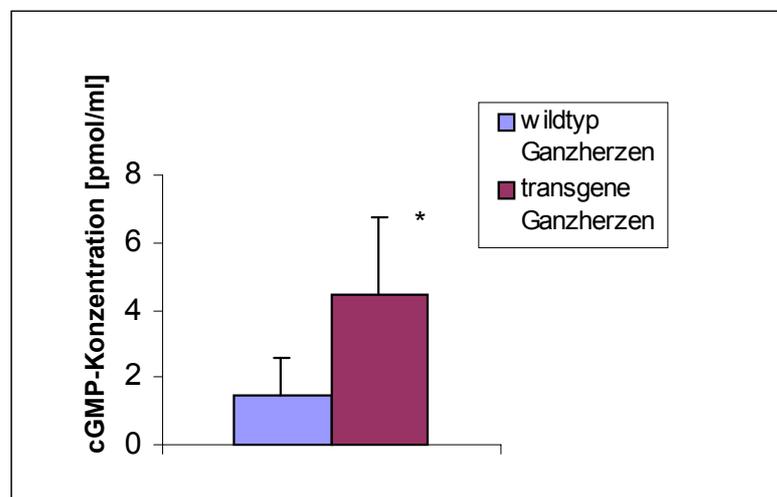


Abbildung 6: cGMP-Konzentration in neonatalen Ganzherzpräparaten von hPMCA4b transgenen Ratten und wildtypischen SD Kontrollen

hPMCA4b-transgene neonatale Ganzherzpräparate weisen eine signifikant höhere cGMP-Konzentration als neonatale Herzen von SD-Ratten auf (n=8, $p = 0,028$).

4.2.3.2 Stimulierte Kardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozyten von SD- und hPMCA4b-transgenen Ratten wurden nach drei Tagen in Zellkultur 5 Minuten mit verschiedenen Substanzen stimuliert und ihre cGMP-Konzentration gemessen (siehe Kapitel 3.7). Die mit K gekennzeichneten Kontrollzellen wurden nicht stimuliert, dienen also als Referenzwert. L-NAME (L-N) inhibiert die NO-Synthase und senkt bei den SD-Kardiomyozyten die cGMP-Konzentration. Unerwarteterweise ist die cGMP-Konzentration der mit L-NAME stimulierten transgenen Kardiomyozyten leicht erhöht. NOC 18, ein NO-Donor, der die NO-Synthase umgeht, indem er NO freisetzt, steigert die cGMP-Konzentration der hPMCA4b-transgenen Kardiomyozyten um den Faktor 15. A23187 (4-Bromo-Kalzium-Ionophor) beeinflusst den Kalziumeinstrom in die Zelle und stimuliert so die NOS der SD-Kardiomyozyten um das 4-fache und der hPMCA4b-transgenen Kardiomyozyten um das 12-fache. Generell wurde nach n=3 festgestellt, daß Kardiomyozyten wenig Stickstoffmonoxid produzieren und sich schlecht stimulieren lassen, so daß die cGMP-Konzentrationswerte immer am unteren Randbereich des pseudolinearen Meßbereiches lagen.

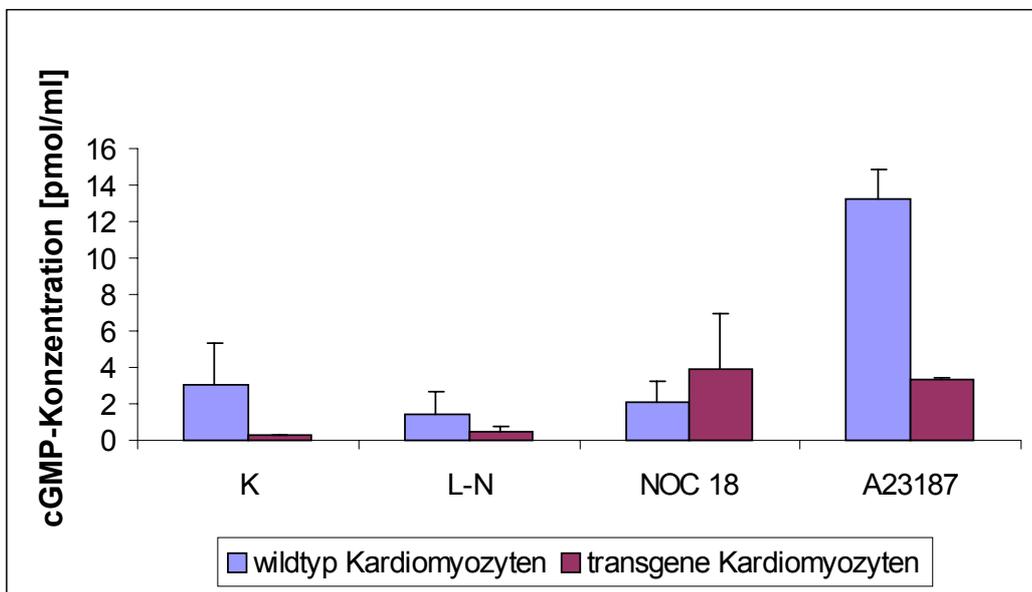


Abbildung 7: Veränderung der cGMP-Konzentration von SD- und hPMCA4b-transgenen Kardiomyozyten bei Stimulation mit verschiedenen Substanzen

Die mit K bezeichneten Zellen sind ohne Stimulanz gemessen worden. 100µM L-NAME (L-N) inhibiert die NO-Produktion, 100µM NOC 18 ist ein NO-Donor und 2,5µM A23187 stimuliert die NO-Produktion der SD-Kardiomyozyten um den Faktor 4 und der hPMCA4b-transgenen Kardiomyozyten um den Faktor 12.

4.2.3.3 Transfizierte Kardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozyten von SD-Ratten wurden am dritten Tag ihrer Kultivierung mit den Plasmiden pCMV-hPMCA4b und pCMV-NOS-I transfiziert (siehe Kapitel 3.8) und ihre cGMP-Konzentration anschließend bestimmt (siehe Kapitel 3.7).

Die Abbildung 8a) zeigt, daß die hPMCA4b-transgenen Kardiomyozyten eine absolut höhere cGMP-Konzentration aufweisen als die Kardiomyozyten der SD-Ratten. Die Kotransfektion mit dem pCMV-hPMCA4b-Plasmid senkt in beiden „Zelltypen“ die cGMP-Produktion; auf das 0,54-fache der Ausgangsproduktion bei den SD-Kardiomyozyten und das 0,75-fache bei den Transgenen.

Die Transfektion mit steigenden nNOS-Plasmid-Konzentrationen steigert die cGMP-Produktion in beiden „Zelltypen“ bis zu einer nNOS-Plasmid-Konzentration von 0,5µg, in höherer Konzentration sinken die cGMP-Konzentrationen auf Werte unter die Ausgangskonzentration ab.

Auffällig ist, daß trotz der absolut höheren cGMP-Konzentrationswerte der transgenen Kardiomyozyten die x-fache Induktion von cGMP niedrigere Werte als die der wildtypischen Kardiomyozyten zeigt. Das bedeutet, daß die NO-Synthase der transgenen Herzmuskel-zellen schlechter stimuliert werden kann.

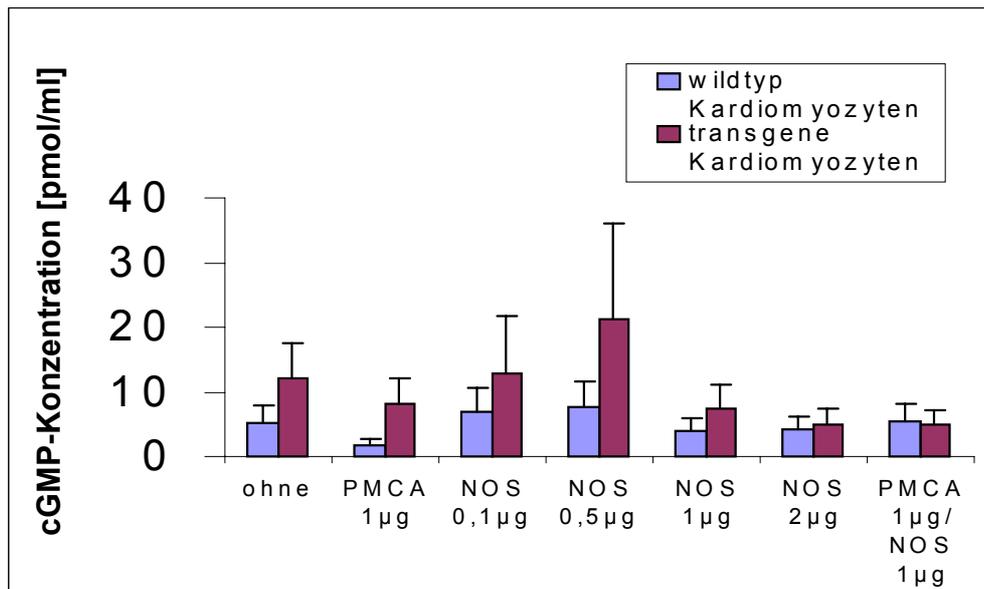


Abbildung 8a: Änderung der cGMP-Konzentration in Abhängigkeit von der transfizierten nNOS-Konzentration Eine Transfektion mit 1µg pCMV-hPMCA4b-Plasmid senkt den Ausgangswert („ohne“ = untransfizierte Zellen) bei beiden Zelllinien ab. Eine Transfektion mit 0,1 bzw. 0,5µg pCMV-NOS-I-Plasmid erhöht die cGMP-Konzentration in beiden Zelllinien. Transfiziert man die Zellen mit NOS-Konzentrationen von 1 bzw 2 µg, sinkt die cGMP-Konzentration auf Werte niedriger als der Ausgangswert ab. (n=5)

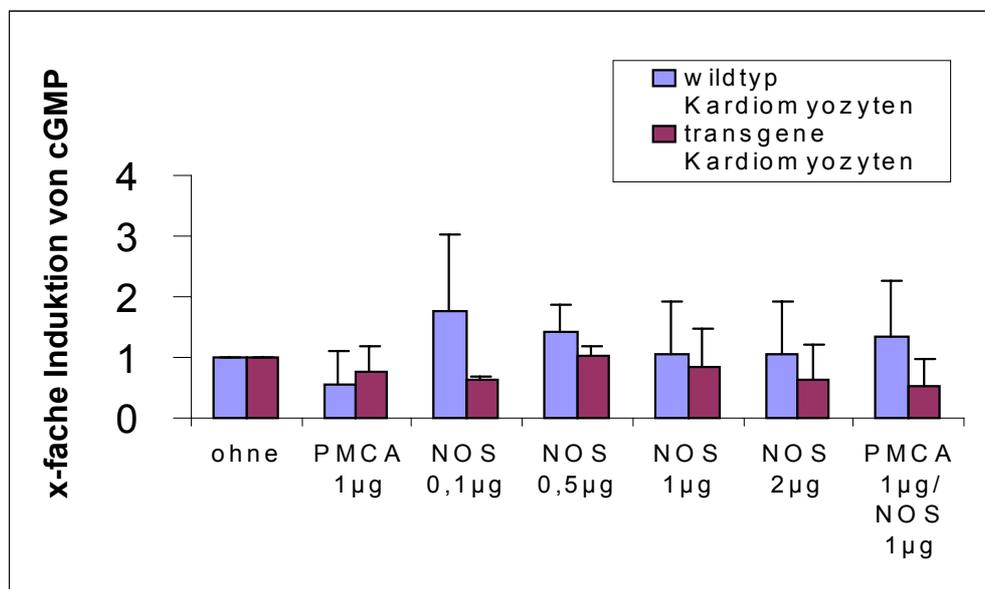


Abbildung 8b: Veränderung der x-fachen Induktion von cGMP von neonatalen Kardiomyozyten von SD-Ratten zu PMCA-transgenen Ratten

Die Abbildung zeigt die gleichen Daten wie die Abbildung 8a), nur keine Absolutwerte, sondern die x-fache Induktion. Transgene Kardiomyozyten zeigen insgesamt eine schwächere x-fache Induktion als wildtypischen Kardiomyozyten. (n=5)

4.2.3.4 Transfizierte HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen können mit einer erheblich höheren Transfektionseffizienz als Kardiomyozyten transfiziert werden. Um die Hinweise aus der Kardiomyozytentransfektion auf eine "Downregulation" der neuronalen NO-Synthase durch die PMCA in einem stabileren System weiter zu untersuchen, wurde das Zellsystem gewechselt.

HEK 293-Zellen wurden mit 0,5µg DNA des pCMV-NOS-I-Plasmides und mit steigenden Konzentrationen des pCMV-hPMCA4b-Plasmides kotransfiziert.

Nach 12 Versuchen zeigte sich, daß mit 1µg des PMCA-Plasmides transfizierte HEK 293-Zellen in Bezug auf untransfizierte HEK 293-Zellen praktische keine Erhöhung der cGMP-Konzentration aufwiesen - im Gegensatz zu der 44-fachen Induktion der HEK 293-Zellen, die mit 0,5µg des nNOS-Plasmides transfiziert wurden. Das entsprach einer Signifikanz von $p=0,01$. In mit beiden Plasmiden gleichzeitig transfizierten Zellen, wobei die 0,5µg des nNOS-Plasmides konstant gehalten wurden und die Konzentration des PMCA-Plasmides von 0,1µg über 0,5µg und 1µg auf 2µg gesteigert wurde, zeigte sich eine stetig sinkende x-fache Induktion der cGMP-Konzentration. In Zellen mit 2µg PMCA und 0,5µg nNOS betrug die x-fache Induktion nur noch das 6-fache des Kontrollwertes. Bezogen auf die x-fache Induktion des 0,5µg nNOS/neg. PMCA-Wertes war die x-fache Induktion des 0,5µg nNOS/1,0 PMCA-Wertes mit einer Signifikanz von $p=0,04$ erniedrigt.

Abbildung B) und C) zeigen exemplarisch mittels Western Blot die unterschiedliche Expression von PMCA4b und nNOS und bestätigten so die gelungene Transfektion der Zellen. Jeweils gleiche Mengen Membranproteine der verschieden transfizierten Zellen wurden im Western-Blot mit dem monoklonalen JA3-Antikörper gegen PMCA (freundlicherweise von Adelaida G. Filoteo zur Verfügung gestellt) und dem polyclonalen R-20 Antikörper von Santa Cruz gegen nNOS analysiert. Das Ansteigen der Transfektionsmenge an PMCA-Plasmid zeigte sich in immer stärker werdenden Banden im Western Blot. Ebenso spiegelte sich die konstante Menge an NOS-Plasmid in einer wenig variierenden Stärke der nNOS-Bande wieder. Beide Banden erschienen in der zu erwartenden Höhe ihres Molekulargewichtes; PMCA4b bei 140 kDa und nNOS bei 160 kDa.

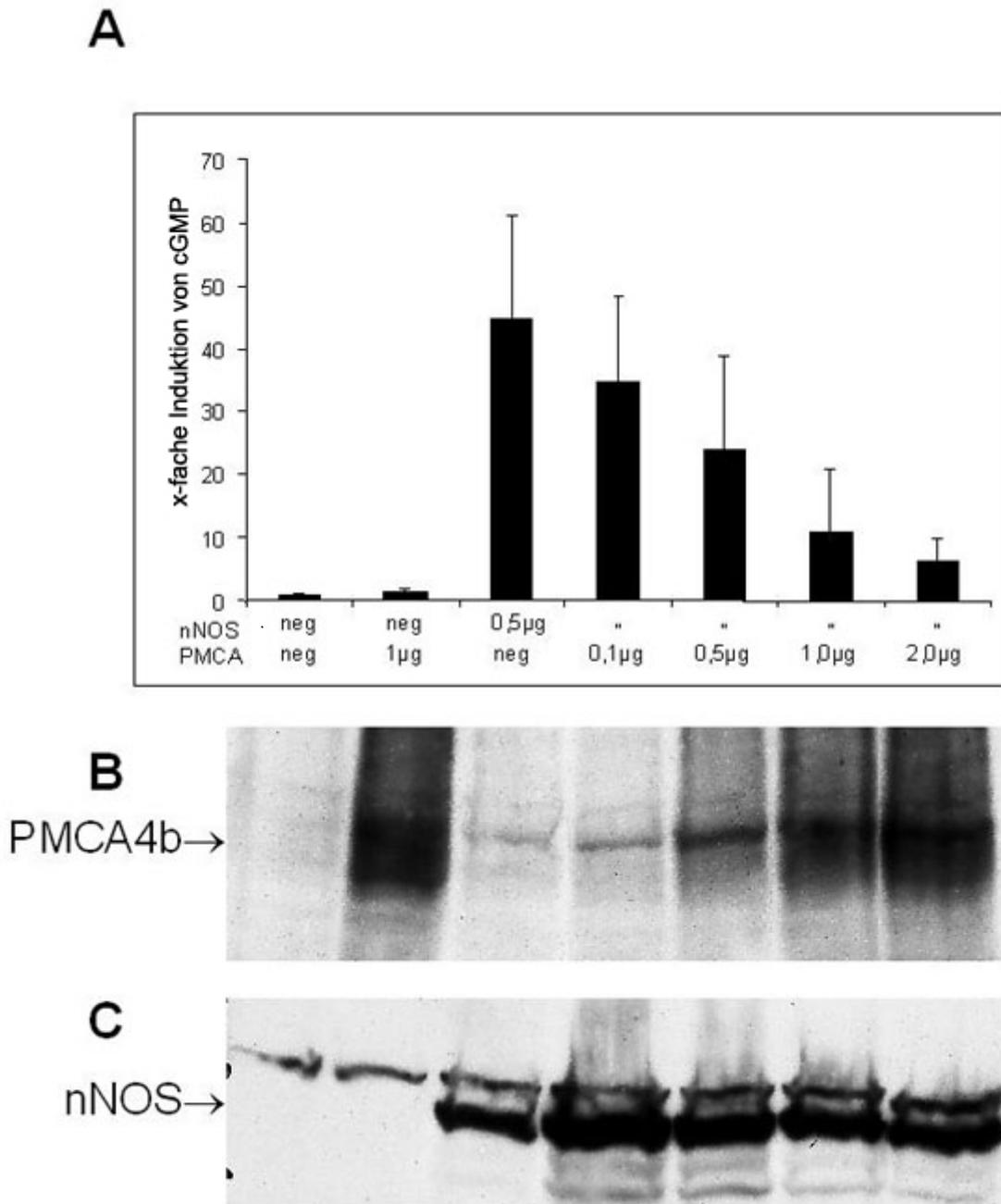


Abbildung 9A): Abnahme des cGMP-Levels von transfizierten HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von ihrer PMCA-Expression

Keine Veränderung der cGMP-Menge bei alleiniger Transfektion mit 1µg hPMCA4b-Expressionsvektor im Gegensatz zur vierundvierzig-fachen Erhöhung der cGMP-Konzentration bei alleiniger Transfektion mit 0,5µg nNOS-Expressionsvektor. Bei gleichbleibender nNOS-Expressionsvektorkonzentration sinkt die Induktion von cGMP mit steigender PMCA-Expressionsvektorkonzentration bei der Transfektion. (n=12)

B) Unterschiede in der Expression von PMCA in transfizierten HEK 293-Zellen im Western-Blot

Jeweils gleiche Mengen Proteinlysate der verschiedenen transfizierten Zellen wurden im Western-Blot mit dem monoklonalen JA3-Antikörper gegen PMCA analysiert. Untransfizierte HEK 293-Zellen exprimieren wenig PMCA (Spalte 1 und 3). Je mehr PMCA-Expressionsvektor transfiziert wird, desto stärker ist die Expression.

C) Expression von nNOS in transfizierten HEK 293-Zellen im Western-Blot

Die Membran aus Abbildung B) wurden mit dem polyclonalen R-20 Antikörper gegen nNOS analysiert. Untransfizierte HEK 293-Zellen exprimieren keine nNOS (Spalte 1 und 2). Bei gleichbleibender Menge an transfiziertem nNOS-Expressionsvektor bleibt die Stärke der nNOS-Banden annähernd konstant.

5 Diskussion

5.1 NOS in Kardiomyozyten

Bisher war nur aus Arbeiten von Lin und Silvagno bekannt, daß nNOS- μ , eine nNOS-Splicevariante, in Kardiomyozyten existiert (Silvagno *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1998). Die Gruppe um Lewis Becker hat nNOS in Vesikeln des Sarkoplasmatischen Retikulums von Kardiomyozyten mit Immunogoldfärbung nachgewiesen (Xu *et al.*, 1999).

Dazu wurden Zellfraktionen der Kardiomyozyten hergestellt und mit Antikörpern gegen SERCA, nNOS und Na⁺/K⁺-ATPase analysiert, wobei unterschiedlich große Goldpartikel an die Sekundärantikörper gekoppelt wurden. In der Plasmamembranfraktion wurde im Gegensatz zu der Vesikelfraktion keine nNOS entsprechenden Goldpartikel gefunden. Die Gruppe um Lewis Becker schloss aus den Ergebnissen, daß nNOS nicht in der Plasmamembran vorhanden ist, jedoch im Sarkoplasmatischen Retikulum vorkommt. Die Membranfraktion wurde durch die Na⁺/K⁺-ATPase als Kontrolle identifiziert. Die Na⁺/K⁺-ATPase kommt generell in der Plasmamembran vor, wurde bisher jedoch nicht in Caveolae nachgewiesen. Caveolae sind Vesikel ähnliche Kompartimente der Plasmamembran und kommen nach Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe in der Vesikelfraktion von Zellen vor. Kürzlich bestätigte die Arbeitsgruppe das Vorkommen von nNOS in der Plasmamembran von Kardiomyozyten (mündliche Mitteilung Kai Xu).

Die Gruppe um Ralph A. Kelly erwähnt explizit, daß sie kein nNOS-Protein in Immunoprecipitation von WT und eNOS^{null} Herzmuskelzellen der Maus finden konnten (Han *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels der Immunfluoreszenzfärbung der Nachweis von nNOS in Kardiomyozyten bestätigt werden. Außerdem zeigen die Daten des Western-Blots die nNOS-Expression auf Proteinebene der Zelle. Die Zellen wurden zweifelsfrei als Kardiomyozyten identifiziert, da sie als einzige Zellen im Herzgewebe Troponin T als Protein enthalten. In früheren Arbeiten wurde nNOS zwar auf Proteinebene mittels Western-Blot im Herzen gezeigt, aber die Proteinprobe wurde aus vollständigem Herzgewebe hergestellt (Lin *et al.*, 1998). Dabei wurde nicht nachgewiesen, ob nNOS aus den Kardiomyozyten, den glatten Muskelzellen der Gefäße oder den Neuronen des Herzgewebes stammt.

Das Vorkommen von nNOS in Neuronen ist schon seit langem bekannt (Bredt and Snyder, 1990).

Die Gruppe um Lue zeigte auch, daß die humane nNOS- μ Splicingvariante von nNOS im Herzen mit 160kDa Molekulargewicht im Gegensatz zu 155kDa von nNOS im Hirn größer ist (Lin *et al.*, 1998).

Das Vorhandensein der beiden anderen NOS-Isoformen, der endothelialen- und der induzierbaren NOS, in Kardiomyozyten ist schon seit langem bekannt. Sie konnte auch in dieser Arbeit mittels Western-Blot bestätigt werden. Verschiedene Gruppen wiesen die Steigerung der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase durch Zytokine, wie Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α , und Interferon- γ in Kardiomyozyten nach (Balligand *et al.*, 1994; Harding *et al.*, 1995; Shindo *et al.*, 1995).

Die genaue Regulation der endothelialen NO-Synthase ist noch unklar. Die Gruppe um Ralph Kelly beschrieb die Aktivierung der eNOS durch eine steigende intrazelluläre Kalziumkonzentration in isolierten adulten Rattenventrikelmyozyten durch elektrische Stimulation in vitro (Kaye *et al.*, 1996). Andere wiesen eine "Downregulation" von eNOS auf mRNA-Ebene in Kardiomyozyten durch Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach (Belhassen *et al.*, 1996).

Die Daten dieser Arbeit bestätigen nochmals das Vorkommen von allen drei NOS-Isoformen im Herzen. Deren genauen molekularbiologischen Mechanismen der Interaktion und ihre Aufgaben im Herzen sind weiterhin weitgehend unklar und müssen noch erforscht werden.

5.2 Veränderte NO-Produktion durch PMCA-Aktivität

NO-Messung

Um Hinweise auf ein verändertes NO-Produktionsverhalten durch PMCA-Einfluß zu erhalten, wurde die quantitative Menge des von der Zelle produzierten NO gemessen werden. Zur Etablierung des schwierigen Meßverfahrens wurden Vorversuche an N1E-Zellen durchgeführt, von denen bekannt ist, daß sie nNOS enthalten (Schwarz *et al.*, 1998). Die Daten ergaben jedoch keine sinnvoll auswertbaren Ergebnisse, da die NO-Produktion der Zellen außerhalb des sinnvollen Meßbereiches der Methode lagen und mit diesem Versuchsaufbau trotz Zugabe verschiedener Stimulanzen nicht erhöht werden konnten. Wahrscheinlich ist das sehr instabile NO zu schnell zerfallen, so daß falsch niedrige NO-Werte gemessen wurden (L.J. Ignarro, 1989). Durch Zugabe von

Superoxiddismutase, die die Weiteroxidation von Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit verhindert, könnte die Stabilität von NO erhöht werden, wie die Gruppe um Matthew Grisham beschrieben hat (Miles *et al.*, 1996) und wie es in späteren Versuchen angewendet wurde.

NOS-Aktivitätsmessung

Ein etwas anderer Ansatz zur Bestimmung eines verändertes NO-Produktionsverhalten durch PMCA-Einfluß ist die Messung der Enzymaktivität der NO-Synthase. Hierbei wird die Schwierigkeit der quantitativen NO-Messung, der schnelle Zerfall des entstehenden Stickstoffmonoxid, umgangen. Anhand der Kontrollversuche ist zu sehen, daß diese Methode gut funktioniert; gibt man einen Inhibitor der NOS z.B. NMMA auf die Zellen des Rattencerebellums - einer Positivkontrolle für nNOS -, sinkt die Enzymaktivität deutlich. An Kardiomyozyten konnten keine auswertbaren Resultate erhoben werden, da die Meßwerte unterhalb der Nachweisgrenze des Assays lagen. Dies kann verschiedene Gründe haben. Entweder ist die NOS-Äktivität der Kardiomyozyten zu gering um mit diesem Assay gemessen zu werden oder die NO-Synthase wurde zu schnell von Proteasen abgebaut, obwohl sie durch einen Proteaseinhibitor stabilisiert wurde. Am wahrscheinlichsten erscheint der Fehler in dem Schritt vorzuliegen, in dem das Reaktionsgemisch über einen Ionenaustauscher gegeben wird. Dort soll unverbrauchtes ³H-Arginin im Gegensatz zu entstandenen Citrullin gebunden werden.

Andere Gruppen konnten anhand der NOS-Aktivitätsmessung ihre Hypothesen bestätigen. So zeigte die Gruppe um Ralph A. Kelly Resultate in denen Carbachol, ein muskarinischer Azetylcholinrezeptoragonist, die eNOS-Aktivität in Herzmuskelzellen der Maus durch Interaktion erhöht (Han *et al.*, 1998).

cGMP-Messung

Aus den vorangegangenen Versuchen ist zu erkennen, daß Kardiomyozyten keine sehr hohe NOS-Aktivität aufweisen. Daher wurde der Umstand ausgenutzt, daß durch NO-Moleküle die Guanylatzyklase-Aktivität um das 400fache gesteigert wird (Schmidt HH *et al.*, 1993). Die Guanylatzyklase ist der nächste Schritt der NO-Signalkaskade. Die cGMP-Meßmethode wurde an neonatalen Ganzherzen von wildtypischen Ratten und

hPMCA4b-transgenen Ratten etabliert. Die Daten zeigen eine quantitativ signifikant ($p=0,028$; $n=8$) höhere cGMP-Produktion der transgenen Herzen, was als ein erster Hinweis auf ein durch PMCA verändertes NO-Produktionsverhalten zu deuten ist. Eine konstant erhöhte Expression der PMCA führt wahrscheinlich zu einer Reihe von adaptiven Prozessen in der Zelle.

Stimulierte Kardiomyozyten

Um dem Hinweis auf eine Interaktion von PMCA und nNOS weiter nachzugehen, wurde die cGMP-Produktion in einem Zellsystem an stimulierten Kardiomyozyten gemessen.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten aufgrund zu niedriger Meßwerte wurden die Versuchsbedingungen weiter verändert. Die Zugabe von Superoxiddismutase zu den Proben verhinderte den schnellen NO-Zerfall, IBMX (8-Methoxymethyl-3-Isobutyl-1-Methylxanthin), ein Phosphodiesterasehemmer, verlangsamte den Abbau von cGMP in der Zelle und L-Arginin führt zu einer "Substratsättigung" und damit zu einer substratunabhängigen Enzymaktivität (Miles *et al.*, 1996; Belhasen *et al.*, 1996). Durch diese Vorbehandlung der Zellen wurde die meßtechnisch benötigte Stabilität von NO bzw. cGMP bei einer Stimulationszeit der Zellen von 5min erreicht (Balligand *et al.*, 1993). Die Daten zeigen trotz der veränderten Versuchsbedingungen, daß Kardiomyozyten wenig NO produzieren und sich nicht gut stimulieren lassen. Dies macht sich bemerkbar an den relativ niedrigen cGMP-Konzentrationen zwischen 1 – 14 pmol/ml Probe. Die hohen Werte der Standardabweichungen spiegeln die Schwierigkeit, kleine Mengen des instabilen NO nachzuweisen.

Transfizierte Kardiomyozyten

Mit einem PMCA-Vektor transfizierte neonatale Kardiomyozyten exprimieren das Protein in größerer Menge. Daher wurde das Testsystem erneut gewechselt, um aussagekräftigere Daten in einem sinnvollen Meßbereich gewinnen zu können. hPMCA4b-transfizierte Kardiomyozyten zeigen eine absolut höhere cGMP-Konzentration als wildtypische Kontrollzellen bei der Transfektion. Relativiert man den Konzentrationsanstieg auf Kontrollzellen, so ist zu beobachten, daß die relative cGMP-Konzentrationszunahme der transgenen Kardiomyozyten niedriger ist als die der

wildtypischen Kardiomyozyten. Diese Beobachtung deutet auf einen Kompensationsmechanismus der PMCA-überexprimierenden Kardiomyozyten hin. Unter Berücksichtigung, daß eine Transfektion mit PMCA in beiden Kardiomyozytentypen die cGMP-Produktion senkt, läßt sich die Hypothese aufstellen, daß die PMCA die NO-Synthase im Sinne einer Hemmung beeinflusst. Die PMCA-überexprimierenden transgenen Kardiomyozyten könnten diese dauerhafte Hemmung der kalziumabhängigen NOS umgehen, indem sie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Ca^{2+} -/Calmodulin unabhängig ist, stärker exprimieren. Die Gruppe um Thomas Michel zeigte, daß e- und iNOS in Ratten-Kardiomyozyten vorkommen und daß spezielle Zytokine, selber Aktivatoren der iNOS, die endotheliale NO-Synthase in den Kardiomyozyten runterregeln (Balligand *et al.*, 1995). Dies könnte eine Ursache für den zu beobachtenden absoluten cGMP-Konzentrationsanstieg im Vergleich zu einer relativen cGMP-Konzentrationsverminderung der transgenen Kardiomyozyten sein. Eine ähnliche Beobachtung hat die Gruppe um Clarke an Dystrophin-defizienten-mdx-Mäusen gemacht. Sie beobachteten eine "Downregulation" der neuronalen NO-Synthase in Herzmuskelzellen von Dystrophin-defizienten-mdx-Mäusen bei einer gleichzeitig bestehenden Erhöhung der iNOS-Aktivität (Bia *et al.*, 1999).

Die Daten zeigen auch, daß eine Transfektion mit dem NOS-Vektor nur bis zu einer Konzentration von 0,5µg sinnvoll ist, da eine zu große NOS-Expression toxisch auf die Zellen wirkt, was sich durch sinkende cGMP-Konzentrationen darstellt. Die Toxizität von großen Mengen NO auf die Zellen ist schon mehrfach in der Literatur beschrieben worden (siehe Übersicht Bredt, 1999).

Die hohen Standardabweichungen der Daten sind auf die Schwankungen der Transfektionseffizienz der Kardiomyozyten zurückzuführen.

PMCA/nNOS Kotransfektion in HEK 293-Zellen

Um die Transfektionsdaten der Kardiomyozyten an einer als einfach und stabil transfizierbaren Zelllinie, den HEK 293-Zellen, zu bestätigen, wurden weitere Versuche in diesen Zellen durchgeführt. Wie schon die Daten der Transfektion von Kardiomyozyten zeigen die Ergebnisse der HEK 293-Zelltransfektion, daß die PMCA einen inhibierenden Einfluß auf die NO-Synthase ausübt. Mit nNOS-Expressionsvektor transfizierte Zellen besitzen eine 44-fach höhere cGMP-Konzentration als

untransfizierte Zellen. Wenn diese mit nNOS-Expressionsvektor transfizierten Zellen mit steigender Konzentration des PMCA-Expressionsvektors kotransfiziert werden, nimmt die cGMP-Konzentration dosisabhängig ab.

Die Daten legen die schon gewonnene Vermutung einer Inhibition von nNOS durch die PMCA nahe, wobei der genaue Mechanismus noch weiter erforscht werden muß. Von der PMCA ist bekannt, daß sie ihr C-Terminus an PDZ-Domänen anderer Proteine binden kann. Die Gruppe um Emanuel Strehler hat eine Bindung der PMCA4b über ihren C-Terminus an die PDZ-Domänen von Membran-assoziierten Guanylatkinase (MAGUK) Familien beschrieben (Kim *et al.*, 1998). Neuronale NO-Synthase besitzt eine PDZ-Domäne an ihrem N-Termini, mit der sie an Syntrophin bindet (Brenman *et al.*, 1996; Hillier, 1999). Syntrophin liegt oft im Komplex gebunden mit Dystrophin in der Zelle vor (Brenman *et al.*, 1995). Da der Dystrophinkomplex auch in Caveolae vorkommt, könnte die PMCA über diesen Komplex oder direkt eine Interaktion mit nNOS eingehen.

Dies impliziert eine direkte Regulation der neuronalen NO-Synthase, einer Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Form der NOS, durch die PMCA über eine Anpassung der lokalen Kalziumkonzentration. Eine Interaktion von PMCA und nNOS läßt weitere regulatorische Effekte auf andere Signaltransduktionsproteinen in den Caveolae vermuten.

Da die PMCA ein ubiquitär vorkommendes Enzym und die neuronale NO-Synthase in Nervenzellen und erregbaren Geweben weit verbreitet ist, ist die physikalische und funktionale Interaktion der beiden Proteine in vielen verschiedenen Zellen von grosser Relevanz.

6 Zusammenfassung

Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) ist neben dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für den Transport von Ca^{2+} aus der Zelle verantwortlich und somit essentiell für die Ca^{2+} -Homöostase. Die hohe Ca^{2+} -Affinität und relativ geringe Kapazität der PMCA legt nahe, daß die Kalzium-Pumpe hauptsächlich für die Feinregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) verantwortlich ist und somit ein Regulationsmechanismus für die Signaltransduktion der Zelle darstellt.

Die PMCA wurde biochemisch detailliert charakterisiert. In "nicht erregbaren Zellen" reguliert sie die Ca^{2+} -Homöostase der Zellen. In erregbarem Gewebe, wie z.B. Herzmuskelzellen, ist ihre physiologische Bedeutung nicht klar, da verschiedene Ca^{2+} -Transportsysteme die Regulation der intrazellulären Kalziunkonzentration beeinflussen. Verschiedene Arbeiten geben Hinweise auf eine Rolle der PMCA bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zellen.

Zur weiteren Aufklärung der molekularbiologischen Mechanismen der PMCA wurde Hinweisen auf eine mögliche Interaktion von PMCA und der neuronalen NO-Synthase (nNOS), einer Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Isoform, nachgegangen.

Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung und Western-Blot konnte gezeigt werden, daß nNOS in mit Troponin T gefärbten Kardiomyozyten vorkommt. Außerdem werden alle drei NO-Synthase-Isoformen (neuronale-, endotheliale- und induzierbare-) auf Proteinebene in Kardiomyozyten exprimiert.

Veränderungen der NO-Produktion der Zellen durch den Einfluss von PMCA wurden durch quantitative Bestimmung des "second messengers" zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), nachgewiesen. Humane PMCA4b überexprimierende Rattenherzen zeigen ex vivo eine signifikant ($p < 0,028$) höhere cGMP-Konzentration in myokardialen Gewebe als Kontrollrattenherzen. Dieses Ergebnis wird in mit humaner PMCA4b und nNOS transfizierten wildtypischen – und PMCA4b transgenen Kardiomyozyten bestätigt. Weiterhin zeigt sich eine Senkung der cGMP-Konzentration in den mit PMCA4b transfizierten Zellen gegenüber Kontrollzellen. Auffällig sind die absolut höheren Werte für die cGMP-Konzentration der PMCA-überexprimierenden transfizierten Kardiomyozyten im Gegensatz zu den niedrigeren Werten in der Darstellung der x-fachen Induktion von cGMP bezogen auf untransfizierte Zellen.

Die Resultate der Transfektion von HEK 293-Zellen mit PMCA4b und nNOS bestätigen die gewonnenen Ergebnisse. Je höher die PMCA-Konzentration während der Transfektion ist, desto niedriger wird die Induktion von cGMP bei gleichbleibender nNOS-Transfektionskonzentration.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die humane PMCA an der Regulation des NO-Signaltransduktionsweges im Sinne einer Inhibition von nNOS beteiligt ist, wie hier am Beispiel von HEK 293-Zellen gezeigt wurde. Die Ergebnisse von PMCA4b transgenen Kardiomyozyten lassen aufgrund ihrer absolut höheren, aber relativ niedrigeren cGMP-Werte im Vergleich zu wildtypischen Kardiomyozyten auf eine Anpassung der Zelle auf die Inhibition von neuronaler NOS schliessen.

In dieser Arbeit konnte die PMCA als ein Interaktionspartner und Inhibitor der neuronalen NO-Synthase in Kardiomyozyten identifiziert werden. Dies eröffnet neue Wege in der Verzahnung von Kalzium- und NO-abhängigen Signaltransduktionswegen.

7 Literaturverzeichnis

Ames JB, Dizhoor AM, Ikura M, Palczewski K, Stryer L (1999) Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 274:19329-19337.

Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:199-225.

Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:347-351.

Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T (1995) Nitric Oxide-dependent Parasympathetic Signaling Is Due to Activation of Constitutive Endothelial (Type III) Nitric Oxide Synthase in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 270:14582-14586.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmonds WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T (1994) Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes: characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* 269:27580-27588.

Belhassen L, Kelly RA, Smith TW, Balligand JL (1996) Nitric oxide synthase (NOS3) and contractile responsiveness to adrenergic and cholinergic agonists in the heart: regulation of NOS3 transcription in vitro and in vivo by cAMP in rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 97:1908-1915.

Bia BL, Cassidy PJ, Young ME, Rafael JA, Leighton B, Davies KE, Radda GK, Clarke K (1999) Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31:1857-62.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bredt DS (1999) Endogenous Nitric Oxide Synthesis: Biological Functions and Pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31:577-96.

Bredt DS and Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:682-685.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Dychenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752.

Brown BJ, Hilfiker H, De Marco SJ, Zacharias DA, Greenwood TM, Guerini D, Strehler EE (1996) Primary structure of human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3. *Biochem. Biophys. Acta* 1283:10-13.

Carafoli E (1994) Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 8:993-1002.

Carafoli E, Stauffer T (1994) The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of activity, and tissue specificity of isoform expression. *Journal of Neurobiology* 25:312-324.

Caroni P, Reinlib L, Carafoli E (1980) Charge movements during Na^+ - Ca^{2+} exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:6354-6358.

Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV (1989) Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341:68-72.

Clapham DE (1995) Calcium Signaling. *Cell* 80:259-268.

Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci* 95:2979-84.

Couet J, Li S, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP (1997) Molecular and cellular biology of caveolae: paradoxes and plasticities. *Trends in Cardiovasc. Med.* 7:103-110.

Dare E, Kifor O, Brown EM, Weber G (1998) Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C isozymes present in the bovine parathyroid and in human kidney HEK293 cells stably transfected with the human parathyroid Ca^{2+} -sensing receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 21:7-17.

Dhalla NS, Kaura D, Liu X, Beamish RE (1996) Mechanisms of subcellular remodelling in post-infarct heart failure. *EXS* 76:463-477.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271:22810-22814.

Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T (1998) Modulation of the endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Interaction in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 46:30249-30254.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/ nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1788-1792.

Fujimoto T (1993) calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell Biol.* 120:1147-1157.

Garcia-Cardena G, Martasek P, Siler Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997) Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin. *J. Biol. Chem.* 272:25437-25440.

Gerzer R, Hofmann F, Schultz G (1981) Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur.J. Biochem.* 116:479-486.

Goldspink PH, Russel B (1994) The cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74:1042-1049.

Goto Y, Yoshikane H, Honda M, Morioka S, Yamori Y, Moriyama K (1990) Three-dimensional observation on sarcoplasmic reticulum and caveolae in myocardium of spontaneously hypertensive rats. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 22:535-542.

Greeb J, Shull GE (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 264:18569-18576.

Guerini D, Schröder S, Foletti D, Carafoli E (1995) Isolation and characterization of a stable chinese hamster ovary cell line overexpressing the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 270:14643-14650.

Hammes A (1997) Funktionsanalyse der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase durch Überexpression im Zellmodell und im Myokard transgener Ratten *Dissertation Würzburg 1997*.

Hammes A, Oberdorf S, Strehler EE, Staufer T, Carafoli E, Vetter H, Neyses L (1994) Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *FASEB J.* 271:30816-30822.

Hammes A, Oberdorf-Maass S, Jenatschke S, Pelzer T, Maass A, Gollnick F, Meyer R, Afflerbach J, Neyses L (1996) Expression of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in myogenic cells. *J. Biol. Chem.* 271:30816-30822.

Hammes A, Oberdorf-Maass S, Rother T, Nething K, Gollnick F, Linz KW, Meyer R, Hu K, Han H, Gaudron P, Ertel G, Hoffmann S, Ganten U, Vetter R, Schuh K, Benkwitz C, Zimmer HG, Neyses L (1998) Overexpression of sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats. *Circ. Res.* 83(9):877-888.

Han X, Kubota I, Feron O, Opel DJ, Arstall MA, Zhao Y, Huang P, Fishman MC, Michel T, Kelly RA (1998) Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte $I_{\text{Ca-L}}$ is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6510-6515.

Harding P, Carretero OA, LaPointe MC (1995) Effects of interleukin-1 β and nitric oxide on cardiac myocytes. *Hypertension* 25:421-430.

Heim R, Iwata T, Zvaritch E, Adamo HP, Rutishauser B, Strehler EE, Guerini D, Carafoli E (1992) Expression, purification, and properties of the plasma membrane Ca^{2+} pump and of N-terminally truncated 105kDa fragment. *J. Biol. Chem.* 267:24476-24484.

Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 226:22789-22793.

Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Bredt DS, Lim WA (1999) Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex. *Science* 284:812-815.

Husain M, Jiang L, See V, Bein K, Simons M, Alper S, Rosenberg RD (1997) Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Am. J. Physiol.* 272:1947-1959.

Ignarro LJ (1989) Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 3:31-36.

Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 261:7236-7241,

Kaye DM, Wiviott SD, Balligand JL, Simmonds WW, Smith TW, Kelly RA (1996) Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78:217-224,

Keeton TP, Shull GE (1995) Primary structure of the rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A. *Biochem. J.* 306:779-785,

Kim E, DeMarco SJ, Marfatia SM, Chishti AH, Sheng M, Strehler EE (1998) Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase Isoform 4b binds to Membrane-associated Guanylate Kinase (MAGUK) Proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) Domains. *J. Biol. Chem.* 273:1591-1595,

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lee MR, Li L, Kitazawa T (1997) Cyclic Gmp causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272:5063-5068.

Lin CS, Lau A, Bakircioglu E, Tu R, Wu F, Week S, Nunes L, Lue TF (1998) Analysis of Neuronal Nitric Oxide Synthase Isoform Expression and Identification of Human nNOS- μ . *Biochem. Biophys. Res. Com.* 253:388-394 .

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000) Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52:375-414.

Mac Lennan DH, Brandt CJ, Korczak B, Greene NM (1985) Amino acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit musclesarcoplasmic reticulum, deduced from ist complementary DNA sequence. *Nature* 316:696-700.

Mann EA, Jump ML, Wu J, Yee E, Giannella RA (1997) Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:463-466.

Marietta MA (1994) Nitric oxide synthase: aspecte concerning structure and catalysis. *Cell* 78:927-930.

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272:15583-15586.

Michel T and Feron O (1997) Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases; Nitric Oxide Synthases: Wich, Where, How, and Why? *J. Clin. Invest.* 100:2146-2152.

Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB (1996) Modulation of Superoxide-dependent Oxidation and Hydroxylation Reactions by Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* 271:40-47.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93(2):215-28.

Montheith GR and Roufogalis BD (1995) The plasma membrane calcium pump – a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium* 18:459-470.

Nathan C and Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269:13725-13728.

Neyses L, Reinlib L, Carafoli E (1985) Phosphorylation of the Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 260:10283-10287.

Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger. *Science* 250:562-565.

Rothberg KG, Heuser FE, Donzell WC, Ying Y, Glenney JR, Anderson RGW (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-682.

Schatzmann HJ (1966) ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. *Experientia Basel* 22:364-368.

Schmidt HH und Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78:919-925.

Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U (1993) The nitric oxide and cGMP signal Transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem. Biophys. Acta* 1178:153-175.

Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstmann U, Murad F (1991) Purification of a soluble isoform of guanyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:365-369.

Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58:1155-1162.

Schwarz PM, Gierten B, Boissel JP, Forstermann U (1998) Expressional down-regulation of neuronal-type nitric oxide synthase I by glucocorticoids in N1E-115 neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 54:258-63.

Segal SS, Brett SE, Sessa WC (1999) Codistribution of NOS and Caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am. J. Physiol.* 277:H1167-H1177.

Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Dessai KM (1995) The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 270:17641-17644.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna S, Ying Y, Anderson RGW, Michel T (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 271:6518-6522.

Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K (1995) Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc. Res.* 29:813-819.

Shull GE, Greeb J (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 263:8646-8653.

Silvagno F, Xia H, Bredt D (1996) Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 271:11204-11208.

Silvagno F, Xia H, Bredt DS (1996) Neuronal Nitric-oxide Synthase- μ , an Alternatively Spliced Isoform Expressed in Differentiated Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 271:11204-11208.

Simpson P, Savion S (1982) Differentiation of rat cardiomyocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *Circ. Res.* 50:101-116.

Smallwood JI, Gügi B, Rasmussen H (1988) Regulation of erythrocyte Ca^{2+} -pump activity by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263:2195-2202.

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology* 19:7289-7304.

Southan GJ, Szabo C, Thiemermann C (1995) Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br. J. Pharm.* 114:510-516.

Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-936.

Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE (1994) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J. Biol. Chem.* 16;269:32022-32028.

Stone JR and Marletta MA (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33:5636-5640.

Strehler EE (1990) Plasma membrane Ca^{2+} pumps and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. *Seminars in Cell Biology* 1:283-295.

Strehler EE (1991) Recent advances in the molecular characterisation of plasma membrane Ca^{2+} -pumps. *J. Membrane Biol.* 120:1-15.

Strehler EE, James P, Fischer R, Heim R, Vorherr T, Filoteo AG, Penniston JT, Carafoli E (1990) Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 265:2835-2842.

Tobwin H, Staehlin T, Gordon J (1970) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997) Interaction of Neuronal Nitric-oxide Synthase with Caveolin-3 in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 272:28187-28190.

Verma AK, Enyedi A, Filoteo AG, Penniston JT (1994) Regulatory region of the plasma membrane calcium pump. *J. Biol. Chem.* 269:1687-1691.

Verma AK, Filoteo AG, Stanford DR, Wieben ED, Penniston JT, Strehler EE, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S, Page MA, James P, Vorherr T, Krebs J, Carafoli E (1988) Complete Primary Structure of a Human Plasma Membrane Ca^{2+} Pump. *J. Biol. Chem.* 263:14152-14159.

Xia H, Brecht DS (1996) Cloned and expressed nitric oxide synthase proteins. *Methods Enzymol.* 268:427-436.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Brecht DS, Becker LC (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natö. Acad. Sci.* 96:657-662.

Yoshida Y, Sun H-T, Cai J-Q, Imai S (1991) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca^{2+} -pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240 kDa protein. *J. Biol. Chem.* 266:19819-19825.

Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C (1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol. Chem.* 266:12544-12549

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Die Abkürzungen der SI-Einheiten werden als bekannt vorausgesetzt. Hier nicht aufgeführte Abkürzungen sind im Kapitel 8.2 bzw. 8.3 erklärt.

A23187:	4-Bromo-Kalzium Ionophore
AK:	Antikörper
BrdU:	Bromodesoxyuridin
BSA:	Bovines Serum Albumin
CaM:	Calmodulin
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂ :	Kohlendioxid
DAPI:	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
ECL:	enhanced chemoluminescence
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGTA:	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)tetraacetat
FCS:	Fetales Kälberserum
FITC:	Fluoreszin Isothiocyanat
GTP:	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HCl:	Salzsäure
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP:	Meerrettich-Peroxidase
IBMX:	8-Methoxymethyl-3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IONO:	Ionomycin
IP ₃ :	Inositol-trisphosphat
IU:	internationale Units
L-NAME:	N ω -nitro-L-arginine-methylester

MEM:	Minimum Essential Medium
MW:	Molekulargewicht
NADPH:	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte Form
NIO:	L-N ⁵ -(1-Iminoethyl)-Ornithin
NMMA:	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
NO:	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁺ :	Nitrit
NO ₃ ⁺ :	Nitrat
NOC18:	2,2-(Hydroxynitrosohydrazino)-bis-Ethanamin
NOS:	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS:	phosphate-buffered saline
Pen/Strept:	Penicillin/Streptomycin
PFA:	Paraformaldehyd
PMCA:	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
RT:	Raumtemperatur
SD:	Sprague Dawley
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SERCA:	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
Tris:	Trishydroxymethylamionomethan

8.2 Verwendete Lösungen und Puffer

a) Neonatale Kardiomyozyten:

Calcium- und Bicarbonat-freies Hanks mit Hepes (CBFHH), pH 7,4:

8 g/L NaCl (MW: 58,44), 0,4 g/L KCl (MW: 74,55), 0,2 g/L MgSO₄*7H₂O, 1 g/L D-Glucose, 0,06 g/L KH₂PO₄ (MW: 136,09), 0,048 g/L Na₂HPO₄ wasserfrei (MW:141,96), 4,77 g/L Hepes, pH 7,4, auf 1 L destilliertes H₂O auffüllen, Pen/Strept-Mischung.

Trypsin/DNase-Verdauungslösung:

150mg Trypsin, 1ml DNase (2ng/ml 0,15M NaCl), 100ml CBFHH.

Zellkulturmedium (MEM/5):

500ml Minimum Essential Medium (MEM), Pen/Strept-Mischung, 2,5ml Bromodeoxyuridin (BrdU) (6,14mg/ml H₂O), 0,5ml Vitamin B12 (2mg/ml H₂O), 5% FCS.

b) N1E 115-Zellenedium:

spezielles Medium siehe unter 3.2.3

c) HEK 293-Zellen:

Zellkulturmedium:

Phenolrothaltiges DMEM, 10% FCS, 1x nicht-essential Aminosäuren, 100 IU/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin.

d) Proteinextrakte aus Zellen:

RIPA-Puffer:

1xPBS, 1% Triton X-100, 1:25 Proteinaseinhibitorcocktail tablets.

e) Western-Blot:

5%iges Sammelgel:

1,25ml 0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8), 100µl 10% SDS, 850µl 30% Acrylamid/Bismethylenacrylamid, 2,85ml destilliertes H₂O.

50µl 10% Ammoniumpersulfat (APS), 5µl TEMED.

7,5%iges Polyacrylamid-Trenngel:

2,5ml 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 100µl 10% SDS, 2,5ml 30% Acrylamid/Bismethylenacrylamid, 4,85ml destilliertes H₂O.

50µl 10% APS, 5µl TEMED.

Laufpuffer, pH 8,3:

3g TRIS-Base, 6g Glycin, 1g SDS, auf 1L mit destilliertem H₂O aufgefüllt.

Transferpuffer, pH 8,3:

3,028g TRIS-Base, 14,419g Glycin, 200ml Methanol , auf 1L mit destilliertem H₂O aufgefüllt.

5x PBS, pH 7,4:

41,16g Na₂HPO₄ wasserfrei, 11,73g NaH₂PO₄ mit 5 H₂O , 20g NaCl, auf 1 L mit destilliertem H₂O aufgefüllt.

Blockierlösung, pH 7,16:

20ml 5x PBS, 5g Milchpulver, 100µl Tween 20, auf 100ml mit destilliertem H₂O aufgefüllt.

Waschlösung, pH 7,45:

200ml 5x PBS, 10g Milchpulver, 1ml Tween 20, auf 1 L mit destilliertem H₂O aufgefüllt.

f) Immunfluoreszenzfärbung:

Antikörper:

nNOS-AK, polyclonal: R-20, Santa Cruz, Nr. sc-648

TroponinT-AK, monoclonal: Sigma, Nr. T-6277

Anti-Rabbit TexasRed: Dianova, Nr. 111-075-144

Anti-Mouse IgM FITC Conjugate: Sigma, Nr. F-9259

Fixationslösung (2% PFA, pH 7,4)

Blockierlösung:

1% BSA, 0,1% Tween 20, 1xPBS.

g) NOS-Aktivität:

Homogenisations-Puffer, pH 7,4:

25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA, 1mM EGTA.

2x Reaktionspuffer:

50mM Tris-HCl (pH7,4), 6µM Tetrahydrobiopterin (BH₄), 2µM Flavin-adenin-dinucleotid, 2µM Flavin-adenin-mononucleotid.

Reaktions-Mix:

25µl 2x Reaktionspuffer, 5µl 10mM NADPH, 1µl [³H]Arginin (1µCi/µl), 5µl 6mM CaCl₂, 4µl destilliertes H₂O.

Stop-Puffer, pH 5,5:

50 mM HEPES, 5mM EDTA.

h) cGMP-Bestimmung:

Lockes-Puffer, pH 7,4:

154mM NaCl, 5,6mM KCl, 2mM CaCl₂ x 2H₂O, 1mM MgCl₂ x 6H₂O, 3,6mM NaHCO₃, 5,6mM Glucose, 10mM HEPES.

8.3 Materialien

Alle nicht im Folgenden erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad war mindestens „pro analysi“.

[³H]Arginin (1μCi/μl), Amersham

A 23187, Sigma B 7272

Acrylamid/ Bismethylenacrylamid, BioRad

anti-Kaninchen-Antikörper, Amersham

anti-Maus-Antikörper, Amersham

APS (Ammoniumpersulfat), BioRad

BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BioRad 500 0006

BrdU, Sigma B 5002

Bromphenolblau, Sigma

BSA, Sigma A 7906

cyclicGMP (low pH) Immunoassay (DE0550), R&D Systems

DMEM, Gibco-BRL 041-01885

DNase, Sigma DN 25

ECL-Kit, Amersham RPN 2106

EDTA, Sigma

FCS, Biochrom S-0115

FITC-anti-Maus-Sekundärantikörper, Sigma

Full range RainbowTM Molecular weight marker RPN 800, Amersham Life Science

Gentamycin, GibcoBRL

Heparin, Liquemin Roche

HEPES, Serva 25245

IBMX, Sigma S 687

Laemmli-Probenpuffer, BioRad

L-Arginin, Sigma

Lipofectamin PlusTM Reagenz, GibcoBRL

L-NAME, Calbiochem

Magermilchpulver, Freema

MEM, Sigma M 4780

Mercaptoethanol, Serva
monoklonaler TroponinT-Antikörper, Sigma T6277
Nitric Oxide Assay Kit ,Colorimetric (Nr. 482650), Calbiochem
Nitrozellulosemembran, BioRad
NOC 18, Calbiochem 487957
Non-essential amino acids, GibcoBRL
NOSdetect™ Assay Kit (Stratagene Nr. 850006KI01), Alexis
Objektträger, ICN Multitest slide
OptiMEM, GibcoBRL
PBS, Serva
Penicillin, GibcoBRL
Kulturschalen, Falcon
PFA, Sigma
polyklonaler nNOS-Antikörper, NOS1 R-20, Santa Cruz
Proteinaseinhibitorcocktail tablets, Boehringer Mannheim 1873580
SDS, Sigma L 4509
Sintillationsflüssigkeit, Amersham
β-NADPH, Sigma N 1630
Streptomycin, GibcoBRL
Superoxiddismutase, Roche Diagnostics
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin), BioRad
TexasRed-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper, Dianova
TRIS, Serva
Triton X-100, Sigma
Trypsin, Sigma T 8642
Trypsin/EDTA, GibcoBRL 35400-019
Tween 20, Sigma P 1379
Vectashield Mounting Medium H-1000, Vector Laboratories Inc.
Vitamin B12, Serva 38310
Whatman 3MM Papier, Whatman
x-ray Retina Film, Fotochemische Werke GmbH Berlin

8.4 Geräteverzeichnis

Confocal Laser Scanning System, MRC 1024, BioRad

Elektrophoresenetzgerät, LKB 2197, Pharmacia Uppsala, Schweden

Entwicklermaschine, Agfa

Folien-Schweißgerät, Blauring FS 500

Gelelektrophoresekammer, BioRad

Inkubator Zellkultur, Labotect Steri-Cult 200

Kulturschalen, Falcon

Küvetten (Bradford) 10x4x45mm, Saratedt No. 67.742

Lichtmikroskop, Axiovert 135, ZEISS

Mikroskop, Zeiss ICM 405

Pipetten, Eppendorf

Röntgenkassette, Amersham

Spectrophotometer UV-160, Shimadzu

β-Counter LS 6000 SC, Beckmann

Sterilbank Bio-Flow, anti air_{ZKB}, Bio-Flow

Western-Blot Gelkammer, BioRad

Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-Kammer), Fa. Brand

Zellstrainer, Falcon

Zentrifuge (groß), Beckmann CPKR

Zentrifuge(groß), Eppendorf 5415

Zentrifuge(klein) mit Festwinkelrotor, Sigma 2K15

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Prof. Dr. med. Ludwig Neyses (Universität Würzburg) für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Doktorarbeit und die uneingeschränkte Unterstützung im Verlauf der gesamten Promotion.

Kai Schuh und Nicola Röthlein danke ich besonders herzlich für die hilfreiche Zusammenarbeit und die Unterstützung mit vielen Anregungen und Hinweisen für die Arbeit im Labor.

Der gesamten Arbeitsgruppe von PD Prof. Dr. med. Ludwig Neyses möchte ich für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Myriam Telkamp
Schellerweg 59
52223 Stolberg

geboren am 12.10.1973 in Köln

ledig

Werdegang:

Seit Jan. 2002 Ärztin im Praktikum, Abt.
Orthopädie des Bethlehem
Krankenhaus, Stolberg

SS 95 - Studium der Medizin in Würzburg
WS 01/02 Abschluß:
November 2001: 3. Staatsexamen
September 2000: 2. Staatsexamen
August 1998: 1. Staatsexamen
März 1997: Physikum

WS 92/93 - Studium der Chemietechnik in
Dortmund
WS 94/95 Abschluß: Vordiplom

1983 - 1992 Gymnasium in Essen
Abschluß: Abitur

1979 - 1983 Grundschule in Essen