

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Kuhn

**„Die Rolle der PDE3 im cGMP/cAMP-Crosstalk in
NO-GC-defizienten Mäusen“**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Kaja Karlich

aus Bochum

Würzburg 2013

Referent : Univ.-Prof. Dr. Andreas Friebe

Koreferent : Univ.-Prof. Dr. Stefan Frantz

Dekan : Univ.-Prof. Dr. Martin Eilers

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2014

Die Promovendin ist Ärztin

für Dieter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg	1
1.2	Das Signalmolekül NO	1
1.3	NO-Bildung durch NO-Synthasen (NOS).....	3
1.4	Die sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP	3
1.5	Bildung von cGMP durch Guanylyl-Cyclasen.....	4
1.5.1	Die membrangebundene Guanylyl-Cyclase.....	4
1.5.2	Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase	5
1.6	cGMP-Effektorproteine	6
1.6.1	cGMP-abhängige Proteinkinasen	6
1.6.2	cGMP-regulierte Ionenkanäle	7
1.6.3	Phosphodiesterasen.....	7
1.7	Physiologie des NO/cGMP-Signalweges	8
1.7.1	NO/cGMP-Signalkaskade bei der Thrombozytenaggregation.....	9
1.7.2	NO/cGMP-Signalkaskade bei der Kreislaufregulation.....	9
1.8	Transgene Mausmodelle	11
1.8.1	KO-Mausmodell für die NO-GC	12
1.8.2	Zellspezifische KO-Modelle der NO-GC	12
2	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Chemikalien.....	16
3.2	Antikörper für Western-Blot	16
3.3	Verwendete Geräte	16
3.4	Isolierung von Organen sowie Thrombozyten aus der Maus.....	17
3.4.1	Präparation von Mäusen zur Gewinnung von Protein-Proben	17
3.4.2	Isolierung und Reinigung von Thrombozyten.....	17
3.5	Routinemethoden	18
3.5.1	Proteinbestimmung	18
3.5.2	Gelelektrophorese	18
3.5.3	Western Blot.....	18
3.6	Radioimmunoassay	19
3.6.1	Herstellung von radioaktiv markiertem cAMP und cGMP (Tracer)	19

3.6.2	Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von cAMP	19
3.7	Phosphodiesteraseaktivitätsassay	20
3.7.1	Herstellung von ³² P-cAMP	20
3.7.2	Bestimmung der cAMP-abbauenden Phosphodiesteraseaktivität	21
3.8	Organbad	21
3.8.1	Lösungen, Puffer	21
3.8.2	Einspannen und Messungen der Proben im Organbad	22
3.9	In vivo-Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz bei Mäusen	22
4	Ergebnisse	23
4.1	cGMP/cAMP-Crosstalk in NO-GC-defizienten Thrombozyten	23
4.1.1	PDE3-Expression in Thrombozyten von GCKO- und WT-Mäusen	23
4.1.2	Fehlende Inhibition der PDE3 durch fehlendes cGMP in GCKO-Thrombozyten	23
4.2	Die PDE3 im vaskulären System	25
4.2.1	PDE3-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur	25
4.2.2	Abnahme der PDE3-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur	28
4.2.3	PDE3-Aktivität in der glatten Gefäßmuskulatur	32
4.2.4	cAMP-Konzentration in der glatten Gefäßmuskulatur	32
4.2.5	Adenylyl-Cyclase-Aktivität in der glatten Gefäßmuskulatur	35
4.2.6	Sensitivität der glatten Muskulatur für den PDE3-Inhibitor Milrinon	37
4.3	Die PDE3 im kardialen System	37
4.3.1	Expression und Aktivität der PDE3 in Herzmuskelgewebe	37
4.3.2	Messung des systolischen Blutdrucks <i>in vivo</i>	41
4.3.3	Spezifisches Herzgewicht der Mäuse	41
5	Diskussion	46
5.1	Bedeutung der NO-GC für den cGMP/cAMP-Crosstalk in Thrombozyten	47
5.2	Bedeutung der PDE3 für die glatte Gefäßmuskulatur	48
5.3	Bedeutung der PDE3 in Herzgewebe	49
5.4	Bedeutung der PDE3 für den Blutdruck in GCKO- und SM-GCKO-Mäusen ..	50
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	54
8	Eigene Publikationen	63
9	Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylyl-Cyclase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNK	cyclisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle
CREB	cAMP-responsive-element-binding-protein
E. coli	Escherichia coli
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanylyl-Cyclase
GCKO	Guanylyl-Cyclase Knockout
GTP	Guanosintriphosphat
HZV	Herzzeitvolumen
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KO	Knockout
mGC	membrangebundene Guanylyl-Cyclase
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
NADPH	Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat
NANC-Neurone	nicht-adrenerge nicht-cholinerge Neurone
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NO-GC	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
NOS	NO-Synthase
PDE	Phosphodiesterase
PGE1	Prostaglandin E1
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PRP	plättchenreiches Plasma
SM-GCKO	Glattmuskel-spezifischer Guanylyl-Cyclase Knockout
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die Bedeutung der PDE3 für den cGMP/cAMP-Crosstalk.....	2
Abb. 2:	Generierung der verschiedenen KO-Mausmodelle.....	13
Abb. 3:	PDE3 Expression in Thrombozyten von GCKO- und Kontroll-Tieren.....	24
Abb. 4:	PGE1-induzierte cAMP-Synthese in Thrombozyten nach Präinkubation mit NO.....	26
Abb. 5:	PDE3-Expression in glatter Muskulatur der Aorta von GCKO-, SM-GCKO- und Kontroll-Tieren.....	27
Abb. 6:	Reduktion der PDE3-Expression in glatter Gefäßmuskulatur von SM-GCKO-Mäusen.....	29
Abb. 7:	Statistische Auswertung der in Abbildung 6 gezeigten Ergebnisse.....	30
Abb. 8:	Systolische Blutdruckwerte der SM-GCKO-Mäuse sowie deren Kontrollen.....	31
Abb. 9:	Basale PDE3-Aktivität in glatter Muskulatur der Aorta in GCKO- sowie SM-GCKO-Mäusen und deren Kontrollen.....	33
Abb. 10:	cAMP-Konzentration in glatter Muskulatur der Aorta von GCKO- und SM-GCKO-Mäusen sowie deren Kontrollen.....	34
Abb. 11:	cAMP-Konzentration in Aortenringen nach Stimulation der Adenylyl-Cyclase mit Forskolin.....	36
Abb. 12:	Relaxation glatter Gefäßmuskulatur der Aorta durch Milrinon.....	38
Abb. 13:	Statistische Auswertung der in Abb. 12 gezeigten Ergebnisse.....	39
Abb. 14:	PDE3-Expression in Herzmuskulatur von GCKO-, SM-GCKO- und Kontroll- Tieren.....	40
Abb. 15:	Basale PDE3-Aktivität in Herzmuskulatur von GCKO- und SM-GCKO-Mäusen sowie deren Kontrollen.....	42
Abb. 16:	Systolischer Blutdruck nach Milrinon-Gabe mit dem Trinkwasser.....	43
Abb. 17:	Spezifisches Herzgewicht der GCKO- und SM-GCKO-Mäuse sowie deren Kontrollen.....	44

1 Einleitung

1.1 Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen im Organismus beteiligt. Eine entscheidende Rolle nimmt die NO/cGMP-Kaskade im kardiovaskulären System bei der Gefäßrelaxation (Diamond et al., 1978; Schultz et al., 1978; Axelson et al., 1979) und bei der Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Böhme et al., 1974; Haslam et al., 1978; Mellion et al., 1981; Walter und Gambaryan, 2004) ein. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist der wichtigste Rezeptor für das freigesetzte Signalmolekül NO, welches über die Stimulation der Guanylyl-Cyclase eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration bewirkt (Förstermann et al., 1986; Ignarro et al., 1987) (Abb. 1). Daraus resultieren dann wiederum die für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Effekte.

1.2 Das Signalmolekül NO

Unter Normalbedingungen ist Stickstoffmonoxid (NO) ein Gas. In biologischen Systemen hat NO eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, sodass NO-Effekte lokal begrenzt sind. Das enzymatisch hergestellte NO wirkt sowohl intra- als auch extrazellulär, da es durch seine geringe Molekülgröße und seine Lipophilie ungehindert durch Zellmembranen diffundiert. Zusätzlich zu den bereits erwähnten kardiovaskulären Effekten ist NO im peripheren Nervensystem als Neurotransmitter nitrenger (ehemals nicht-adrenerger nicht-cholinerges NANC-) Neurone eingeschaltet. Dabei führt es zur Relaxation der glatten Muskulatur des Gastrointestinal-, Respirations-, Urogenitaltrakts sowie bestimmter Blutgefäße (Bult et al., 1990; Sanders und Ward, 1992, Groneberg et al., 2011). Auch bei der Regulation der tubulären Salz- und Wasser-Rückresorption scheint die NO-cGMP-Kaskade eine Rolle zu spielen (Zatz und deNucci, 1991). Unabhängig von der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase und der auf ihre Aktivierung folgenden cGMP-Synthese ist die Wirkung von NO in der Immunabwehr, bei der es durch extrem hohe, toxische Konzentrationen von NO zur Inaktivierung verschiedener zellulärer Enzyme kommt (Henry et al., 1993). Daneben kann NO weitere Reaktionen mit Häm-haltigen Proteinen und O₂-Radikalen eingehen und dadurch zur Nitrosylierung und Nitrierung führen, wie am Beispiel der Prostazyklinsynthese gezeigt wurde (Zou et al., 1998; Zou et al., 1999).

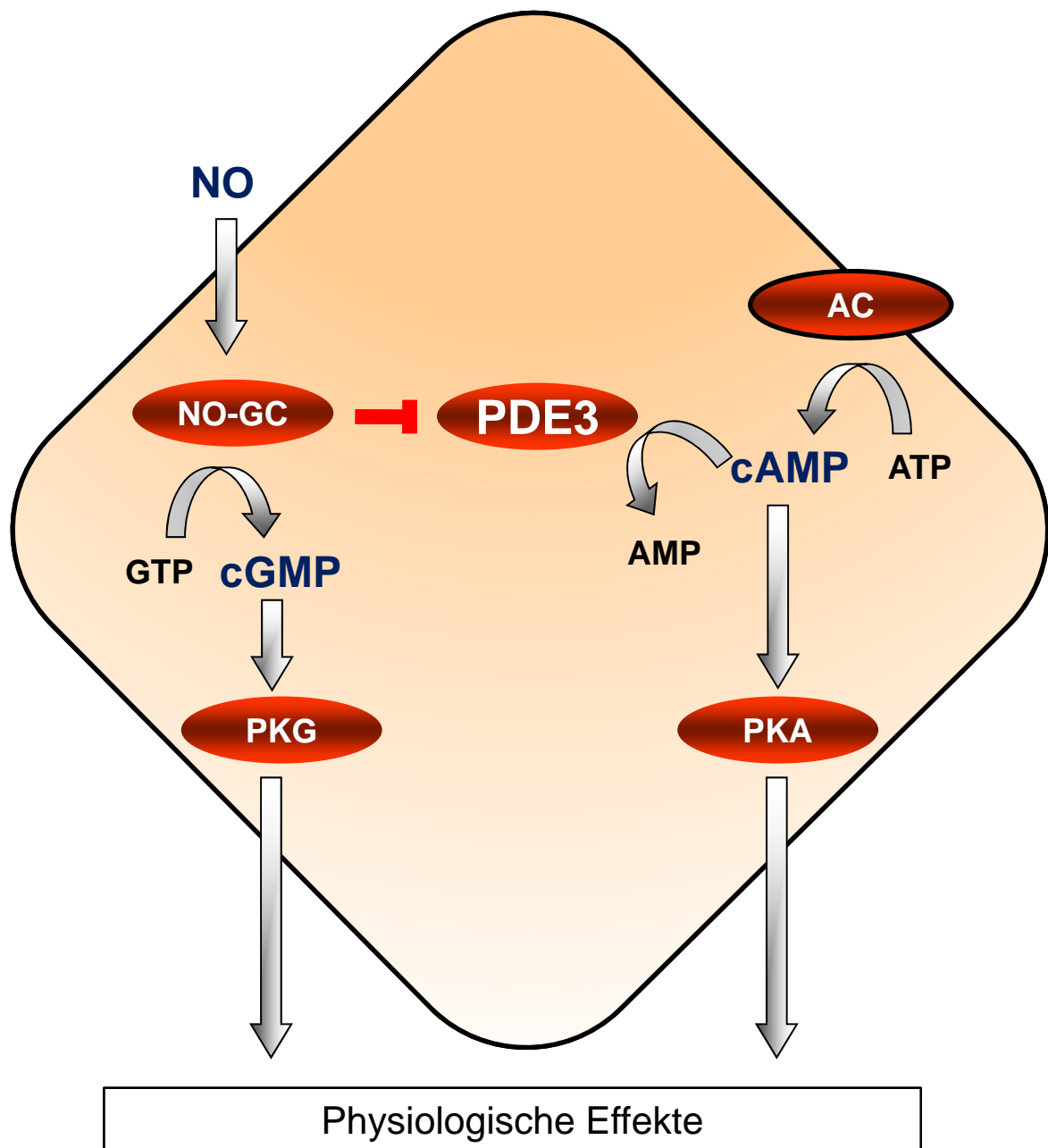


Abb. 1: Die Bedeutung der PDE3 für den cGMP/cAMP-Crosstalk

Die NO-induzierte Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) führt zu einer gesteigerten cGMP-Synthese. Der sekundäre Botenstoff cGMP bewirkt über eine Aktivierung der PKG verschiedene physiologische Effekte (z.B. Glattmuskel-Relaxation, vaskuläres Remodelling). Die Adenylyl-Cyclase synthetisiert aus ATP cAMP, welches durch die PDE3 abgebaut wird. cGMP hemmt die cAMP-abbauende PDE3 und damit den Abbau von cAMP. Die cAMP-Konzentration steigt und kann wiederum über die PKA weitere physiologische Effekte auslösen (z.B. Glucosefreisetzung aus Glykogen).

1.3 NO-Bildung durch NO-Synthasen (NOS)

Die NO-Synthasen katalysieren die endogene Bildung von NO (Knowles et al., 1989; Schmidt und Murad, 1991; Wei et al., 1995). Bisher sind drei Isoformen dieser Enzymfamilie bekannt, die alle als Homodimere vorliegen: eine neuronale NOS (nNOS), eine induzierbare NOS (iNOS) und eine endotheliale NOS (eNOS), die sich hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Regulation unterscheiden (Förstermann et al., 1991; Nathan et al., 1991; Murad et al., 1994). Ursprünglich wurde die nNOS im Gehirn und in neuronalen Gewebe identifiziert (Mayer et al., 1990; Bredt et al., 1990), die eNOS wurde in Endothelzellen (Gyurko et al., 2000) und die iNOS in Makrophagen beschrieben (Hevel et al., 1991; Stuehr et al., 1991; Yui et al., 1991). Mittlerweile ist bekannt, dass jede der NOS auch in anderen Zelltypen als denen, aus welchen sie zuerst isoliert werden konnten, vorhanden ist. Die NOS-Isoformen unterscheiden sich in Expression und Regulation. Die nNOS und die eNOS werden konstitutiv exprimiert und durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert. Beide Isoformen sind in ruhenden Zellen mit niedriger intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration inaktiv und weisen eine geringe Affinität zu Calmodulin auf. Wenn sich die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erhöht, bindet der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und beide NOS-Isoformen werden katalytisch aktiv. Die iNOS wird im Gegensatz dazu nicht konstitutiv exprimiert. Das Enzym hat Calmodulin dauernd gebunden und wird daher nicht durch Ca^{2+} reguliert (Alderton et al., 2001). Für die NO/cGMP-Signalkaskade spielt die iNOS keine Rolle. Diese Ca^{2+} -unabhängige induzierbare Isoform wird im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr, aber auch in der Leber, im Myokard, Pankreas und der Gefäßmuskulatur nach Induktion durch Cytokine und Bakterientoxine exprimiert und produziert sehr hohe cytotoxische NO-Konzentrationen.

Die katalytischen Eigenschaften der Isoformen sind nahezu identisch. Es erfolgt die oxidative Umsetzung aus L-Arginin zu L-Citrullin und NO. An der Reaktion sind ebenfalls die Cofaktoren Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavinadeninmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin beteiligt (Alderton et al., 2001).

1.4 Die sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP

Die Funktion cyclischer Nukleotide als Signalmolekül ist seit der Entdeckung des cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) generell anerkannt (Rall und Sutherland, 1958). cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) wurde als zweites cyclisches Nukleotid

nachgewiesen (Ashmann et al., 1963; Goldberg et al., 1969). cAMP sowie cGMP werden in fast allen Säugetiergeweben gebildet und sind als intrazelluläre Botenstoffe in zahlreichen Signaltransduktionskaskaden involviert, die in Abhängigkeit vom Gewebetyp variieren. Gesichert ist für das cGMP die Beteiligung an der Relaxation der glatten Muskulatur, Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Übertragung des Lichtreizes in der Retina sowie der Regulation der intestinalen und renalen Natrium- und Wasserresorption (Kots et al., 2009). Die cAMP-abhängigen Effekte werden durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt, so etwa die Regulierung des Gleichgewichts zwischen katabolen und anabolen Stoffwechselsituationen, außerdem die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Weiterhin ist der spezifischer Transkriptionsfaktor cAMP-responsive-element-binding-protein (CREB) das Bindeglied zwischen extrazellulären Signalen und der Aktivierung individueller Gene, die für die Langzeiterinnerung und die circadiane Uhr verantwortlich sind. Die zellulären und physiologischen Auswirkungen einer erhöhten Konzentration an sekundären Botenstoffen werden durch verschiedene Effektorproteine vermittelt. Dazu gehören Proteinkinasen und die Phosphodiesterasen (PDEs), welche den Abbau von cGMP und cAMP katalysieren (Abb. 1).

1.5 Bildung von cGMP durch Guanylyl-Cyclasen

Die Guanylyl-Cyclasen bilden zusammen mit den Adenylyl-Cyclasen die Familie der Nukleotid-Cyclasen, welche ihre jeweiligen Substrate GTP bzw. ATP zum entsprechenden cyclischen Nukleotid cGMP und cAMP umwandeln (Tesmer et al., 1998). Anders als die cAMP-bildende Enzymaktivität, die zunächst ausschließlich in der Plasmamembran gefunden wurde, konnte die cGMP-bildende Aktivität sowohl in membranfreien Überständen als auch an Membranen nachgewiesen werden (Hardman und Sutherland, 1969; Schultz et al., 1969; White und Auerbach, 1969). Daher wurde angenommen, dass es zwei verschiedene Enzymformen gibt, eine membranständige und eine cytosolische Guanylyl-Cyclase (Kimura und Murad, 1974; Garbers et al., 2006).

1.5.1 Die membrangebundene Guanylyl-Cyclase

Die membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen (mGC) gehören zur Gruppe der rezeptorgekoppelten Enzyme, die einmal durch die Membran ziehen; sie liegen als Homodimere oder möglicherweise als Oligomere vor (Iwata et al., 1991; Chinkers und Wilson, 1992; Lowe 1992). Der N-terminale, extrazelluläre Anteil der Rezeptoren ist für

die Ligandenbindung verantwortlich, darauf folgt eine die Zellmembran durchspannende Domäne. Der intrazelluläre Teil setzt sich aus einer Proteinkinase-Homologie-Region und der C-terminalen, cGMP-bildenden Region zusammen. Es wurden sieben verschiedene mGCs (GC-A - GC-G; Drewett et al., 1994; Kuhn 2009) identifiziert, die sich in erster Linie in ihrer Ligandenbindungsdomäne unterscheiden. Die GC-A wird in der Niere, der glatten Gefäßmuskulatur, der Nebenniere und anderen Geweben exprimiert. Ihre physiologischen Liganden sind das ANP (atriales natriuretisches Peptid) sowie das BNP (natriuretisches Peptid Typ B). ANP wird von atrialen Myokardzellen bei Dehnung des Vorhofgewebes ausgeschüttet und führt zu Vasodilatation, verstärkter Salz- und Wasserausscheidung, Hemmung der Aldosteron-Synthese und Renin-Freisetzung sowie zu einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate. Die hervorgerufenen Effekte wirken somit einem erhöhten Blutdruck und Blutvolumen entgegen. Die GC-B kommt in vielen Geweben vor und wird dort hauptsächlich in Fibroblasten exprimiert. Der Aktivator ist das C-Typ natriuretische Peptid, welches in Endothelzellen, Neuronen und Makrophagen synthetisiert wird. Die GC-C wird überwiegend im Intestinaltrakt, aber auch in Niere, Hoden, Plazenta und Leber exprimiert. Endogene Liganden sind Guanylin, Uroguanylin und Lymphoguanylin, denen eine Aufgabe innerhalb der Natriumhomöostase zugesprochen wird (Kuhn 2009). Als erster Ligand wurde das hitzestabile Enterotoxin STa identifiziert, das von *E. coli* gebildet werden kann und beim Menschen schwere sekretorische Diarrhöen auslöst (Field et al., 1978; Hughes et al., 1978). Für die anderen GC Isoformen sind bislang keine weiteren Liganden bekannt. GC-D wird im Riechepithel exprimiert, GC-E und GC-F in Photorezeptoren und im Corpus pineale, die GC-G kommt in der Lunge, im Intestinum sowie in der Skelettmuskulatur vor.

1.5.2 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) liegt als cytosolisches Protein vor und wird deswegen auch lösliche GC oder sGC ('soluble GC') genannt (Böhme et al., 1984; Koesling und Friebe, 1999). Mittlerweile konnte aber eine Isoform der NO-GC nachgewiesen werden, die auch membranassoziiert vorliegt (Russwurm et al., 2001). Die NO-GC konnte erstmals aus Rinderlunge gereinigt und als Häm-haltiges Protein identifiziert werden. Es wurde eine 200-fache Aktivierung des Enzyms durch NO gezeigt (Gerzer et al., 1981; Humbert et al., 1990; Stone und Maletta, 1995), die auf die Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe als Aktivierungsmechanismus zurückzuführen ist. Die NO-GC stellt den wichtigsten Rezeptor für das von der NOS

gebildete NO dar (Mergia et al., 2006; Friebe et al., 2007). Die NO-GC ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit, deren Sequenz bereits aufgeklärt werden konnte (Koesling et al., 1988; Nakane et al., 1988; Koesling et al., 1990; Nakane et al., 1990). Durch Homologiescreening wurden zwei weitere Untereinheiten, die α_2 -Untereinheit und die β_2 -Untereinheit identifiziert (Harteneck et al., 1991; Yuen et al., 1990). Um ein katalytisch aktives Enzym auszubilden, sind ein α - und eine β -Untereinheit erforderlich. Da der β_2 -Untereinheit keine physiologische Bedeutung zugewiesen wird, ergeben sich daher als funktionelle Dimere das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991) und das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer (Hartenecker et al., 1991). Die vorherrschende Isoform der glatten Muskulatur ist die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform, während die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform einer neuronalen Isoform entspricht (Mergia et al., 2003).

1.6 cGMP-Effektorproteine

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg übernimmt eine wichtige Rolle bei der Informations-Weiterleitung. Dabei trägt cGMP eine Schlüsselfunktion: Effektoren, die durch den zellulären cGMP-Spiegel beeinflusst werden, sind cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-regulierte Ionenkanäle und cGMP-abhängige Phosphodiesterasen.

1.6.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die Proteinphosphorylierung ist eine Möglichkeit der Signalweiterleitung, die sich in vielen intrazellulären Signalkaskaden findet. Dabei wird ein Phosphat-Rest auf bestimmte Aminosäureseitenketten übertragen, wodurch es zu einer Änderung der Aktivität von Enzymen oder Ionenkanälen kommen kann. Diese Reaktion wird von den Proteinkinasen katalysiert. Die cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden durch die Bindung von cGMP aktiviert. Bisher konnten zwei Gene identifiziert werden, die für die PKGI (Wernet et al., 1989) bzw. die PKGII (Jarchau et al., 1994) kodieren. Die PKG I liegt als lösliches Enzym vor, während die PKGII über eine N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert ist (Hofmann et al., 2000). Die PKGI kann in zwei Spleißvarianten (PKGI α und PKGI β) vorliegen, die sich lediglich strukturell in wenigen Aminosäuren unterscheiden (Hofmann et al., 2006). Die PKGs der Säugetiere konnten in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen unterschiedlicher Spezies nachgewiesen werden (Pryzwansky et al., 1995; Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2005). Die PKG I wird hauptsächlich in

Thrombozyten und in glatter Muskulatur von Gefäßen, Uterus, Darm und Trachea exprimiert (Keilbach et al., 1992). Außerdem konnte die PKGI im Gefäßendothel und in Lymphozyten (Pyrzwansky et al., 1995) nachgewiesen werden. Die PKGII wird im Gehirn, in der Dünndarm-Mukosa, der Niere, in den Chondrozyten und der Lunge exprimiert (Lohmann et al., 1997).

1.6.2 cGMP-regulierte Ionenkanäle

Ein weiterer Effektor der NO/cGMP-Signalkaskade sind cGMP-abhängige Kationen-Kanäle, die auch CNG-Kanäle (cyclic nucleotide-gated channels) genannt werden. Nach ihrer Aktivierung durch intrazelluläres cGMP ermöglichen diese Ionenkanäle den Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen in die Zelle (Biel et al., 1999). CNGs wurden zuerst in Fotorezeptorzellen (Fesenko et al., 1985; Yau und Nakatani, 1985) und in olfaktorischen Neuronen (Nakamura und Gold, 1987) nachgewiesen. Mittlerweile wurde auch das Vorkommen in anderen Geweben wie Darmepithel, Hoden, Ovar, Niere, Hirn und Herz (Distler et al., 1994) sowie in Spermatozoen (Weyand et al., 1994; Wiesner et al., 1998) bestätigt.

1.6.3 Phosphodiesterasen

Das über den NO/cGMP-Signaltransduktionsweg vermittelte cGMP-Signal wird durch den enzymatischen Abbau durch PDEs terminiert. Die Intensität und Dauer eines cAMP/cGMP Signals ist nicht nur von ihrer Bildung, sondern auch von der Aktivität der jeweils vorhandenen Phosphodiesterase abhängig, welche die Hydrolyse der cyclischen Nukleotide katalysiert. Aus cAMP und cGMP entstehen durch die Spaltung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe Adenosinmonophosphat (AMP) bzw. Guanosinmonophosphat (GMP), welche nicht die biologische Aktivität von cAMP und cGMP besitzen. Die bisher bekannten PDEs gehören 11 Familien (PDE1 - PDE11) an, wobei in jeder Familie unterschiedliche Isoformen und Spleißvarianten vorkommen. Diese Familien unterscheiden sich in ihrer Substrat- und Inhibitorspezifität, Regulation, zellulärer Lokalisation und Gewebeverteilung (Bender und Beavo, 2006). Die PDEs liegen, mit Ausnahme der PDE6, als Homodimere vor und bestehen aus mehreren konservierten Domänen, die jeweils für Lokalisation, Regulation und Katalyse verantwortlich sind. Durch ihrer unterschiedliche Substratspezifität lassen sich die PDEs in drei Gruppen einteilen: cAMP-spezifische PDE-Familien (PDE4, PDE7 und PDE8), PDE-Familien mit

gemischter Spezifität für cAMP und cGMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11) sowie cGMP-spezifische PDE-Familien (PDE5, PDE6 und PDE9). Sehr ausführliche Übersichtsarbeiten zu den PDE wurden durch Bender und Beavo (2006) oder auch durch Francis et al. (2011) verfasst.

Da sich diese Arbeit auf die Untersuchung der PDE3 konzentriert, wird im Folgenden lediglich auf diese Isoform detaillierter eingegangen. Die PDE3 gehört zu der PDE-Familie mit gemischter Spezifität. Die V_{max} Werte für cAMP sind 4 - 10 mal höher als für cGMP, sodass cGMP in der Anwesenheit von cAMP als kompetitiver Inhibitor der PDE3 wirkt. Deswegen wird die PDE3 auch cGMP-inhibierte cAMP-abbauende PDE genannt (Degerman et al., 1997). Nach Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade werden cGMP-Anstiege über die Inhibition der PDE3 in einen Anstieg der cAMP-Konzentration überführt, welche dann in einer Aktivierung der Proteinkinase A resultiert, siehe Abb. 1 (Manganiello et al., 1995; Conti et al., 1995; Beavo, 1995). Mit der PDE3A und der PDE3B konnten zwei Isoformen der PDE3 kloniert werden (Beavo, 1995), deren Gene auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Kasuya et al., 1995). Strukturell besteht kein Unterschied zwischen beiden Isoformen, jedoch werden sie Gewebe-spezifisch exprimiert: Die PDE3A findet sich vorwiegend in Thrombozyten, Herzmuskelzellen und glatter Gefäßmuskulatur (Reinhart et al., 1995). Eine medizinische Relevanz ergibt sich unter anderem durch den Arzneistoff Milrinon, ein spezifischer PDE3-Inhibitor, welcher zur Behandlung einer dekompensierten akuten Herzinsuffizienz eingesetzt werden kann. Die PDE3B hingegen wird überwiegend im renalen Sammelrohrepithel, in Spermatozyten, braunen und weißen Fettzellen sowie Hepatozyten exprimiert. Der PDE3B wird eine Rolle bei der Vermittlung antilipolytischer Effekte des Insulins zugeschrieben (Degermann et al., 1996; Makino et al., 1994; Belfrage et al., 1986; Smith et al., 1988).

1.7 Physiologie des NO/cGMP-Signalweges

Die Aktivierung der eNOS kann durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder durch Ca^{2+} -unabhängige Phosphorylierung erfolgen. Durch Bindung bestimmter Hormone (z. B. Bradykinin) an ihre Rezeptoren in der Plasmamembran der Endothelzellen wird über verschiedene Signalkaskaden eine Aktivierung der eNOS ausgelöst. Der wahrscheinlich wichtigste Stimulus für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Endothelzelle ist allerdings die auf die Gefäßwand wirkenden Scherkräfte, die durch den Blutfluss ausgeübt wird (Busse und Fleming, 2006). Dabei kommt es direkt oder indirekt zu einer Aktivierung unspezifischer Ca^{2+} -

permeabler Kationenkanäle (Nilius und Droogmans, 2001). Auf diese Weise kommt es zu einer kontinuierlichen Bildung von NO im Gefäßendothel und durch die Aktivierung der NO-sensitiven GC zu einer vermehrten cGMP-Synthese in der angrenzenden Gefäßmuskulatur und in Thrombozyten.

1.7.1 NO/cGMP-Signalkaskade bei der Thrombozytenaggregation

Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Abschnürung von Megakaryozyten. Sie werden im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz abgebaut. Thrombozyten weisen keinen Zellkern auf und sind dadurch nicht zur Neusynthese von Proteinen fähig. Bei einer Verletzung setzt die Hämostase, die Blutstillung ein. Durch die Entstehung eines Thrombus aus aggregierenden Thrombozyten wird die primäre Hämostase beendet und die sekundäre eingeleitet. Dabei adhären Thrombozyten an subendotheliales Bindegewebe, welches im Falle einer Gefäßläsion mit Blut in Kontakt tritt. An der Adhäsion und Aktivierung sind verschiedene Rezeptoren in der Thrombozytenmembran sowie extrazelluläre Faktoren beteiligt. Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten sind unter physiologischen Bedingungen streng reguliert. Über eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird in der ersten Phase der Hämostase die Thrombozytenaggregation initiiert. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer verstärkten Adhäsion von Thrombozyten und einer festen Vernetzung von Thrombozyten und Erythrozyten durch Fibrin-Fasern. Wird der erste Prozess, die intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung, gehemmt, ist die weitere Signalkaskade unterbrochen und es findet keine Thrombozytenaktivierung statt.

Im Endothel synthetisiertes NO diffundiert durch die Thrombozytenmembran und aktiviert die NO-sensitive GC, welche wiederum cGMP bildet. Der Botenstoffe cGMP führt über eine Aktivierung ihrer entsprechenden Kinase zu einer Reduktion der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle und verhindert somit eine Thrombozytenaggregation.

1.7.2 NO/cGMP-Signalkaskade bei der Kreislaufregulation

Die häufigsten Todesursachen in Industrieländern sind Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Daher sind Untersuchungen zu Pathomechanismen dieser Krankheiten wichtig, um Präventivmaßnahmen zu entwickeln oder neue medikamentöse Ansätze zu finden. Das Herz pumpt das Blut aus dem linken Herz

durch den Körperkreislauf und abschließend durch das rechte Herz in die Lunge, wo es oxigeniert wird. Das pro Zeit ausgeworfene Volumen ist das Herzzeitvolumen (HZV) und ergibt sich aus der Herzfrequenz und dem Schlagvolumen. Als Blutdruckamplitude wird die Differenz zwischen systolischem Druck in der Anspannungsphase und diastolischem Druck in der Entspannungsphase bezeichnet. Bestimmt wird der arterielle Blutdruck zum einen durch das Schlagvolumen und zum anderen durch die Dehnbarkeit, also der Relaxationsfähigkeit, der Arteriolen. Ein Ungleichgewicht zwischen der Relaxationsfähigkeit der Gefäßmuskulatur und dem Schlagvolumen resultiert in einer gesteigerten Blutdruckamplitude (Hypertonie), welche häufig zu einer Linksherzinsuffizienz führt und ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose mit ihren Folgen Myokardinfarkt und Schlaganfall darstellt.

Die Durchblutung der einzelnen Organe ist ihrer Lebensnotwendigkeit sowie ihrem aktuellen Belastungszustand angepasst. Das HZV kann durch Steigerung der Herzfrequenz und des Schlagvolumens um ein Vielfaches erhöht werden. Für die Steuerung der Organdurchblutung ist hauptsächlich die Gefäßweite verantwortlich, sodass die Relaxationsfähigkeit der arteriellen Gefäße für die Kreislaufregulation unbedingt entscheidend ist. Um eine optimale Anpassung der Organdurchblutung zu gewährleisten wird die Gefäßweite durch lokal-metabolische, hormonelle, zentrale und neuronale Mechanismen reguliert. Auf zentrale und neuronale Prozesse soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Die endogene Regulation des Blutdrucks erfüllt im Wesentlichen zwei Aufgaben. Zum einen muss bei wechselndem Blutdruck die Organdurchblutung konstant gehalten werden, zum anderen wird diese den entsprechenden Aktivitäts- bzw. Stoffwechselsituationen angepasst. Blutdruckbedingte Wanddehnungen kleiner Arterien werden reaktiv mit Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur beantwortet (Bayliss-Effekt).

Die Kontraktion der glatten Muskulatur beruht auf einer Interaktion der phosphorylierten MLC (Myosin-leichte-Kette) und Aktinfilamenten. Durch Bindung der Hormone Noradrenalin, Angiotensin II, Vasopressin, Endothelin-1, Serotonin und Thromboxan A₂ an ihre Rezeptoren werden G-Proteine aktiviert, welche über Botenstoffe die Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum initiieren. Durch eine Depolarisation an der Zellmembran öffnen sich Spannungs-abhängige Ca²⁺-Kanäle. Die MLC-Kinase wird daraufhin durch einen Ca²⁺/Calmodulin-Komplex aktiviert, was in einer verstärkten Phosphorylierung der MLC-Kinase resultiert (Somlyo und Somlyo, 2003). Der Phosphorylierungszustand der MLC kann auch Ca²⁺-unabhängig durch Serin/Threonin-Kinasen beeinflusst werden (Klages et al., 1999).

NO dagegen bewirkt eine Gefäßdilatation, wodurch die Perfusion und damit das Sauerstoffangebot gesteigert wird. Die Signalmoleküle cAMP und cGMP lösen eine Vasorelaxation aus. cAMP wirkt über eine PKA-vermittelte Hemmung der MLC-Kinase, was zu einer verringerten MLC-Phosphorylierung und damit zu einer Gefäßrelaxation führt. cGMP stimuliert die cGMP-abhängige-Proteinkinase, welche die MLC-Phosphatase phosphoryliert und somit die Aktin-Myosin-Interaktion reduziert (Lincoln et al., 1994).

1.8 Transgene Mausmodelle

Zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung eines Enzyms sind 'knock-out'-Tiermodelle besonders geeignet. Für das Verständnis der Funktion eines Genes *in vivo* ist die Inaktivierung oder Veränderung eines Genes durch Deletion bzw. Mutation und die Analyse der Auswirkungen auf den Organismus ein wichtiger Ansatz, mit dem man sich verspricht, die erhobenen Daten am Tiermodell auf den Menschen zu übertragen (Houdebine et al., 2007). Vorteile des Mausmodells sind die hohe Reproduktionsrate, ein geringer räumlicher Anspruch der Mäuse und geringe Kosten durch die Tierhaltung. Zudem haben 99% des Maus-Genoms ein entsprechendes Pendant im menschlichen Erbgut und 96% liegen sogar in ähnlichen Nachbarschaften vor (Waterson et al., 2002). Es existieren mehrere KO-Mauslinien, in welchen Komponenten der NO/cGMP-Signalkaskade ausgeschaltet wurden. Dazu zählen sowohl KO-Mausmodelle der drei Isoformen der NOS, die auch in Kombination deletiert wurden (Huang et al., 1993; Huang et al., 1995; Tranguch & Huet-Hudson, 2003; Morishita et al., 2005), als auch Mauslinien der PKG, bei der für die Isoformen der PKG I und PKG II defiziente Mauslinien existieren (Pfeifer et al., 1996; Pfeifer et al., 1998). Vor kurzem wurde eine Mauslinie generiert bei der durch Deletion der β_1 -Untereinheit ein vollständiger NO-GC erzeugt wurde (Friebe et al., 2007).

Wie nachfolgend beschrieben spielt der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der NO-induzierten Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Blutdruckregulation durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Daher werden nur die spezifischen Mausmodelle erläutert, mit denen im Rahmen in dieser Untersuchungen gearbeitet wurde.

1.8.1 KO-Mausmodell für die NO-GC

Die NO-GC ist ein Heterodimer aus einer α -Untereinheiten und einer β -Untereinheit. Bei der Deletion der β_1 -Untereinheit zeigte sich, dass es ebenfalls zu einer Reduktion der α -Untereinheiten kam. Die Deletion der β_1 -Untereinheit führt somit zu einem vollständigen Knockout, daher wird diese Knockout-Maus im folgenden GCKO genannt. NO-GC-defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine verminderte Lebenserwartung und eine starke Wachstumsretardierung aus (Friebe et al., 2007). Sie sind im Vergleich zu WT-Mäusen um ca. 30% kleiner. Über 80% der Mäuse sterben innerhalb der ersten 3 Tage nach der Geburt. Die übrigen sterben zwischen der 3. und 5. Woche aufgrund der Nahrungsumstellung nach Absetzen von der Mutter. Die Darmpassagezeit der GCKO ist drastisch verlängert, was auf eine reduzierte gastrointestinale Motilität hinweist. Durch die Fütterung einer ballaststofffreien Diät konnte die Überlebensrate der Tiere gesteigert werden. Adulte Tiere weisen eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks von 30 mmHg im Vergleich zu WT-Geschwistertieren auf. Untersuchungen der Aorta im Organbad zeigten, dass eine NO-stimulierte Relaxation der glatten Muskulatur nicht stattfindet. Diese Befunde unterstreichen eine wichtige Funktion der NO-GC in glatter Gefäßmuskulatur (Abb. 2). Weiterhin wurde gefunden, dass die NO-GC in Mäuse-Thrombozyten der einzige NO-Rezeptor ist, der die Calcium-Ausschüttung beeinflusst. Eine Deletion des Enzyms bewirkt daher eine Störung der Thrombozyten-Aggregation, da diese weniger Vesikel mit weiteren aggregierenden Faktoren freisetzen. Eine Deletion der NO-GC führt somit zu einer Störung der primären Hämostase (Dangel et al., 2010).

1.8.2 Zellspezifische KO-Modelle der NO-GC

Um die Funktion der NO-GC und die physiologischen Mechanismen in glatter Muskulatur detaillierter untersuchen zu können, wurde eine KO-Mauslinie generiert, bei der lediglich glatte Muskelzellen für die NO-GC defizient sind (SM-GCKO). Dazu wurden Mäuse mit dem cre/loxP-Recombinasesystem verwendet. Das Exon 10, welches für einen Teil der NO-GC kodiert, wurde mit spezifischen DNA-Sequenzen, sogenannten loxP-Sequenzen, flankiert (gefloxt). Die cre-Rekombinase schneidet den DNA-Abschnitt zwischen den loxP-Sequenzen aus. Um die cre-Rekombinase zu aktivieren, wird den Mäusen Tamoxifen, ein Antiestrogen, intraperitoneal injiziert. Tamoxifen bindet an ein Fusionsprotein bestehend aus der cre-Rekombinase und einem modifiziertem Estrogen-Rezeptor. Durch Bindung des Antiestrogens Tamoxifen

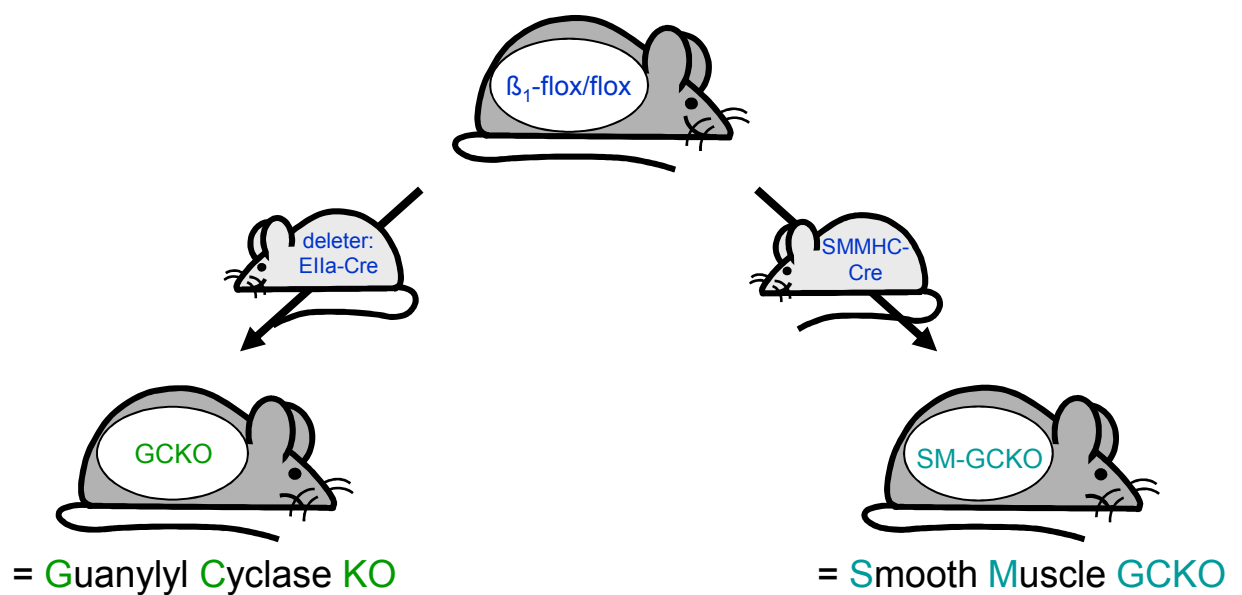


Abb. 2: Generierung der verschiedenen KO-Mausmodelle

Durch Deletion der β_1 -Untereinheit der NO-GC wurde ein vollständiger NO-GC-Knockout (GCKO) erzeugt. Dazu wurde eine Maus mit dem geflochten Exon 10 der NO-GC (β_1 -flox/flox) mit einer Maus verpaart, welche die cre-Recombinase ubiquitär exprimiert. Außerdem wurde eine KO-Mauslinie generiert, bei der lediglich glatte Muskelzellen für die NO-GC defizient sind (SM-GCKO). Eine Maus mit dem geflochten Exon 10 der NO-GC (β_1 -flox/flox) wurde mit einer Maus verpaart, welche die cre-Recombinase ausschließlich in glatten Muskelzellen enthielt. Durch Tamoxifen-Injektion gelangt die cre-Recombinase mit dem gebundenen Tamoxifen als Fusionsprotein in den Zellkern und es kommt zu dem spezifischen DNA-Ausschnitt.

wird das Fusionsprotein aktiviert und gelangt aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Die cre-Rekombinase wird unter der Kontrolle des Glatt-Muskel-spezifischen Promotors (smooth muscle myosin heavy chain; SMMHC) exprimiert, wodurch der spezifische Ausschnitt in glatten Muskelzellen zustande kommt (Abb. 2). Es konnte gezeigt werden, dass nach der Deletion der NO-GC in der glatten Muskulatur sowohl eine Erhöhung der cGMP-Konzentration als auch eine Relaxation der Aorta durch NO nicht mehr auslösbar ist. Die transgenen Mäuse entwickeln 3-4 Wochen nach Tamoxifen-Injektion einen Hypertonus. Da beide Mauslinien, sowohl die globalen GCKO- als auch die induzierbaren SM-GCKO-Mäuse einen identischen Blutdruckanstieg von 30 mmHg aufweisen, kann das Fehlen der NO-GC in der glatten Muskulatur als alleiniger Mechanismus zur Entwicklung eines Bluthochdrucks angesehen werden (Groneberg et al., 2010).

2 Zielsetzung

Die NO/cGMP-Signalkaskade und damit cGMP als Effektor-Molekül hat im menschlichen Organismus eine wichtige Bedeutung und ist an der Regulation von vielen unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt. Auch der second messenger cAMP ist in eine Vielzahl von Signalkaskaden involviert. Eine Schnittstelle zwischen beiden cyclischen Nucleotiden und ihren Signalkaskaden bildet die cAMP-abbauende PDE3, welche durch cGMP inhibiert wird. Die Existenz von Mausmodellen, in denen die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase in allen Geweben (GCKO) oder ausschließlich in glatten Muskelzellen (SM-GCKO) deletiert ist, bietet die hervorragende Möglichkeit, den Einfluss von cGMP auf die Expression und Aktivität der PDE3 und damit den cAMP-Abbau zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit soll mit Hilfe dieser KO-Mauslinien der Crosstalk der cGMP-Signalkaskade und cAMP untersucht werden. Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet demnach die

1. Untersuchung der Expression und Aktivität der PDE3 in GCKO-Thrombozyten im Vergleich zu WT-Thrombozyten.
2. Untersuchung der Expression und Aktivität der PDE3 in glatter Gefäßmuskulatur und Herzgewebe. Hierfür stehen zum einen die GCKO-Mäuse, zum anderen die SM-GCKO-Mäuse zur Verfügung.
3. Analyse funktioneller Aspekte einer quantitativ veränderten PDE3 mittels *in vivo*-Versuchen an GCKO-Mäusen und SM-GCKO-Mäusen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carbachol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milrinon	Firma Axxora, Grünberg
Penylephrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prostaglandin E ₁	Firma Axxora, Grünberg

Alle weiteren Substanzen, welche im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden, lagen in Analysequalität vor.

3.2 Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
PDE3	1 : 300	eigene Herstellung
NO-GC- β_1	1 : 1000	eigene Herstellung
ERK	1 : 500	Cell Signaling, Danvers (USA)
β -Tubulin	1 : 1000	Cell Signaling, Danvers (USA)
GAPDH	1 : 10 000	Cell Signaling, Danvers (USA)

3.3 Verwendete Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma
Plotter	B. Braun	Melsungen
Lichtisolierte Kammer	Biochem TM GDS 8000 System	UVP
CCD-Kamera	QuickStore	MS-Laborgeräte
Organbad	Multi Myograph Model 610M	Danish Myo Tech.
Blutdruckmessgerät	BP-98A	Softron
Herzfrequenz Messung	ECGenie	Mouse Specifics Inc.

3.4 Isolierung von Organen sowie Thrombozyten aus der Maus

3.4.1 Präparation von Mäusen zur Gewinnung von Protein-Proben

In dieser Arbeit wurden Gewebe von WT-Mäuse sowie von Mäuse aus der GCKO-Linie als auch aus der SM-GCKO-Linie verwendet. Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation betäubt und anschließend dekapitiert. Über einen Mittelbauchschnitt wurde der Peritonealraum und die Thoraxhöhle eröffnet. Herz und Aorta wurden entnommen und direkt in Krebs-Henseleit-Lösung überführt. Das Herz wurde durch einen Herzspitzenschnitt eröffnet und durch vorsichtiges Spülen mit Krebs-Henseleit-Lösung von möglicherweise entstandenen Koageln sowie Blutresten befreit. Die großen Herzgefäße wurden muskelnah abgesetzt. Die Aorta wurde ebenfalls in Krebs-Henseleit-Lösung von anhaftendem Fett- und Bindegewebe sowie von Blut befreit.

Waren die Proben für Westen-Blot oder Phosphodiesteraseaktivitätsassay bestimmt, wurde zu den Herz-Proben das 5-fache Volumen des Gewichtes und zu den Aorten 200 µl Homogenisationspuffer zugegeben und in einem Plotter verarbeitet (25 Hübe Glas/Glas, 600 U/min, RT). Anschließend wurde das entstandene Homogenat zentrifugiert (10 min, 800 x g, 4°C), um nicht-homogenisierte Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt und als Homogenat verwendet.

Sollten cAMP-Konzentrationen mittels Radioimmunoassay ermittelt werden, so wurden die Proben direkt nach der Präparation in Flüssigstickstoff schockgefroren. Das Homogenat wurde in einem Plotter (B.Braun, Melsungen) mit 50 µl gekühltem Ethanol (25 Hübe Glas/Glas, 600 U/min, Eisbad) erstellt und anschließend zentrifugiert (30 min, 15000 x g, 4°C). Der Überstand wurde eingedampft (100°C) und das so entstandene Pellet für den Radioimmunoassay verwendet.

3.4.2 Isolierung und Reinigung von Thrombozyten

Die verwendeten Mäuse wurden mit Diethylether narkotisiert. Das Blut (ungefähr 800 µl) wurde aus dem Orbitalsinus mit einer Glaskapillare entnommen und in einem mit 200 µl Heparin (50 U/ml) gefüllten Reaktionsgefäß gesammelt. Das Blut wurde mit 1 ml PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) versetzt und zentrifugiert (5 min, 50 x g, 20°C). Die obere Phase wurde als Plättchen-reiches-Plasma (PRP) abgenommen und die untere Phase wurde entsprechend dem zuvor abgenommenen Volumen mit PBS versetzt und erneut zentrifugiert. Das gesammelte PRP wurde erneut zentrifugiert (10 min, 700 x g, 20°C)

und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Thrombozyten wurden schließlich in Wasch-Puffer resuspendiert. Für den Western-Blot und den Phosphodiesteraseassay wurde die Thrombozytenkonzentration auf 30 Mio. Thrombozyten/ml eingestellt.

3.5 Routinemethoden

3.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde entweder mittels der Methode nach Bradford (1976) oder nach der BCA-Methode ('bicinchoninic acid'; Smith et al., 1985) gemäß den Herstellerangaben (Pierce) durchgeführt.

3.5.2 Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Der SDS-haltige Probenpuffer für die Gelelektrophorese enthielt 10 % (v/v) Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 62,5 mM Tris, pH 6,6.

3.5.3 Western Blot

Western-Blots (Towbin et al., 1979) wurden im Anschluss an eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli et al., 1970) in Mini-Gelkammern (Mini-Protean II Cell, Biorad) durch den elektrischen Transfer der Proteine (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) durchgeführt. Nach Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern erfolgte eine zweite Inkubation mit einem sekundären, immunglobulin-spezifischen Antikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Als Substrat wurde das 'Biowest extended duration bioluminescence detection kit' (UVP) verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit einer 16-bits CCD-Kamera in einer lichtisolierten Kammer (Biochemi™ GDS 8000 System, UVP). Zur quantitativen Auswertung wurde ein für das jeweilige Gewebe spezifisches house-keeping Gen detektiert und die Proteinmenge densitometrisch bestimmt. Alle Angaben sind soweit nicht anders beschrieben, relative Einheiten.

3.6 Radioimmunoassay

3.6.1 Herstellung von radioaktiv markiertem cAMP und cGMP (Tracer)

Die Herstellung von radioaktiv markierten cyclischen Nukleotiden wurde nach der Chloramin T (N-chlor-Toluol-Sulfonamid Natrium)-Methode (Hunter und Greenwood, 1964; Steiner et al., 1972) vorgenommen. Dabei wird der Tyrosinmethylester von 2'-Succinyl-cGMP/cAMP (Sc-cGMP/cAMP-TME) am aromatischen Ring des Tyrosylrests durch eine elektrophile Substitution mit ^{125}I od markiert. Der Reaktionsansatz enthielt dabei 36,5 μl Phosphatpuffer (500 mM, pH 7,4), 5 μl 160 μl Sc-cGMP/cAMP-TME (800 pmol) und 9,5 μl $\text{Na}^{125}\text{-I}$ (37 MBq bzw. 400 pmol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 1,8 μM Chloramin-T (90 mmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) gestartet (100 μl Gesamtvolumen) und nach 45 Sekunden durch Zugabe von 100 μl 2,6 μM Na-Metabisulfit (260 nmol) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) gestoppt. Durch Chloramin-T wird das Iodid zu molekularem Iod (I_2) oxidiert, welches an mehreren Positionen des aromatischen Rings (bevorzugt in ortho-Position zur OH-Gruppe) Reaktionen eingehen kann (elektrophile Substitution). Die Zugabe von Na-Metabisulfit stoppt die Reaktion durch Reduktion des molekularen Iods zu Iodid. Die Reinigung des iodierten Produkts (Tracer) erfolgte über eine Anionenaustauschsäule (QAE-25 Sepharose, 9 x 10 cm), die mit 50 mM Ammoniumformiat (pH 6) äquilibriert wurde. Vor dem Auftragen auf die äquilibrierte Säule wurde dem Reaktionsgemisch 100 μl Wasser zugegeben, um die Ionenstärke zu verringern. Die Elution erfolgte mit 250 mM Ammoniumformiat (pH 6) bei einer Durchflussrate von ca. 2 ml/min. Es wurden 30 Fraktionen zu je 4 ml gesammelt, von denen je 5 μl abgenommen und im γ -Zählgerät gemessen wurden. Die Fraktionen, die eine spezifische Aktivität von mehr als 10^5 cpm aufwiesen, wurden vereinigt, im Verhältnis von 1:1 mit n-Propanol verschnitten, um die Autoradiolyse zu verlangsamen, und danach bei -20°C gelagert.

3.6.2 Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von cAMP

Der RIA ist eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen an cAMP und cGMP. Mittels spezifischer Antikörper gegen das zu bestimmende Substrat und eine bekannte Menge eines radioaktiv-markierten Tracers kann nach einer Inkubationszeit die gesuchte Antigenkonzentration aus der Strahlungsaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes ermittelt werden. Über eine Standardkurve, die mit bekannten Mengen von nicht markiertem cAMP/cGMP und den gemessenen Zerfällen erstellt wird, kann der cAMP- und cGMP-Gehalt einer unbekannt Probe ermittelt werden.

Die Behandlung der Proben und die Durchführung des Radioimmunoassays richteten sich nach der Methode von Steiner (1972). Die getrockneten Überstände der Gewebehomogenate und Thrombozyteninkubation wurden mit 100 µl RIA-Puffer resuspendiert und mit 3 µl eines Gemisches aus Triethylamin und Acetanhydrid (2:1) acetyliert. Dadurch wurde die Sensitivität der Proben für die spätere Antikörperbindung um das 40fache erhöht (Harper und Brooker, 1975). 10 µl der Proben wurden in Polypropylenröhrchen überführt und mit 50 µl RIA-Puffer und 100 µl des in Schweine- γ -Globulin (0,5 mg/ml) verdünnten Antiserums (final 1:200.000) versetzt. Das γ -Globulin soll die Adsorption des Antikörpers an die Wände der Polypropylenröhrchen verhindern. Anschließend wurden 40 µl des Tracers (in Reaktionspuffer) hinzugefügt. Das Gemisch inkubierte für 16 - 20 Stunden bei 4 °C. Zur Trennung von freiem und gebundenem cAMP wurde das im Reaktionsansatz befindliche Protein durch Zugabe von 3 µl Polyethylenglykol-Puffer (16 % PEG 6000 in 10 mM Tris/HCL, pH 7,5) gefällt. Hierzu wurden zunächst 50 µl einer 0,8 %-igen Schweine- γ -Globulin-Lösung (in Reaktionspuffer) zugesetzt, um eine ausreichende Proteinmenge für die möglichst quantitative Fällung des Antikörpers zu gewährleisten. Die Proben wurden für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 6000 x g, 4 °C). Nach Absaugen der Überstände wurde die in den Sedimenten gebundene Aktivität im β -Zähler gemessen. Das Verhältnis von Tracermenge (7.000 - 10.000 cpm) und Antikörperverdünnung (1:200.000) wurde so gewählt, das maximal 30 - 40 % der eingesetzten Aktivität präzipitiert wurde. Dieses Verhältnis wurde durch den Zusatz verschiedener Antikörperverdünnungen zu einer gegebenen Tracermenge bestimmt. Die Nachweisgrenze für cAMP lag bei 2 fmol; zur Erstellung der Standardreihe wurden insgesamt zehn cAMP-Mengen von 2-1024 fmol verwendet. Für den Standard wurden Lösungen verwendet, deren Konzentrationen photometrisch bei 252 nm bestimmt wurden. Wenn nicht anders angegeben, repräsentieren die in den Ergebnissen angegebenen Werte Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

3.7 Phosphodiesteraseaktivitätsassay

3.7.1 Herstellung von ^{32}P -cAMP

Die Herstellung von ^{32}P -cAMP erfolgte durch den enzymatischen Umsatz von ^{32}P -ATP zu ^{32}P -cAMP mittels gereinigter Guanylyl-Cyclase. Dazu wurden 50 µM [^{32}P]ATP (9,25 MBq) mit 2,5 µg boviner NO-sensitiver Guanylyl-Cyclase in einem Gesamtvolumen von

100 µl für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 3 mM DTT, 3 mM MgCl₂ und 100 µM GSNO, 50 mM TEA/HCl, pH 7,4 durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 450 µl 120 mM Zn-Acetat-Lösung gestoppt. Durch Zugabe von 450 µl 120 mM Na₂CO₃ wurden Nukleotide mit freien 5'-Phosphat-Gruppen, d.h. ATP, ADP und AMP zusammen mit dem entstehenden, schwerlöslichen ZnCO₃ präzipitiert. Nach Zentrifugation (4 min, 12.000 x g) wurde der Überstand über eine mit 0,1 M Perchlorsäure equilibrierte Aluminiumoxid-Säule (Alumina N Akt. 1, ICN Biomedicals) gegeben. Dabei bindet ³²P-cAMP an die Matrix, während freie Phosphate und Nukleotide mit freier 5'-Phosphatgruppe nicht gebunden werden. Nach Spülen mit demineralisiertem Wasser wurde das ³²P-cAMP mit 250 mM Na-Acetat-Lösung von der Säule eluiert und in 8 Fraktionen von je 300 µl gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 2 µl in Szintillationsgefäße überführt und die Zerfälle/min (cpm) des ³²P durch Messung der Cerencov-Steahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Die Fraktionen wurden bei -20°C gelagert und später für die Bestimmung der Phosphodiesteraseaktivität als Substrat verwendet.

3.7.2 Bestimmung der cAMP-abbauenden Phosphodiesteraseaktivität

Der Phosphodiesteraseaktivitätsassay dient der Bestimmung der katalytischen Aktivität der PDE3. ³²P-cAMP wird zu Adenosin und ³²P-Phosphat abgebaut, welches später detektiert werden kann (cpm). Das Reaktionsgemisch bestand aus 10 µl Probe, ³²P-cAMP (1,5-3 kBq), 1 µM nicht radioaktives cAMP, 3 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 Unit alkalische Phosphatase (Sigma) und 50 nM TEA/HCl, pH 7,4, in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Die Reaktion wurde nach 10 min bei 37°C durch Zugabe von 900 µl einer kalten Aktivkohlesuspension (30 % Aktivkohle in 50 mM KH₂PO₄, pH 2,3) gestoppt. Durch anschließende Zentrifugation wurde die Aktivkohle sedimentiert und in 600 µl Überstand die Radioaktivität (cpm) ermittelt.

3.8 Organbad

3.8.1 Lösungen, Puffer

Die Krebs-Henseleit-Lösung (K-H-Lösung) wurde jeden Tag aus zwei Stammlösungen frisch angesetzt, ständig mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und durch ein Wärmebad auf 37°C gehalten. Es wurden 40 ml der Stammlösung A (172,50 g NaCl, 8,75 g KCl, 9,36 g CaCl₂ x 2H₂O, 7,34 g MgSO₄ x 7H₂O, 4,05 g KH₂PO₄, Aqua dest. ad

1000 ml) mit 920 ml Aqua dest. bei 37°C versetzt und 30 min mit Carbogen begast, anschließend 40 ml der Lösung B (55,5 g NaHCO₃, Aqua dest. ad 1000 ml) sowie 1,5 g Glukose hinzugefügt.

3.8.2 Einspannen und Messungen der Proben im Organbad

Die Aorten wurden wie in 3.3.1 beschrieben präpariert, in Ringe geschnitten und in den Organkammern des 4-Kanal-Multi-Myographen (Modell 610M, Danish Myo Technology) fixiert. In den Organkammern befanden sich 5 ml K-H-Lösung, welche ständig mit Carbogen begast wurde. Die Aorten-Ringe wurden mit einer Vorspannung von 5 mN für 60 min äquilibriert, wobei die K-H-Lösung alle 15 min durch frische Lösung ersetzt wurde, um das Gewebe von noch möglicherweise anhaftenden Substanzen zu befreien. Nach der Äquilibrationsphase wurden die Gewebestücke mit 1 µM Phenylephrin (PE) kontrahiert. Die Relaxation wurde erst nach dem Einstellen eines stabilen kontraktile Plateaus gestartet. Bei der Anwendung von Konzentrations-Wirkungskurven wurde vor jeder Zugabe der nächst höheren Konzentration die maximale Relaxation abgewartet. Zur prozentualen Auswertung der Relaxation wurde am Ende der Versuche IBMX (100 µM) zugegeben, um eine vollständige Relaxation auszulösen.

3.9 *In vivo*-Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz bei Mäusen

Der systolische Blutdruck wurde mittels Schwanz-Plethysmographie ermittelt. Es wurde das BP-98A Blutdruckmessgerät von Softron genutzt. Die Tiere waren dazu in einem speziellen Handschuh fixiert. Um zu hohe Messwerte zu umgehen, wurde die Blutdruck-Messung erst 30 - 45 min nach Fixierung der Mäuse begonnen. Es wurden zehn Messwerte pro Tier und pro Tag ermittelt. Die Herzfrequenz wurde mittels Ableitung II im EKG über Fußplatten gemessen (ECGenie, Mouse specific, Inc). Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten ± SEM in Triplikaten. Die Messung von Blutdruck und Herzfrequenz der Mäuse erfolgte täglich zur gleichen Uhrzeit und in möglichst ruhiger Umgebung.

4 Ergebnisse

4.1 cGMP/cAMP-Crosstalk in NO-GC-defizienten Thrombozyten

4.1.1 PDE3-Expression in Thrombozyten von GCKO- und WT-Mäusen

Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit der Frage der veränderten Hämostase in GCKO-Mäusen. Unter anderem fiel dabei eine verkürzte Blutungszeit der KO-Mäuse auf (Dangel et al., 2010). Da die PDE3 einen Schnittpunkt zwischen cGMP und cAMP bildet, wurde in dieser Arbeit zunächst der cGMP/cAMP-Crosstalk in Thrombozyten untersucht. Daher sollte zuerst die Expression der PDE3 in Thrombozyten ermittelt werden. Wie in 3.3.2 beschrieben wurden Mäuse-Thrombozyten gewonnen und deren Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde die PDE3-Expression in Thrombozyten von GCKO- und WT-Mäusen bestimmt. Auf dem Western Blot (Abb. 3) sieht man bei 110 kDa ein deutlich reduziertes PDE3-Signal bei den GCKO-Thrombozyten im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Für eine quantitative Auswertung wurde die Proteinmenge densitometrisch bestimmt und mit der des „house-keeping“ Gens β -Tubulin ins Verhältnis gesetzt. Die Abbildung 3 zeigt, dass die PDE3-Expression in den Thrombozyten der GCKO-Tiere um mehr als die Hälfte gegenüber den WT-Tieren vermindert ist.

4.1.2 Fehlende Inhibition der PDE3 durch fehlendes cGMP in GCKO-Thrombozyten

Nachdem eine quantitative Veränderung der PDE3 in KO-Thrombozyten im Vergleich zu WT-Thrombozyten dokumentiert werden konnte, sollte dieser Unterschied auch auf funktioneller Ebene untersucht werden. Dazu wurde folgender physiologischer Hintergrund genutzt: Prostaglandin E₁ (PGE₁) hemmt die Thrombozytenaggregation über eine Stimulierung der Adenylyl-Cyclase. Es kommt zu einer Akkumulation von cAMP in Thrombozyten. Diese cAMP-Akkumulation kann bei gleichzeitiger Anwesenheit von cGMP durch Hemmung der PDE3 verstärkt werden. Um zu untersuchen, ob durch die Deletion der NO-GC dieser Crosstalk beeinflusst ist, wurde die cAMP-Synthese in Anwesenheit von NO untersucht.

Thrombozyten von WT- und GCKO-Mäusen wurden mit dem spezifischen PDE5-Inhibitor Sildenafil vorinkubiert, um eine durch die PDE5 katalysierte Hydrolyse des

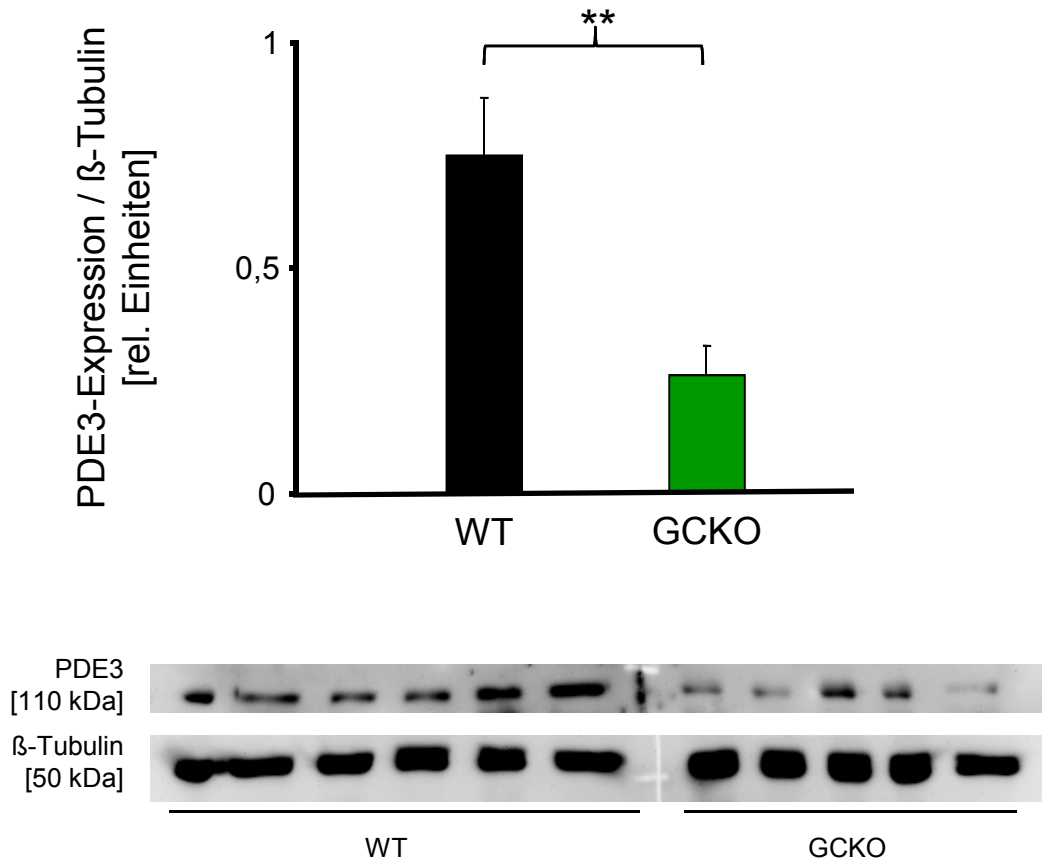


Abb. 3: PDE3-Expression in Thrombozyten von GCKO- und Kontroll-Tieren

Murine Thrombozyten wurden gewonnen und deren Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 20 μ l Probe auf ein 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Mit Western Blot wurde mit einem spezifischen Antikörper die PDE3 in KO- und WT-Thrombozyten detektiert. Oben ist die statistische Auswertung mehrerer Western zu sehen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-6); Mann-Whitney-Test **p=0,0079. Darunter ist ein repräsentativer Blot gezeigt.

cGMPs zu hemmen. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten mit steigenden Konzentrationen des NO-Donors GSNO (0,01 - 100 μ M) zur Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase inkubiert. Zum Schluss wurde dann die cAMP-Synthese mit PGE₁ stimuliert (100 nM). Die Reaktion wurde mit eiskaltem Ethanol (200 μ l, 4°C) gestoppt und die cAMP-Konzentration mittels RIA gemessen.

Abbildung 4 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. In der Abwesenheit von GSNO waren die cAMP-Werte nach PGE₁-Stimulation identisch in WT- und GCKO-Thrombozyten. Das hinzugefügte NO führt in WT-Thrombozyten zu einer cGMP-Produktion, welche über Hemmung der PDE3 die cAMP-Konzentration ansteigen lässt. In den GCKO-Thrombozyten ist dieser Anstieg nicht zu sehen, da keine cGMP-Produktion und somit keine Hemmung der PDE3 stattfindet. Damit zeigt sich, dass der cGMP/cAMP-Crosstalk in Thrombozyten auf Ebene der PDE3 durch Deletion der NO-GC unterbunden ist.

4.2 Die PDE3 im vaskulären System

4.2.1 PDE3-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand von GCKO-Mäusen der Einfluss der Deletion der NO-GC auf die PDE3 untersucht werden. Die PDE3 ist neben den Thrombozyten in glatten Gefäßmuskelzellen und in Kardiomyozyten exprimiert; daher sollten im Weiteren diese beiden Zelltypen hinsichtlich Expression und Funktionalität der PDE3 untersucht werden. Zunächst sollte ermittelt werden, ob die Deletion der NO-GC, wie in Thrombozyten, zu einer Veränderung der PDE3-Expression in glatter Gefäßmuskulatur von WT- und GCKO-Mäusen führt. Aus Aorten wurde wie in 3.3.1 beschrieben Homogenate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden anschließend die PDE3 sowie eine MAP-Kinase (Erk) als „house-keeping“ Gen detektiert. Abbildung fünf zeigt einen repräsentativen Western Blot, in dem die PDE3-Expression im GCKO gegenüber dem WT um ca. 50% reduziert ist. Die statistische Auswertung mehrerer Homogenate aus verschiedenen Tieren bestätigt diese Reduktion (Abb. 5).

Auch aus Aorten von SM-GCKO-Mäusen wurden Homogenate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde anschließend die PDE3 sowie eine MAP-Kinase (Erk) als „house-keeping“ Gen detektiert. Abbildung 5 zeigt einen repräsentativen Western Blot, in dem die PDE3-

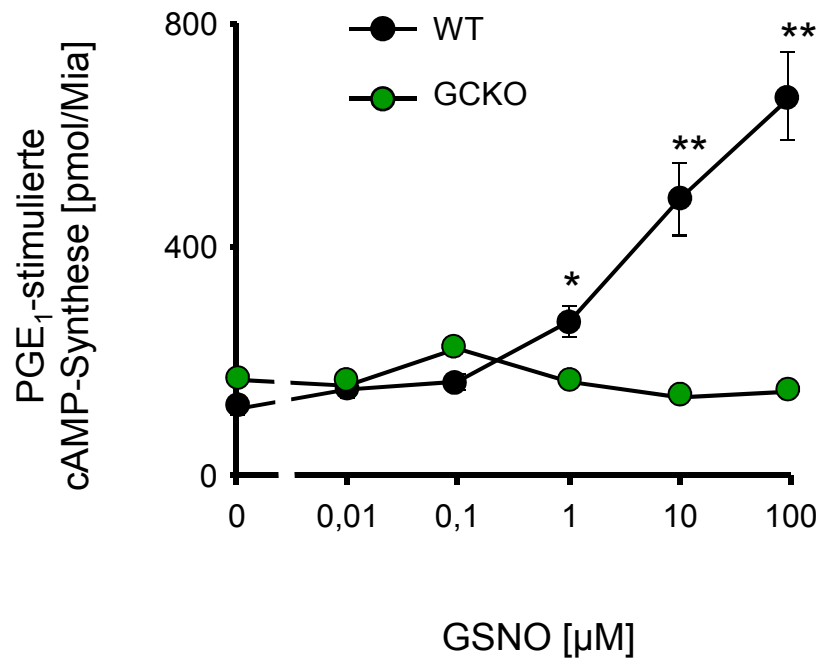


Abb. 4: PGE₁-induzierte cAMP-Synthese in Thrombozyten nach Präinkubation mit NO

Thrombozyten von WT- und GCKO-Mäusen wurden fünf Minuten mit ansteigenden Konzentrationen des NO-Donors GSNO vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 100 nM PGE₁. Die Reaktion wurde mit eiskaltem Ethanol gestoppt und die cAMP-Konzentration mittels RIA gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (n = 5-7); Mann-Whitney-Test WT vs GCKO: *p=0,048 für 1 µM; **p=0,0025 für 10µM; **p=0,0025 für 100 µM.

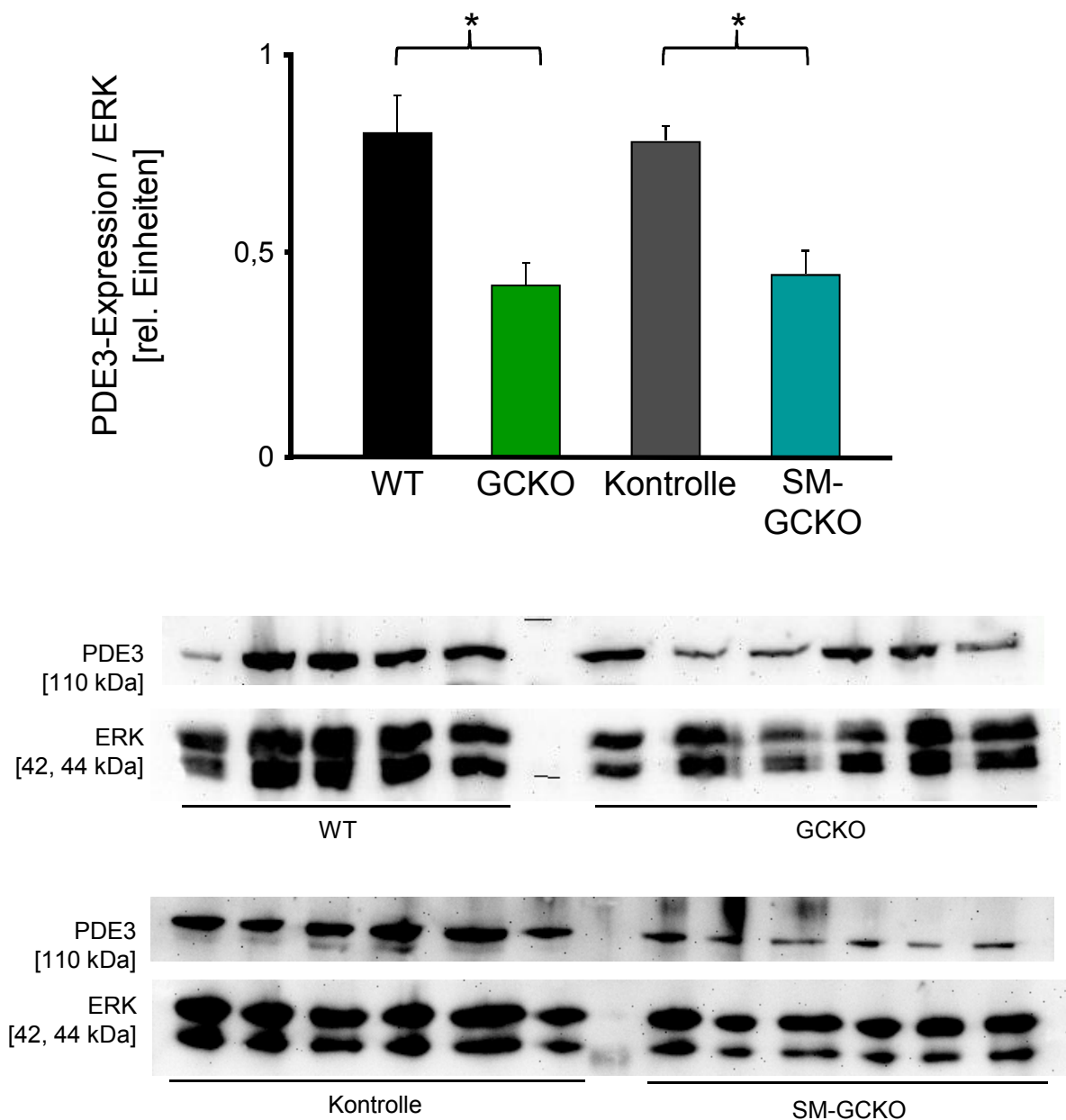


Abb. 5: PDE3-Expression in glatter Muskulatur der Aorta von GCKO-, SM-GCKO- und Kontroll-Tieren

Aus Aortenstücken wurden Homogenate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 20 μ l Probe auf ein 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Mit Western Blot wurde mit einem spezifischen Antikörper die PDE3 in der glatten Muskulatur der Aorta von GCKO-, SM-GCKO- und den jeweiligen Kontroll-Tieren detektiert. Oben ist die statistische Auswertung mehrerer Western zu sehen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 5-6$); Mann-Whitney-Test: WT vs GCKO $*p=0,028$; Kontrolle vs SM-GCKO $*p=0,038$. Darunter ist ein repräsentativer Blot gezeigt.

Kontrolle = Glatt-Muskel-spezifischer WT (nach Tamoxifen-Injektion)

Expression auch in SM-GCKO-Mäusen gegenüber dem WT um ca. 50% reduziert ist. Die statistische Auswertung mehrerer Homogenate aus verschiedenen Tieren bestätigt diese Reduktion (Abb. 5). Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass eine Deletion der NO-GC zu einer Verminderung der PDE3-Expression in glatter Gefäßmuskulatur beider KO-Mauslinien im Vergleich zu den WT-Kontrollen führt.

4.2.2 Abnahme der PDE3-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob die zuvor gezeigte Abnahme der PDE3-Expression in glatter Muskulatur in beiden Mauslinien durch das Fehlen der NO-GC und damit cGMP bedingt ist oder ob der bei beiden Mauslinien entstehende Hypertonus zu einer Verminderung der PDE3-Expression führt. Hierzu wurde die SM-GCKO-Mauslinie verwendet, bei der nur die glatten Muskelzellen für die NO-GC defizient sind. Wie auch in den GCKO-Mäusen (Friebe et al., 2007) ist in den SM-GCKO-Tieren die Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur vermindert (Groneberg et al., 2010). Dadurch steigt der systolische Blutdruck 3-4 Wochen nach Tamoxifen-Injektion um ca. 30 mmHg an. In den glatten Muskelzellen der Aorta wurde die PDE3-Expression mit der zeitabhängigen Abnahme der NO-GC-Expression bzw. der Zunahme des systolischen Blutdrucks verglichen. Zunächst wurden Aorten aus SM-GCKO-Mäusen entnommen, denen kein Tamoxifen injiziert wurde. In diesen Tieren war die NO-GC also noch nicht deletiert. Die Ergebnisse dieser Proben dienen als Kontrollen (pre-Wert). Außerdem wurden Aorten aus SM-GCKO-Mäusen fünf bzw. 72 Tage nach Tamoxifen-Injektion entnommen. Abbildung 6 zeigt, dass die PDE3-Expression 72 Tage nach Tamoxifen-Injektion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um die Hälfte reduziert war (die statistische Auswertung dieser Daten ist in Abbildung 7 zu sehen). Allerdings war fünf Tage nach Tamoxifen-Injektion die PDE3-Expression ebenfalls schon um die Hälfte vermindert. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die NO-GC-Expression ebenfalls bereits fünf Tage nach Tamoxifen-Injektion drastisch reduziert war (Groneberg et al., 2010). In Abbildung 7 ist zu sehen, dass die Abnahme der PDE3-Expression nach Tamoxifen-Injektion parallel zur NO-GC-Expression verläuft. Dieser Sachverhalt legt nahe, dass die Reduktion der PDE3-Expression durch das Fehlen der NO-GC und damit cGMP bedingt ist. Um zu überprüfen, ob die Reduktion der PDE3-Expression durch die Erhöhung des systolischen Blutdrucks induziert wird, wurde vor Gewinnung der Proben bei denselben Tieren der Blutdruck gemessen (Abb. 8). Wie erwartet zeigen die Tiere 73 Tage nach Induktion der NO-GC-Deletion einen systolischen Hypertonus von 30 mmHg im

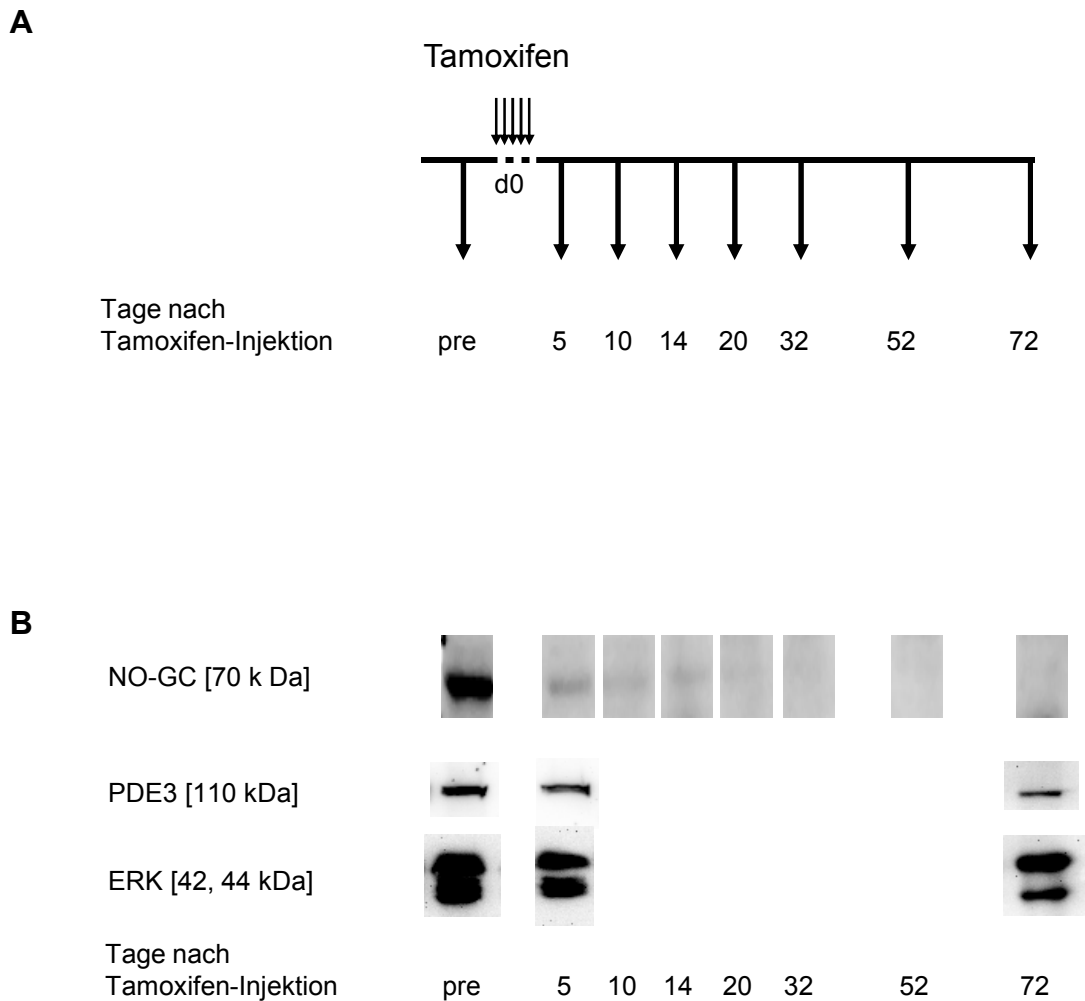


Abb. 6: Reduktion der PDE3-Expression in glatter Gefäßmuskulatur von SM-GCKO-Mäusen

- (A) Zeit-Schema zur Entwicklung Glatt-Muskel-spezifischer-Mäuse (SM-GCKO). Männlichen Mäusen wurde an fünf Tage hintereinander jeweils 1 mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert. Der letzte Tag der Tamoxifen-Injektion wurde als Tag 0 definiert. Unbehandelte Glatt-Muskel-spezifische Tiere dienten als Kontrolle (pre). Die Untersuchungen fanden an den definierten Zeitpunkten nach Tamoxifen-Injektion statt.
- (B) An den jeweiligen Tagen nach Tamoxifen-Injektion wurde aus den Aorten Homogenate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 20 µl Probe auf ein 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Mittels Western Blot wurde mit einem spezifischen Antikörper die NO-GC und die PDE3 in der glatten Muskulatur der Aorta von SM-GCKO-Mäusen detektiert. Als Kontrollen wurden Mäuse eingesetzt, die nicht mit Tamoxifen behandelt wurden (pre). Gezeigt sind repräsentative Blots.

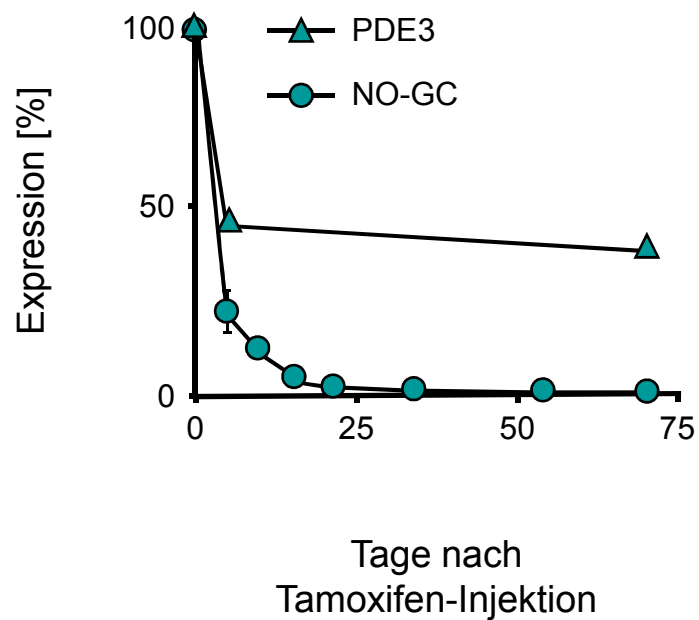
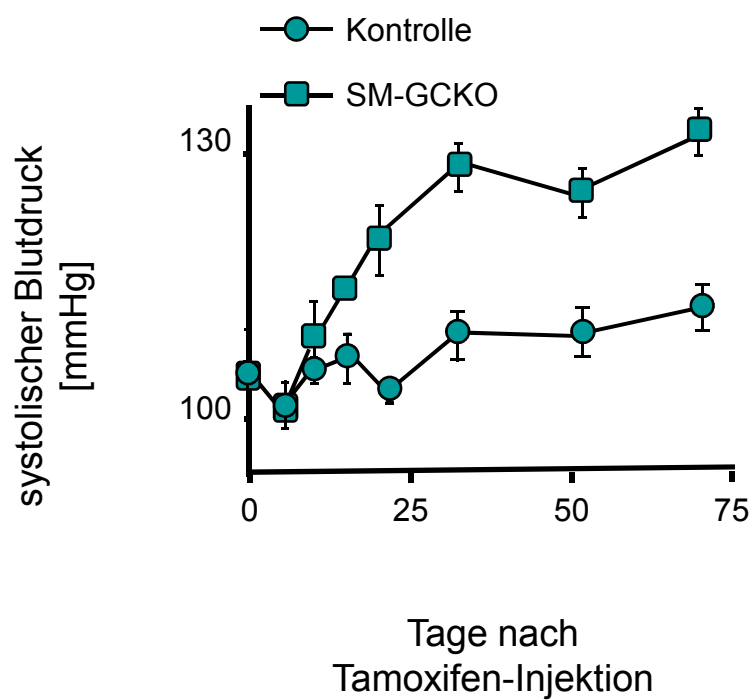


Abb. 7: Statistische Auswertung der in Abbildung 6 gezeigten Ergebnisse
 Statistische Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Zu sehen sind die Abnahme der PDE3-Expression und die Abnahme der NO-GC-Expression in glatter Gefäßmuskulatur von SM-GSKO-Mäusen nach Tamoxifen-Injektion über einen Zeitraum von 72 Tagen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6).



Adaptiert von: Smooth Muscle-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Is Sufficient to Induce Hypertension in Mice. Dieter Groneberg *et al.*, *Circulation*. 2010; 121:401-409.

Abb. 8: Systolisch Blutdruckwerte der SM-GCKO-Mäuse sowie deren Kontrollen

Bei den SM-GCKO-Mäusen wurde der Blutdruck an den entsprechenden Tagen nach Tamoxifen-Injektion mittels Schwanzplethysmographie gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6).

Kontrolle = Glatt-Muskel-spezifischer WT (nach Tamoxifen-Injektion)

Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Groneberg et al., 2010). Der Anstieg des systolischen Blutdrucks folgte jedoch nicht der Abnahme der NO-GC- und PDE3-Expression, da dieser erst 32 Tage nach Tamoxifen-Injektion vollständig ausgebildet war.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Abnahme der PDE3-Expression in glatter Muskulatur sowohl in GCKO-Tieren als auch in SM-GCKO-Mäuse durch das Fehlen der NO-GC und damit cGMP bedingt ist. Damit scheint die auftretende Hypertonie für die Abnahme der PDE3-Expression nicht direkt ursächlich zu sein.

4.2.3 PDE3-Aktivität in der glatten Gefäßmuskulatur

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die verminderte PDE3-Expression in der glatten Muskulatur auch mit einer Reduktion der Enzymaktivität einhergeht. Aus glatter Gefäßmuskulatur der Aorta wurden Homogenate hergestellt und die cAMP-abbauende-Aktivität der PDE3 im Phosphodiesteraseassay gemessen. In Abbildung 9 ist zu sehen, dass die GCKO-Mäuse eine Reduktion der PDE3-Aktivität um 50 % gegenüber den WT-Tieren zeigen; dieses Ergebnis entsprach dem der PDE3-Expression der beiden Mauslinien (s. Abb. 4.2.1). Erstaunlicherweise konnte jedoch kein Unterschied der glattmuskulären PDE3-Enzymaktivität zwischen SM-GCKO und WT identifiziert werden (Abb. 9).

4.2.4 cAMP-Konzentration in der glatten Gefäßmuskulatur

Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die PDE3-Expression in beiden KO-Modellen im Vergleich zum WT um die Hälfte reduziert ist. Allerdings unterscheidet sich die Enzym-Aktivität in der glatten Gefäßmuskulatur der Aorta zwischen GCKO- und SM-GCKO-Mäusen. Aus diesem Grund wurde die basale cAMP-Konzentration in der Aorta beider KO-Modelle mittels RIA gemessen. Die cAMP-Konzentration betrug in allen Proben etwa 0,3 pmol/mg Protein. Es zeigte sich also, dass die cAMP-Konzentration unter unterschiedlichen Bedingungen in GCKO-Mäusen und WT-Tieren identisch war (Abb. 10). Es lässt sich daher festhalten, dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration in den glatten Gefäßmuskulaturzellen der Aorta in beiden KO-Linien trotz veränderter PDE3-Expression und unterschiedlicher Enzym-Aktivität im Vergleich zu den WT-Kontrollen konstant bleibt.

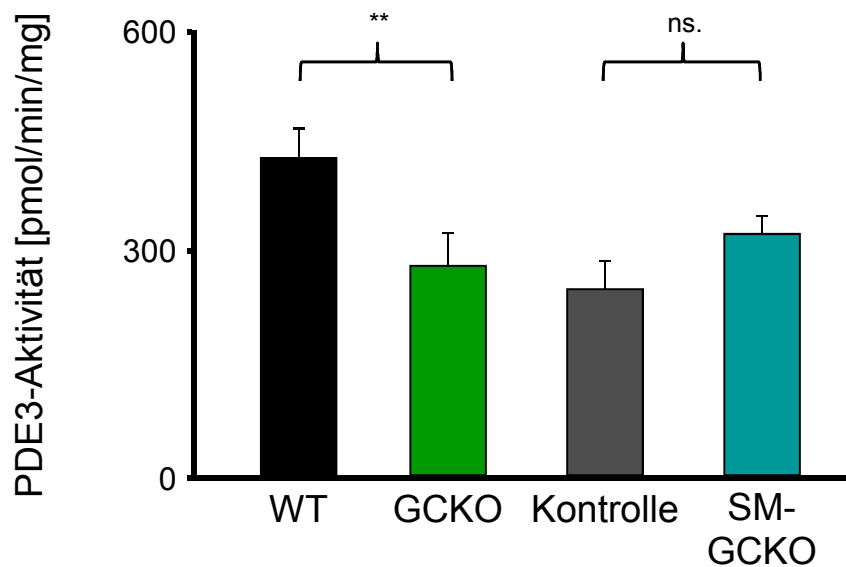


Abb. 9: Basale PDE3-Aktivität in glatter Muskulatur der Aorta in GCKO- sowie SM-GCKO-Mäusen und deren Kontrollen

Aus glatter Gefäßmuskulatur der Aorta wurden Homogenate hergestellt und die cAMP-abbauende Aktivität der PDE3 im Phosphodiesteraseassay gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5-7); Mann-Whitney-Test: WT vs GCKO **p=0,007; Kontrolle vs SM-GCKO p=0,202.

Kontrolle = Glatt-Muskel-spezifischer WT (nach Tamoxifen-Injektion)

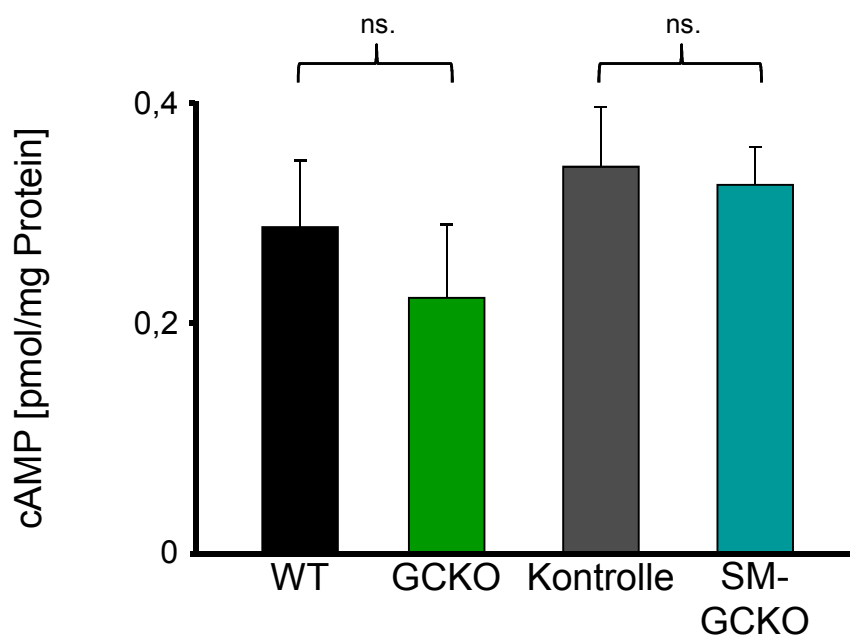


Abb. 10: cAMP-Konzentration in glatter Muskulatur der Aorta von GCKO- und SM-GCKO-Mäusen sowie deren Kontrollen

Aus glatter Gefäßmuskulatur der Aorta wurden Homogenate hergestellt und die cAMP-Konzentration mittels RIA gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6); Mann-Whitney-Test: WT vs GCKO p=0,105; Kontrolle vs SM-GCKO p=1. Kontrolle = Glatt-Muskel-spezifischer WT (nach Tamoxifen-Injektion)

4.2.5 Adenylyl-Cyclase-Aktivität in der glatten Gefäßmuskulatur

Die bisherigen Daten zeigen, dass die Expression der cAMP-abbauenden-PDE3 in der glatten Muskulatur der beiden Mauslinien im Vergleich zu den WT-Kontrollen vermindert war; die Aktivität des Enzyms war in den GCKO-Mäusen ebenfalls vermindert, in SM-GCKO-Mäusen erstaunlicherweise jedoch unverändert. Um diese Diskrepanz zu untersuchen, wurde die cAMP-Synthese durch die Adenylyl-Cyclase und damit die Auswirkung der Deletion der NO-GC auf die cAMP-Produktion betrachtet. Hierzu wurden zunächst Aortenstücke aus GCKO-, SM-GCKO- und den jeweiligen WT-Kontrolltieren präpariert. Die Aortenstücke wurden während des Experiments in Krebs-Henseleit-Lösung aufbewahrt und mit Carbogen begast. Um die Hydrolyse des gebildeten cAMPs zu verhindern, wurden die Proben mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), einem unspezifischen PDE-Inhibitor vorinkubiert. Anschließend wurde die Adenylyl-Cyclase mit Forskolin, einem spezifischen Aktivator des Enzyms, für zwei und fünf Minuten stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Aortenstücke. Gestoppt wurde die Reaktion durch Schockfrieren der Aortenstücke. Die cAMP-Konzentration im Gewebe wurde mittels RIA bestimmt und entsprechend dem Trockengewicht normiert. Zwei Minuten nach Adenylyl-Cyclase-Stimulation fand sich sowohl in den GCKO-Proben wie auch in den WT-Proben eine cAMP-Konzentration von ca. 30 pmol/mg Protein. Nach fünf Minuten Inkubation mit Forskolin lag die cAMP-Konzentration in den WT-Kontrollen bei 180 pmol/mg Protein in den KO-Mäusen jedoch nur bei ca. 60 pmol/mg Protein (Abb. 11A). Die cAMP-Konzentration in den SM-GCKO Mäusen betrug nach zwei Minuten bei 30 pmol/mg Protein und nach fünf Minuten 180 pmol/mg Protein – entsprachen also denen der WT-Tiere (Abb. 11B).

Insgesamt zeigt sich, dass die Konzentration des second messengers cAMP durch Anpassen der Synthese und des Abbaus konstant gehalten wird. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass möglicherweise auch die Expression der Adenylyl-Cyclase in NO-GC-defizienten Mäusen verändert sein könnte. Die Untersuchung dieser Fragestellung war jedoch leider nicht möglich, da die getesteten, kommerziell erhältlichen Antikörper zur Messung der Adenylyl-Cyclase-Expression in Aortengewebe nicht spezifisch genug waren.

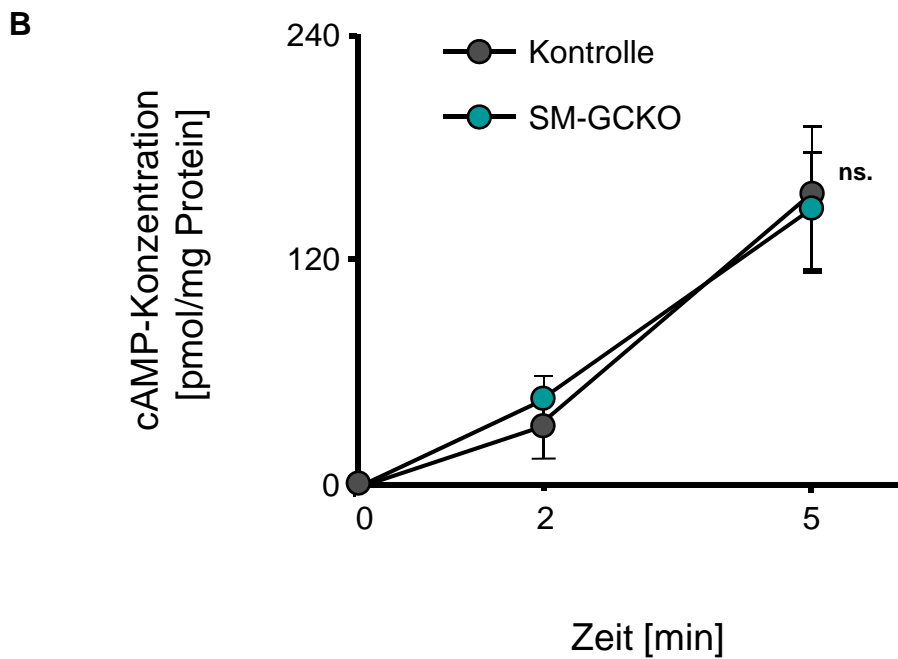
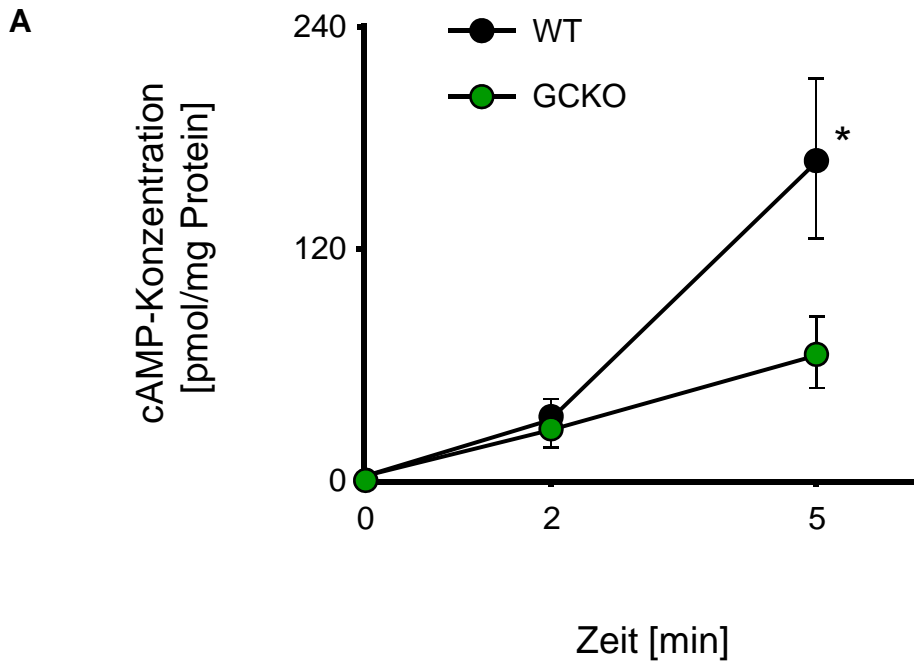


Abb. 11: cAMP-Konzentration in Aortenringen nach Stimulation der Adenylyl-Cyclase mit Forskolin

Nach Vorinkubation der Aortenringe mit 5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) wurden diese mit 1 mM Forskolin, einem spezifischen Aktivator der Adenylyl-Cyclase, für zwei und fünf Minuten stimuliert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Schockfrieren der Aortenstücke. Die cAMP-Konzentration im Gewebe wurde mittels RIA bestimmt.

- (A)** Vergleich von GCKO- und WT-Mäusen. Mann-Whitney Test: * $p=0,0426$.
- (B)** Vergleich von SM-GCKO- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren. Mann-Whitney Test: $p=0,792$.

4.2.6 Sensitivität der glatten Muskulatur für den PDE3-Inhibitor Milrinon

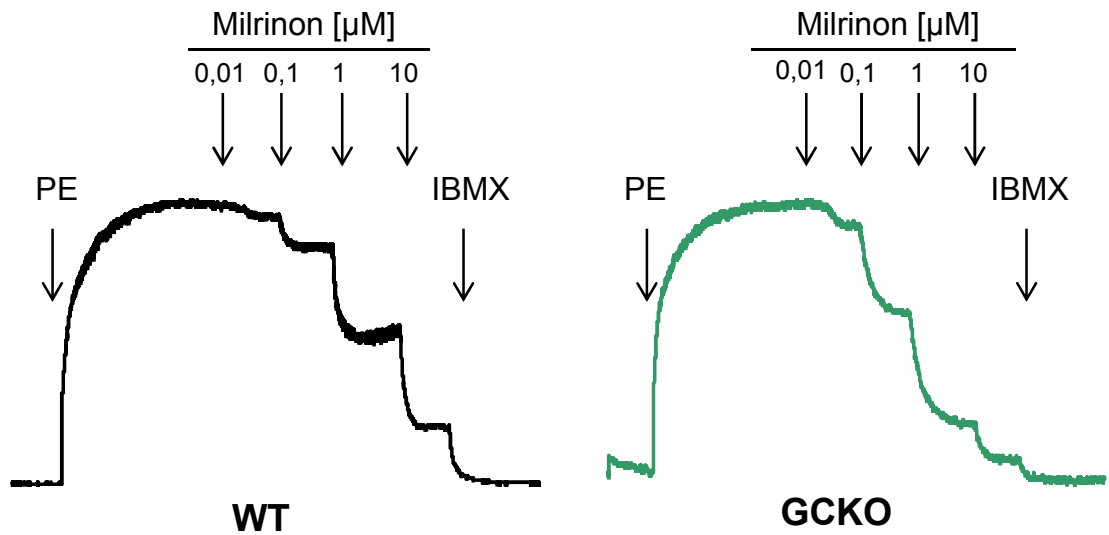
Nachdem für die beiden KO-Linien Unterschiede in der Expression und Aktivität der PDE3 herausgearbeitet wurden, sollte nun die funktionelle Auswirkung auf die glatte Muskulatur ermittelt werden. Dazu wurde die Relaxationsfähigkeit der Aortenmuskulatur im Organbad untersucht. Hierzu wurden Aorten präpariert, in Ringe geschnitten und in das Organbad eingespannt. Nach einer Äquibrierungsphase wurden die Ringe mit 1 μM Phenylephrin vorkontrahiert. Nach Einstellen einer stabilen Kontraktion wurde mit steigenden Konzentrationen (0,01-10 μM) des spezifischen PDE3-Inhibitors Milrinon relaxiert. Originalspuren solcher Experimente sind in Abbildung 12 zu sehen, die statistische Auswertung sieht man in Abbildung 13. Die glatte Muskulatur aller Tiere relaxierte durch Milrinon, allerdings waren die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der KO-Tiere im Vergleich zu den WT-Kontrollen nach links verschoben (Abb. 13A und B). Daraus lässt sich schließen, dass die glatte Muskulatur in KO-Mäusen sensibler auf Milrinon reagiert.

4.3 Die PDE3 im kardialen System

4.3.1 Expression und Aktivität der PDE3 in Herzmuskelgewebe

Bislang konnte gezeigt werden, dass die PDE3-Expression sowohl in Thrombozyten als auch in glatter Gefäßmuskulatur der KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren cGMP-bedingt reduziert ist. Zusätzlich war auch die Aktivität des Enzyms in glatter Gefäßmuskulatur in GCKO-Mäusen vermindert. Im kardiovaskulären System wird die PDE3 außer in glatten Gefäßmuskelzellen auch in Kardiomyozyten stark exprimiert. Daher sollte auch dieser Zelltyp hinsichtlich Expression und Aktivität der PDE3 untersucht werden. Aus Herzen wurden wie in 3.3.1 beschrieben Homogenate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde anschließend die PDE3 im Western Blot detektiert. Abbildung 14 zeigt einen repräsentativen Blot, in welchem kein Unterschied der PDE3-Expression zwischen GCKO- und WT-Tieren zu sehen ist. Für eine quantitative Auswertung wurde die Proteinmenge densitometrisch bestimmt und mit der des „house-keeping“ Gens GAPDH verglichen. Die statistische Auswertung der Homogenate aus verschiedenen Tieren bestätigt die identische PDE3-Expression im Myokard von in GCKO-Mäusen und WT-Kontrollen. Auch bei den SM-GCKO-Mäusen zeigte sich kein Unterschied der myokardialen PDE3-Expression

A



B

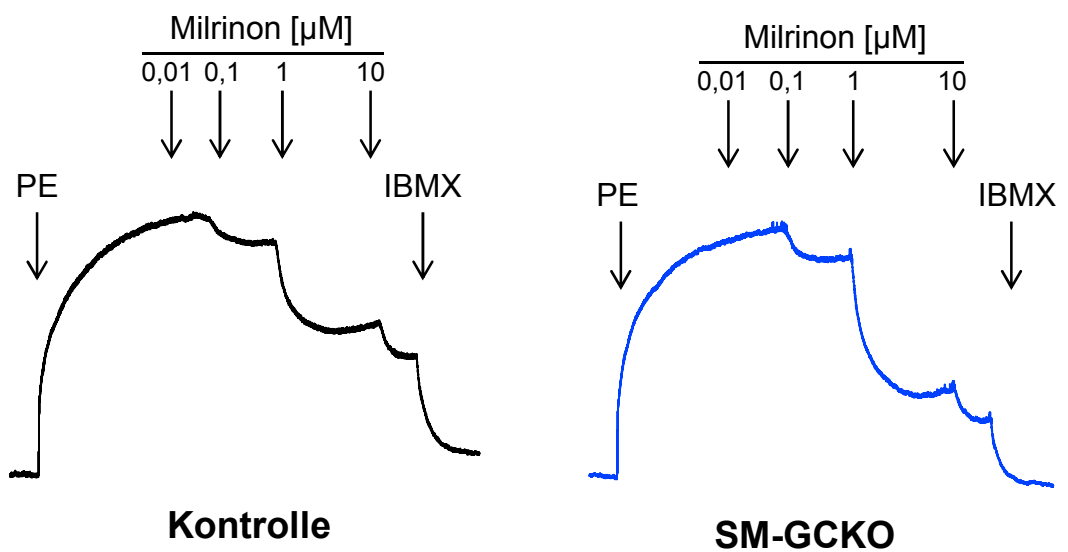
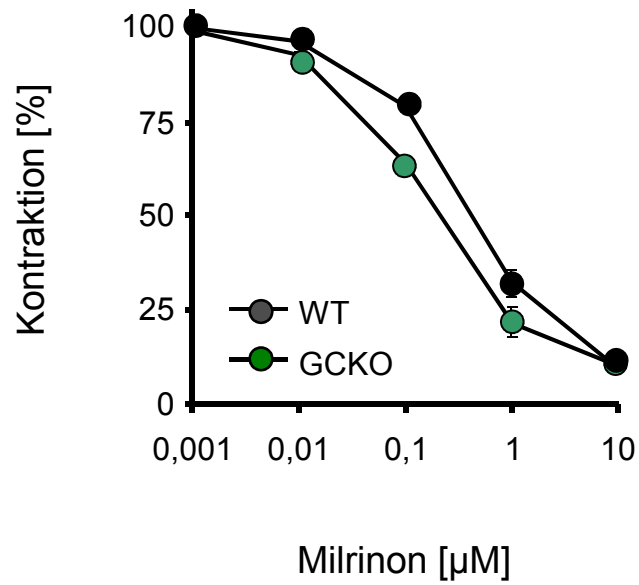
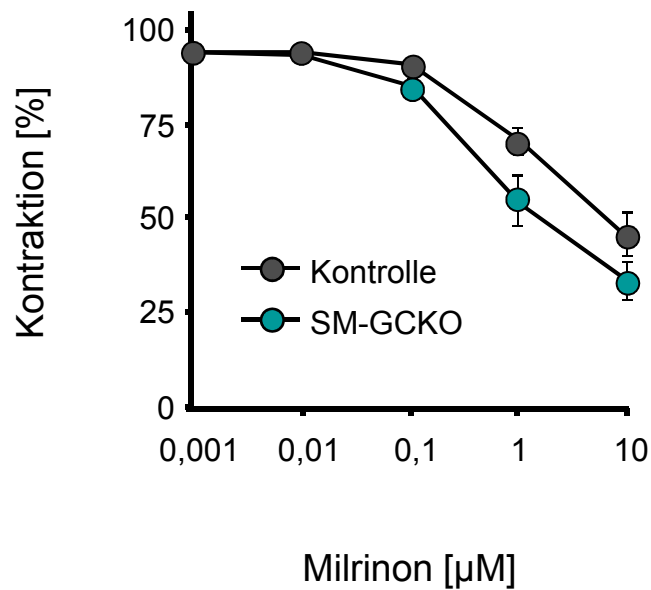


Abb. 12: Relaxation glatter Gefäßmuskulatur der Aorta durch Milrinon

Organbad-Originalspuren von Konzentrations-Wirkungskurven für Milrinon. Aortenringe wurden mit 1 µM Phenylephrin (PE) vorkontrahiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen (0,01-10 µM) des spezifischen PDE3-Inhibitors Milrinon relaxiert. Zur Normierung der Kurven wurde abschließend 100 µM IBMX appliziert.

(A) Originalspuren für WT und GCKO

(B) Originalspuren für Tamoxifen-behandelte WT (Kontrolle) und SM-GCKO

A**B****Abb. 13: Statistische Auswertung der in Abb. 12 gezeigten Ergebnisse**

Aortenringe wurden im mit 1 μM Phenylephrin vorkontrahiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen (0,01-10 μM) des spezifischen PDE3-Inhibitors Milrinon relaxiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6-8).

(A) WT- im Vergleich zu GCKO-Mäusen

(B) Vergleich von SM-GCKO und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren

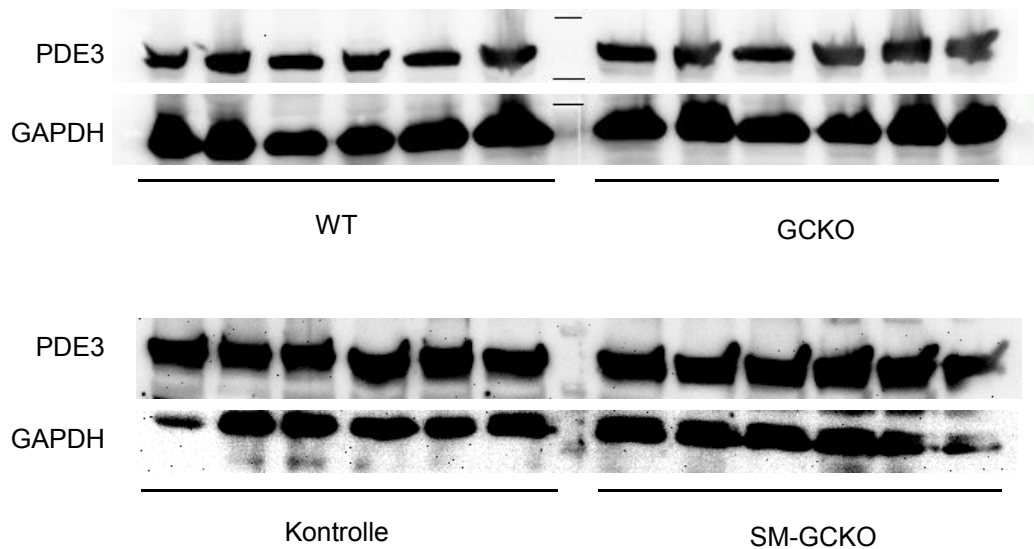
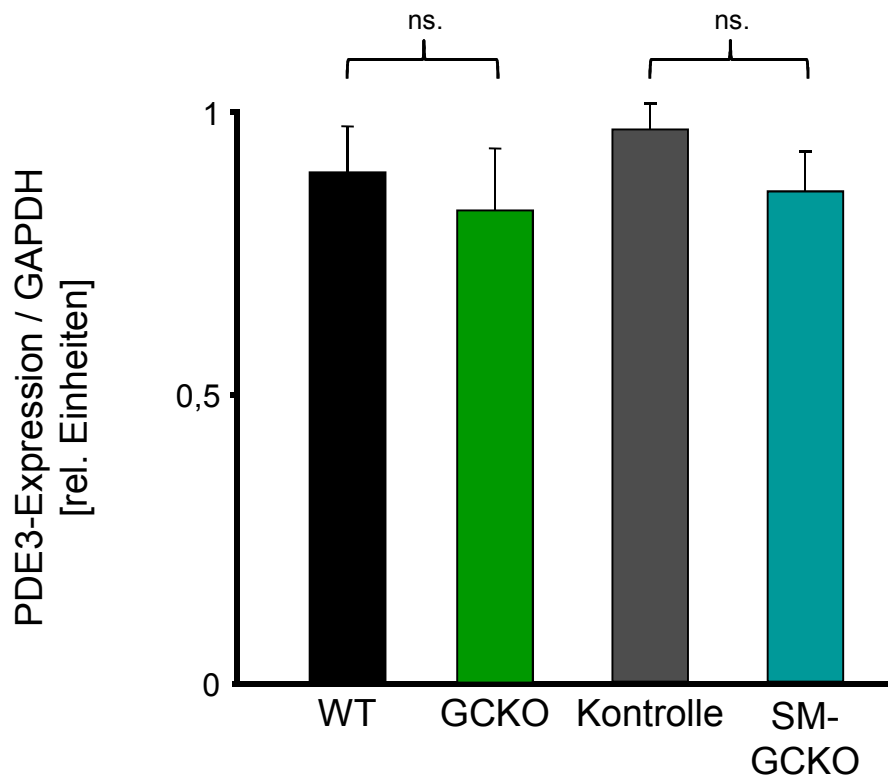


Abb. 14: PDE3-Expression in Herzmuskulatur von GCKO-, SM-GCKO- und Kontroll-Tieren

Aus Herzgewebe wurden Homogenate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 20 µl Probe auf ein 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Mit Western Blot wurde mit einem spezifischen Antikörper die PDE3 in Herzmuskelgewebe von GCKO-, SM-GCKO und den Kontroll-Tieren detektiert. Oben ist die statistische Auswertung mehrerer Western zu sehen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$); Mann-Whitney-Test: WT vs GCKO $p=0,937$; Kontrolle vs SM-GCKO $p=0,309$. Unten ist ein repräsentativer Blot gezeigt.

Kontrolle = Glatt-Muskel-spezifischer WT (nach Tamoxifen-Injektion)

im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Weiterhin war die PDE3-Expression in GCKO- und SM-GCKO-Mäusen etwa gleich (Abb. 14). Eine Deletion der NO-GC führt also in Kardiomyozyten, im Gegensatz zu Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen, nicht zu einer Verminderung der PDE3-Expression. Dementsprechend war, wie in Abbildung 15 gezeigt, die Aktivität der PDE3 in Herzhomogenaten von WT, GCKO und SM-GCKO identisch.

4.3.2 Messung des systolischen Blutdrucks *in vivo*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Unterschiede der PDE3-Expression und Aktivität einen Einfluss auf den systolischen Blutdruck haben. Zunächst wurde der systolische Blutdruck nicht-anästhesierter, wacher Mäuse mittels Schwanzplethysmographie an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen. Für die WT-Mäuse lag dieser bei etwa 95 mmHg und für die KO-Mäuse zwischen 120 und 130 mmHg. Die erhobenen Blutdruckwerte bestätigen somit früher aufgenommene Werte (Groneberg et al., 2010). An weiteren fünf aufeinander folgenden Tagen wurde den Mäusen der spezifische PDE3-Inhibitor Milrinon im Trinkwasser gegeben. Das führte bei den KO-Mäusen schon am ersten bzw. zweiten Tag nach Milrinon-Gabe zu einem Blutdruckanstieg um weitere 10 bis 20 mmHg. Bei den WT-Tieren konnte diese Änderung jedoch nicht gemessen werden (Abb. 16A und B). Die Herzfrequenz aller gemessenen Tiere war durchgehend konstant und lag bei etwa 700 bpm.

4.3.3 Spezifisches Herzgewicht der Mäuse

Bisher konnte gezeigt werden, dass der systolische Blutdruck in beiden KO-Linien im Vergleich zu den WT-Tieren erhöht war und bei Milrinon-Gabe noch weiter anstieg. Die verminderte Relaxationsfähigkeit der Gefäße und der Hypertonus erfordern eine Anpassung des Herzens, um für eine kontinuierliche Versorgung der Peripherie mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sorgen. Nun sollte untersucht werden, ob das Herz kompensatorisch hypertrophiert. Dazu wurden die Herzen der KO- und WT-Tiere gewogen, bevor aus ihnen Homogenat erstellt wurde. Es wurde das Körpergewicht/Herzgewicht-Verhältnis ermittelt. Dieses war für die GCKO-Mäuse im Vergleich mit den WT-Kontrollen identisch und betrug ca. 0,45 relative Einheiten. Auch zwischen dem Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis der SM-GCKO-Mäuse bestand im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen kein Unterschied.

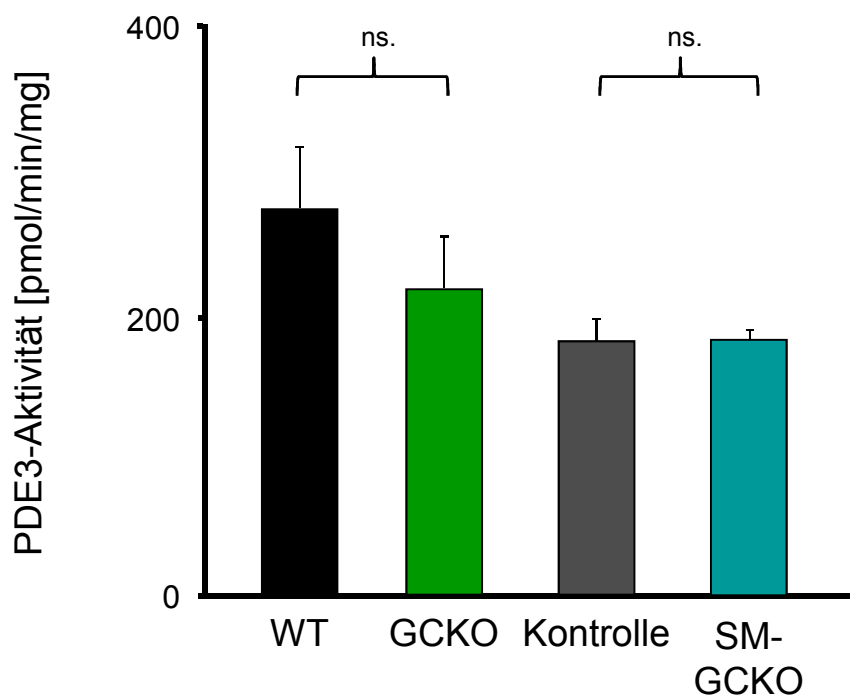


Abb. 15: Basale PDE3-Aktivität in Herzmuskulatur von GCKO- und SM-GCKO-Mäusen sowie deren Kontrollen

Aus Herzgewebe wurden Homogenate hergestellt und die cAMP abbauende-Aktivität der PDE3 im Phosphodiesteraseassay gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6); Mann-Whitney-Test: WT vs GCKO $p=0,340$; Kontrolle vs SM-GCKO $p=1$.
Kontrolle = Glatt-Muskel-spezifischer WT (nach Tamoxifen-Injektion)

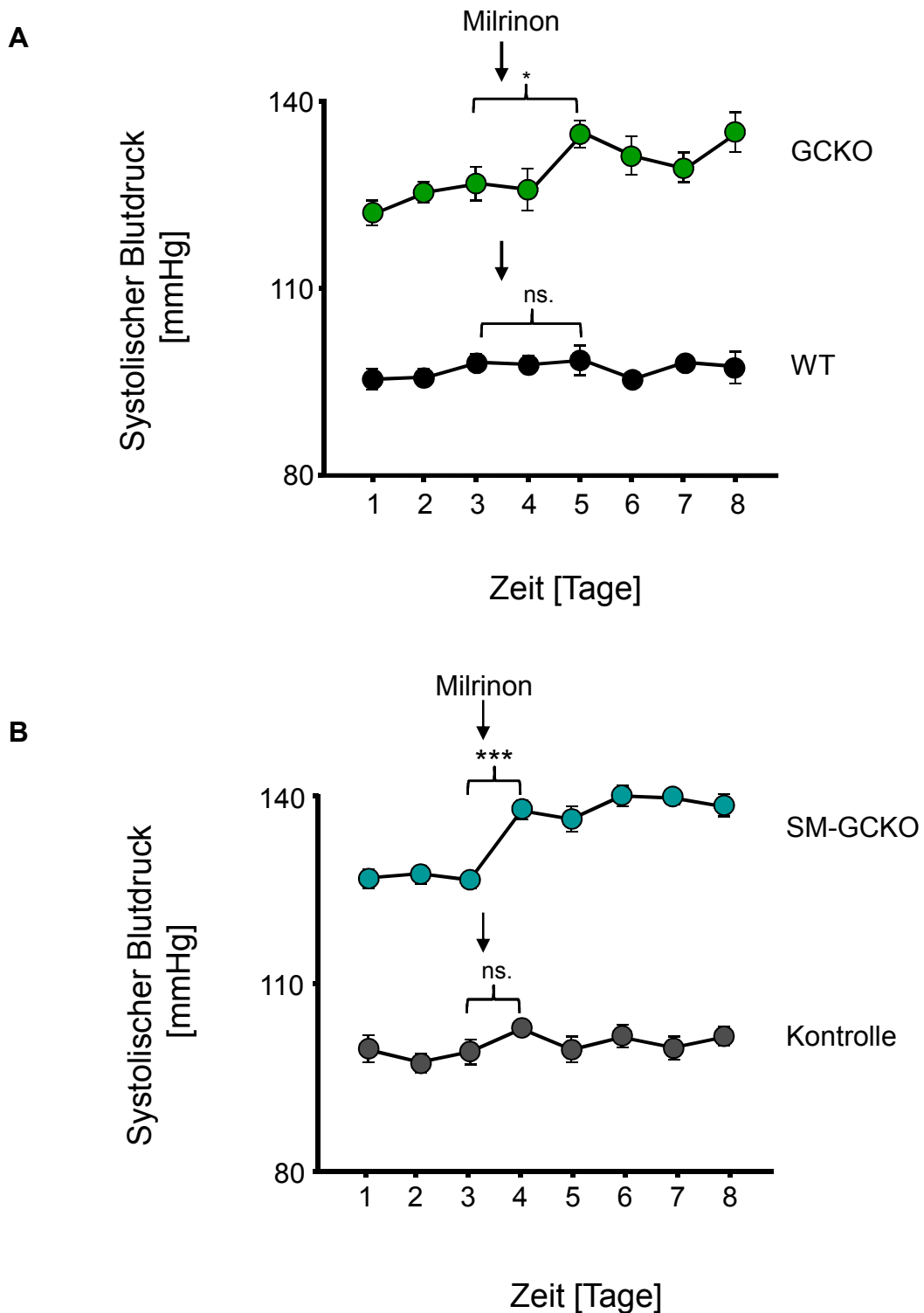


Abb. 16: Systolischer Blutdruck nach Milrinon-Gabe mit dem Trinkwasser

Nach einer Gewöhnungsphase wurde der systolische Blutdruck der Mäuse täglich mittels Schwanz-Plethysmographie gemessen. Nach drei Kontrollmessungen wurde den Mäusen Milrinon (5 µg/ml) mit dem Trinkwasser gegeben und an weiteren fünf Tagen der Blutdruck gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (n = 7-11).

- (A) Vergleich von GCKO- und WT-Mäuse. Mann-Whitney-Test: WT: pre vs post Milrinon $p=0,959$; GCKO: pre vs post Milrinon $*p=0,0364$.
- (B) Vergleich von SM-GCKO- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren. Mann-Whitney-Test: Kontrolle: pre vs post Milrinon $p=0,235$; SM-GCKO: pre vs post Milrinon $***p=0,0004$.

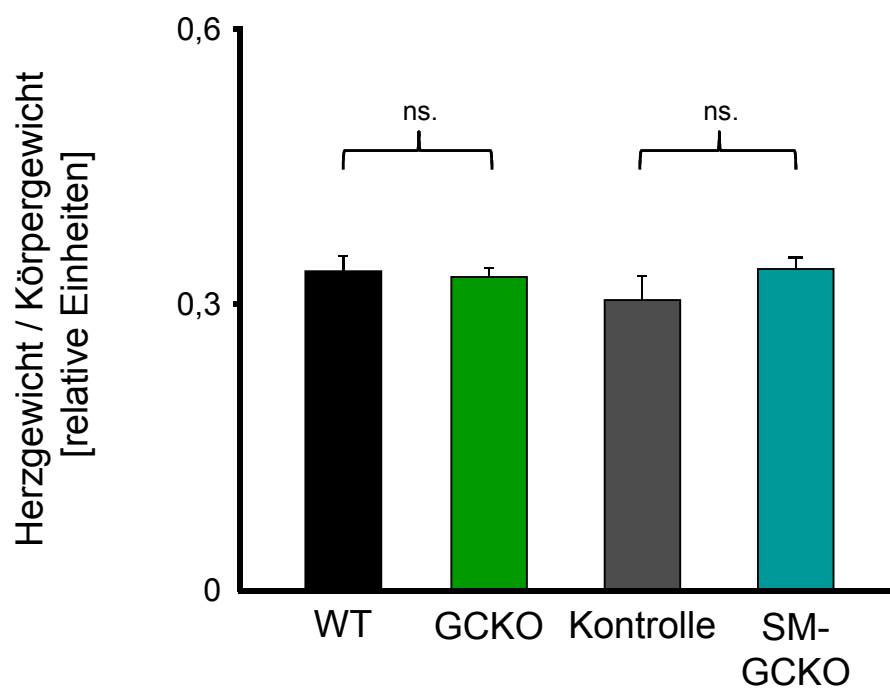


Abb. 17: Spezifisches Herzgewicht der GCKO- und SM-GCKO-Mäuse sowie deren Kontrollen

Körper- und Herzgewichte von etwa fünf Monate alten KO- und Kontrollmäusen wurden bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6-12); Mann-Whitney-Test: WT vs GCKO p=0,815; Kontrolle vs SM-GCKO p=0,157.

Es betrug ebenfalls ca. 0,45 relative Einheiten (Abb. 17). Damit lässt sich festhalten, dass der Hypertonus beider Mauslinien zumindest in einem Alter von etwa 3 Monaten keine Hypertrophie des Herzens zur Folge hat.

5 Diskussion

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen im Organismus beteiligt. Die NO/cGMP-Kaskade nimmt im kardiovaskulären System bei der Gefäßrelaxation und bei der Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation eine entscheidende Rolle ein (Friebe und Koesling 2003, Groneberg et al., 2010). Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist der wichtigste Rezeptor für das freigesetzte Signalmolekül NO, welches über die Stimulation der Guanylyl-Cyclase eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration bewirkt (Förstermann et al., 1986; Ignarro et al., 1986) (Abb. 1). cGMP wiederum wirkt auf eine Reihe von Effektormolekülen, unter anderem auf die PKG. Außerdem hemmt cGMP die cAMP-abbauende PDE3. Damit bildet die PDE3 eine Schnittstelle zwischen den beiden second messengern cGMP und cAMP.

Zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung eines Enzyms können 'knock-out'-Tiermodelle erzeugt werden. Durch Deletion der β_1 -Untereinheit konnte eine Mauslinie generiert die ein vollständiger Knockout der NO-GC ist (Friebe et al., 2007). Diese Mäuse weisen eine stark verminderte Lebenserwartung und Wachstumsretardierung auf. Aufgrund reduzierter gastrointestinalen Motilität zeigen die β_1 -defizienten Mäuse eine drastisch verlängert Darmpassagezeit. Weiterhin weisen adulte Tiere eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks von 30 mmHg im Vergleich zu WT-Geschwistertieren auf. Organbadversuche der Aorta zeigten, dass eine NO-stimulierte Relaxation der glatten Muskulatur nicht mehr stattfindet (Friebe et al., 2007). Um die Funktion der NO-GC und die physiologischen Mechanismen in glatter Muskulatur detaillierter untersuchen zu können, wurde eine KO-Mauslinie generiert, bei der lediglich glatte Muskelzellen für die NO-GC defizient sind (SM-GCKO). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion der NO-GC in der glatten Muskulatur die NO-vermittelte Erhöhung der cGMP-Produktion wie auch eine Relaxation der Aorta ausbleibt. Die transgenen Mäuse entwickeln 3-4 Wochen nach Tamoxifen-Injektion einen Hypertonus (Groneberg et al., 2010).

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung der PDE3. Die PDE3 gehört zu der PDE-Familie mit gemischter Spezifität, baut also cAMP und cGMP ab. Der Wert der V_{max} für cAMP ist 4 - 10 mal höher als für cGMP, sodass cGMP in der Anwesenheit von cAMP als kompetitiver Inhibitor der PDE3 wirkt. Deswegen wird die PDE3 auch cGMP-inhibierte cAMP-abbauende-PDE genannt (Degerman et al., 1997). Mit den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen soll die Auswirkung des Fehlens der NO-GC auf

die PDE3 und den Crosstalk zwischen cGMP und cAMP sowohl in den GCKO- als auch in den SM-GCKO-Mäusen untersucht werden.

5.1 Bedeutung der NO-GC für den cGMP/cAMP-Crosstalk in Thrombozyten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass NO und damit auch cGMP wichtig für die Hemmung der Thrombozytenaggregation ist (Dangel et al., 2010). Die PDE3 wird in Thrombozyten stark exprimiert (Huang et al., 2006). Daher wurde zunächst dieses Zellsystem in Bezug auf den cGMP/cAMP-Crosstalk untersucht.

Mittels Western-Blot konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die PDE3-Expression in GCKO-Thrombozyten im Vergleich zu WT-Kontrollen um die Hälfte reduziert war. Eine Veränderung der PDE3-Aktivität durch die Deletion der NO-GC wurde daraufhin untersucht. Diese Messungen zeigten keine eindeutige Veränderung der PDE3-Aktivität; Grund hierfür könnte eine Kompensation durch andere in Thrombozyten exprimierte PDE-Isoformen sein. Um die quantitative Veränderung der PDE3 in Thrombozyten daraufhin auch funktionell zu untersuchen, wurde folgender physiologischer Hintergrund genutzt: Prostaglandin E₁ (PGE₁) hemmt die Thrombozytenaggregation über eine Stimulierung der Adenylyl-Cyclase. Es kommt zu einer Akkumulation von cAMP in Thrombozyten. Diese cAMP-Akkumulation kann bei gleichzeitiger Anwesenheit von cGMP durch Hemmung der PDE3 verstärkt werden. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4 zu sehen. Dieser Mechanismus funktioniert nur bei intakter NO/cGMP-Signalkaskade. In den GCKO-Mäusen fehlt die NO-GC und die Kaskade ist unterbrochen. Es wird kein cGMP synthetisiert, welches wiederum nicht die PDE3 hemmt. Daher kommt es nicht zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in GCKO-Thrombozyten, im Gegensatz zu den WT-Kontrollen. Mit diesem Experiment wird deutlich, dass die PDE3 in GCKO-Thrombozyten einen Einfluss auf den cGMP/cAMP-Crosstalk hat. Insgesamt könnte man die reduzierte PDE3-Expression in Thrombozyten so interpretieren, dass die Zelle die cAMP-vermittelte Signaltransduktion zu schützen versucht. Ein Fehlen des endogenen PDE3-Inhibitors cGMP würde ja zu einem vermehrten Abbau des cAMPs führen. Daher wird über einen nicht bekannten Mechanismus, wahrscheinlich cGMP-vermittelt, die Expression der PDE3 vermindert.

5.2 Bedeutung der PDE3 für die glatte Gefäßmuskulatur

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass das Fehlen der NO-GC in Thrombozyten einen Einfluss auf die beiden second messenger cGMP und cAMP hat. Da glatte Gefäßmuskulatur ebenfalls PDE3 exprimiert, wurde im Weiteren die glatte Aortenmuskulatur von GCKO- und SM-GCKO-Mäusen untersucht. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits durch Untersuchungen der Aorta im Organbad gezeigt werden, dass eine NO-stimulierte Relaxation der glatten Muskulatur in NO-GC-defizienten Mäusen nicht stattfindet (Friebe et al., 2007). Diese Befunde unterstreichen die wichtige Funktion der NO-GC und damit auch des second messengers cGMP in der glatten Gefäßmuskulatur. NO bewirkt eine Gefäßdilataion, welche über das Signalmolekül cGMP vermittelt wird. Die PDE3-Expression in der glatten Gefäßmuskulatur der Aorta war in beiden KO-Mausmodellen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Kontrollen um etwa die Hälfte vermindert. Es stellte sich die Frage, ob diese Reduzierung der PDE3-Expression durch die Deletion der NO-GC und damit durch die verminderte Konzentration an cGMP bedingt war. Alternativ wäre denkbar, dass der erhöhte systolische Blutdruck beider Mauslinien für die verminderte PDE3-Expression verantwortlich war.

Um diese Frage zu klären wurde mit den SM-GCKO-Mäusen ein Verlaufsexperiment durchgeführt. Hierzu wurde den SM-GCKO-Mäusen zur Induktion der Deletion Tamoxifen injiziert und zu definierten Zeitpunkten die Aorten entnommen. Mittels Western-Blot wurde dann die Expression der NO-GC und der PDE3 analysiert. Es ließ sich eine Abnahme sowohl der NO-GC als auch der PDE3 feststellen. Hierbei verlief die Abnahme der PDE3-Expression parallel zu der Abnahme der NO-GC-Expression. Hieraus ergibt sich ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Expression der NO-GC sowie der Expression der PDE3. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der entstehenden Hypertonie und der Verminderung der PDE3-Expression zu untersuchen, wurde bei den KO- bzw. WT-Mäusen zu den jeweiligen Zeitpunkten der systolische Blutdruck mittels Schwanzplethysmographie gemessen. Dieser stieg über einen Zeitraum von 30 Tagen nach Tamoxifen-Injektion kontinuierlich an. Erst etwa 30 Tage nach Tamoxifen-Injektion wurde ein Maximum von 30 mmHg im Vergleich zu den WT-Tieren erreicht. Da die PDE3-Expression allerdings schon fünf Tage nach Tamoxifen-Injektion deutlich vermindert war, eine Hypertonie sich aber erst nach 30 Tagen einstellte, kann somit der erhöhte systolische Blutdruck beider KO-Mauslinien für die Abnahme der PDE3-Expression nicht verantwortlich sein. Wie auch schon in den Thrombozyten gezeigt, ist offenbar das von der NO-GC gebildete cGMP verantwortlich für die Regulation der PDE3-Expression. Eine mögliche Ursache hierfür

könnte eine Kopplung der Translation von NO-GC und PDE3 sein. Jedoch ist bereits bekannt, dass die DNA-Abschnitte, welche für die NO-GC und die PDE3 kodieren, nicht in räumlichen Zusammenhang zueinander stehen. Vorstellbar wäre außerdem eine Regulation der PDE3-Expression durch cGMP auf der Ebene der Translation. Der Mechanismus einer solchen NO-GC vermittelten (cGMP-abhängigen) Translationskontrolle wird jedoch noch Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Ein Beispiel für eine Regulation der PDE3 auf Expressions-Ebene konnte bereits in einem Mausmodell für pulmonale Hypertension gezeigt werden (Busch et al., 2010).

Im Anschluss an die Untersuchung der PDE3-Expression sollte der Einfluss der veränderten PDE3-Expression auf die Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur analysiert werden. Im Organbad wurden Aortenringe von GCKO-, SM-GCKO- und deren jeweiligen WT-Kontrollen mit Milrinon in ansteigender Konzentration inkubiert. Dabei ließ sich eine Linksverschiebung der Kurven für beiden KO-Mausmodelle im Vergleich zu deren WT-Kontrollen feststellen. Die Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur für Milrinon war in beiden KO-Mausmodellen im Vergleich zu deren WT-Kontrollen erhöht. Dies war erstaunlich, da die Expression der PDE3, wie oben beschrieben, vermindert war. Es wäre anzunehmen gewesen, dass durch eine verminderte Menge an Zielprotein (PDE3) der spezifische Inhibitor Milrinon weniger Wirkung auf die Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur in den KO-Mäusen hat. Eine veränderte Aktivität der PDE3 lässt sich als Ursache der erhöhten Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur in den KO-Mausmodellen nicht festhalten, da die Untersuchungen der PDE3-Aktivität keine eindeutigen Ergebnisse erbrachten. Ein mögliche Erklärung für die erhöhte Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur für Milrinon wäre Folgende: Durch das Fehlen der NO-GC, kommt es zu einer Verminderung der Konzentration an cGMP, dem endogenen Inhibitor der PDE3. Milrinon, als Substratanalogon, muss daher nicht mehr mit cGMP um eine Bindung an der PDE3 konkurrieren. Es kommt zu einer vermehrten Bindung und damit auch zu einer verstärkten Wirkung des Milrinons. Die glatte Gefäßmuskulatur der GCKO- und SM-GCKO-Tiere relaxiert stärker, als die der WT-Kontrollen.

5.3 Bedeutung der PDE3 in Herzgewebe

Wichtige Parameter zur Einstellung des Blutdrucks sind zum einen die Pumpkraft des Herzens, zum anderen die Relaxationsfähigkeit der Gefäße. In der Gefäßwand ist die PDE3 stark exprimiert und, wie oben gezeigt, ändert sich die PDE3-Expression bei Deletion der NO-GC in GCKO- und SM-GCKO-Mäusen. Ein weiteres Gewebe, in

welchem PDE3 vermehrt exprimiert wird, ist das Myokard (Hambleton et al., 2005; Vandeput et al., 2009). Die PDE3 ist für die physiologische Herzkontraktion sehr wichtig. Katecholamine bewirken über G-Proteine eine Stimulierung der Adenylcyclase und somit einen Anstieg der cAMP-Konzentration. Dieses cAMP führt über die PKA zu einer Phosphorylierung von Ca^{2+} -Kanälen, wodurch sich deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht. Durch den Ca^{2+} -Einstrom erfolgt die Kontraktion der Herzmuskelzellen. Die Regulation der cAMP-Konzentration orientiert sich im Herzmuskelgewebe somit am Aktivitätszustand des vegetativen Nervensystems, speziell des Sympathikus. In anderen Forschungsprojekten (Ding et al., 2005) konnte bereits gezeigt werden, dass cAMP eine wesentliche Rolle im Remodelling des Herzgewebes und im klinischen Bild der Herzinsuffizienz spielt. In insuffizienten Herzen ist die Expression der PDE3 dabei signifikant vermindert und die Apoptose-Rate der Kardiomyozyten deutlich erhöht.

Im Myokard konnten außerdem folgende Ergebnisse bezüglich der PDE3-Expression erhoben werden. Hier konnte keine Veränderung zwischen den WT-Tieren sowie den GCKO- und SM-GCKO-Mäusen festgestellt werden. In Thrombozyten und glatter Gefäßmuskulatur dagegen war ein deutlicher Unterschied in der PDE3-Expression nachweisbar, welcher vermutlich abhängig von der intrazellulären cGMP-Konzentration war. Allerdings ist im Myokard die NO-GC wesentlich weniger stark exprimiert als in Thrombozyten und glatter Gefäßmuskulatur (Mergia et al., 2003). Es lässt sich daher schlussfolgern, dass die veränderte NO/cGMP-Signalskaskade auf die PDE3-Expression im Myokard keinen Einfluss hat.

5.4 Bedeutung der PDE3 für den Blutdruck in GCKO- und SM-GCKO-Mäusen

Der arterielle Blutdruck ist definiert zum einen aus dem Schlagvolumen und zum anderen aus der Dehnbarkeit, also der Relaxationsfähigkeit der Widerstandsgefäße. Das Schlagvolumen multipliziert mit der Frequenz ergibt das vom Herzen pro Zeit ausgeworfene Volumen – das Herzzeitvolumen (HZV). Als Blutdruckamplitude wird die Differenz zwischen systolischem Druck in der Anspannungsphase und diastolischem Druck in der Entspannungsphase bezeichnet. Aus einem Ungleichgewicht zwischen dem Schlagvolumen und der Relaxationsfähigkeit der Gefäßmuskulatur resultiert eine gesteigerte Blutdruckamplitude (Hypertonie). Aus einem Bluthochdruck, der einer der verbreitetsten Risikofaktoren der westlichen Welt ist, kann bei nicht therapierter

Persistenz eine Vielzahl von kardiovaskulären Krankheiten wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt oder Herzinsuffizienz resultieren.

Der Arzneistoff Milrinon kann zur Therapie einer dekompensierten akuten Herzinsuffizienz eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um einen spezifischen PDE3-Inhibitor, welcher die Inotropie des Herzens erhöht. Durch Hemmung der PDE3 wird die Konzentration des second messengers cAMP erhöht. cAMP spielt, wie oben beschrieben, bei der Kontraktilität des Herzens eine essenzielle Rolle. Die Beteiligung der PDE3 an der Blutdruck-Regulation konnte mit einem *in vivo* Versuch auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Mäuse bekamen Milrinon mit dem Trinkwasser. Schon ab dem nachfolgenden Tag zeigten die KO-Mäuse einen Anstieg des systolischen Blutdrucks um weitere 10 mmHg. Dieser Anstieg ist sehr wahrscheinlich zurückzuführen auf die positiv inotrope Wirkung des Milrinons auf die Herzmuskelzellen. In den WT-Tieren stieg der Blutdruck dagegen durch die Milrinon-Gabe nicht an. In unseren KO-Modellen konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion der NO-GC die PDE3-Expression vermindert war. Daher sollte man annehmen, dass Milrinon bei verminderter Expression an PDE3 auch eine verminderte Wirkung hat. Aber wie bereits oben beschrieben, ist die Relaxationsfähigkeit der glatten Muskulatur im Organbad durch Milrinon auch nur geringfügig verändert. Um also zu erklären, warum der Blutdruck in beiden KO-Mausmodellen nach Milrinon-Gabe ansteigt, muss man die einzelnen Komponenten betrachten, aus denen sich der Blutdruck zusammensetzt. Zunächst wirkt Milrinon auf die Inotropie des Herzens. Wir gehen davon aus, dass diese Wirkung bei den KO-Mäusen und den WT-Tieren identisch ist. Denn, wie oben bereits beschrieben, findet sich kein Unterschied der PDE3-Expression und der PDE3-Aktivität im Herzen zwischen KO- und WT-Mäusen. Der Blutdruck ist aber abhängig zum einen von dem HZV zum anderen vom Gefäßwiderstand. Milrinon wirkt positiv inotrop und erhöht somit auch indirekt das Schlagvolumen des Herzens. Allerdings muss auch noch die Wirkung auf das vaskuläre System und damit auf den Gefäßwiderstand berücksichtigt werden. Der Organismus ist bestrebt den Blutdruck und damit den Perfusionsdruck der Organe konstant zu halten. Bei gesteigerter Pumpkraft des Herzens würde sich der Blutdruck bei starren Gefäßwänden erhöhen. Um diesem entgegenzuwirken, relaxieren die Gefäßwände bei steigender Herzleistung. Der Blutdruck bleibt somit in den WT-Tieren konstant. Durch das Fehlen der NO-GC ist die Relaxationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur in den KO-Mausmodellen jedoch vermindert und eine Kompensation der durch Milrinon gesteigerten Inotropie findet nicht mehr ausreichend statt. Dadurch

könnte der steigende Blutdruck beider KO-Mausmodelle nach Milrinon-Gabe erklärt werden.

In weiteren Analysen konnte kein Unterschied im Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis zwischen den WT- und KO-Tieren festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren erstaunlich, denn ein länger bestehender Bluthochdruck hat eine Anpassung des Herzens an die vermehrt nötige Schlagkraft zur Folge. Es resultiert eine konzentrische Hypertrophie des Herzmuskelgewebes. Zunächst kommt es zu einer Hypertrophie und einem Verlust der geordneten Struktur der einzelnen Myozyten und Myofibrillen. Dieser Vorgang ist einer von verschiedenen Kompensationsmechanismen an die vermehrt zu leistende Arbeit. Bei weiterhin bestehendem Hochdruck erfolgt eine zunehmende Fibrosierung des Herzgewebes durch gesteigerte Proliferation von Bindegewebszellen. Durch diese beiden Prozesse kommt es zu einer absoluten Gewebsvermehrung des Herzens. Somit hätten wir auch ein verändertes Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis erwartet. Eine mögliche Begründung für diese Diskrepanz könnte das Alter der verwendeten Mäuse sein. Die Tiere waren überwiegend jünger als fünf Monate und die Hypertrophie des Herzgewebes vermutlich noch nicht feststellbar ausgeprägt. In weiteren Experimenten könnte eine genauere histologische Untersuchung des Herzgewebes erfolgen, um genauer zu analysieren, in wieweit eine Anpassung des Herzens an den erhöhten systolischen Bluthochdruck in den KO-Mausmodellen erfolgt ist. Außerdem sollten zusätzlich ältere Tiere auf ein verändertes Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) ist der wichtigste Rezeptor für das freigesetzte Signalmolekül NO und katalysiert die Bildung des second messenger cGMP. Die NO/cGMP Signalkaskade ist im kardiovaskulären System essentiell für die Hemmung der Thrombozytenaggregation und des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und trägt damit zur Regulation des Blutdrucks bei. In der Arbeitsgruppe wurden Mauslinien generiert, bei denen die NO-GC ubiquitär (GCKO) oder spezifisch in glatten Muskelzellen (SM-GCKO) ausgeschaltet ist. Beide Mausstämme zeigen eine arterielle Hypertonie mit einem Anstieg des systolischen Blutdrucks um 30 mmHg im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren.

Neben cGMP ist auch cAMP als weiterer second messenger in einer Reihe von Regulationsprozessen im kardiovaskulären System involviert. Die Intensität und Dauer eines cAMP-Signals wird zum einen durch seine Synthese durch die Adenylyl-Cyclasen, zum anderen durch seine Hydrolyse durch die Phosphodiesterasen (PDE) bestimmt. Dabei spielt die PDE3 als cGMP-inhibierte, cAMP-abbauende PDE eine wichtige Rolle im sogenannten cGMP/cAMP-Crosstalk. Ein wichtiges Instrument zur Untersuchung PDE3-abhängiger Prozesse ist der spezifische Hemmstoff Milrinon.

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PDE3-Expression abhängig ist von der Expression des cGMP-produzierenden Enzyms NO-GC: So zeigte sich in Thrombozyten wie auch in glatten Gefäßmuskelzellen nach Deletion der NO-GC im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Reduktion der PDE3 um die Hälfte. Diese Reduktion der PDE3-Expression war sowohl in den glatten Muskelzellen von GCKO- wie auch von SM-GCKO-Mäusen zu finden. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die Down-Regulation der PDE3 in glatter Gefäßmuskulatur in SM-GCKO-Mäusen parallel zur Reduktion der NO-GC und nicht parallel zum daraus resultierenden Anstieg des Blutdrucks verläuft. Die Reduktion der PDE3-Expression ging mit einer Verminderung der Aktivität in den Thrombozyten und glatten Muskelzellen des GCKOs einher. In Herzmuskelgewebe dagegen änderten sich Expression und Aktivität der PDE3 nicht. Der spezifische PDE3-Hemmstoff Milrinon führte zu einem weiteren Anstieg des systolischen Blutdrucks in den KO-Linien, nicht aber in Kontrolltieren.

Zusammenfassend spielt die PDE3 eine wichtige Rolle im cGMP/cAMP-Crosstalk sowohl in Thrombozyten als auch in glatten Gefäßmuskelzellen von Mäusen.

7 Literaturverzeichnis

Alderton, W.K., Cooper, C.E. und Knowles, R.G.

Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **357(Pt3)**: 593-615.

Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. und Price, T.D.

Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* **11**: 330-4.

Beavo, J.A.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* Oct;75(4):725-48.

Belfrage P., Fredrikson G., Olsson H. und Strålfors P.

Molecular mechanisms for hormonal control of adipose tissue lipolysis. *Int J Obes.* 1985;9 Suppl 1:129-35.

Bender, A.T. und Beavo, J.A.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* **58(3)**: 488-520.

Biel, M., Zong X., Ludwig, A., Sautter, A. und Hofmann, F.

Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Re. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**: 151-171.

Bult, H., Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Jordaens, F.H., Van Maercke, Y.M. und Herman, A.G.

Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic noncholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**: 346-347.

Busch C.J., Graveline A.R., Jiramongkolchai K., Liu H., Sanchez L.S. und Bloch K.D.

Phosphodiesterase 3A expression is modulated by nitric oxide in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol Pharmacol.* ;61(6):663-9.

Busse R. und Fleming I.

Vascular endothelium and blood flow. *Handb Exp Pharmacol.* ;(176 Pt 2):43-78.

Böhme, E., Jung, R. und Mechler, I.

Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol.* **38**, 199-202.

Böhme, E., Grossmann, G., Herz, J., Mulsch, A., Spies, C. und Schultz, G..

Regulation of cyclic GMP formation by soluble guanylate cyclase: stimulation by NO-containing compounds. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **17**: 259-66.

Buechler, W. A., Nakane, M. und Murad, F.

Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 351-7.

Bradford, M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54.

Bredt, D.S. und Snyder, S.H.

Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 682-5.

- Conti M, Iona S., Cuomo, M., Swinnen J.V., Odeh J. und Svoboda M.E.**
 Characterization of a hormone-inducible, high affinity adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase from the rat Sertoli cell. *Biochemistry*. Jun 27;34(25):7979-87
- Chinkers, M. und Wilson, E. M.**
 Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J. Biol. Chem.* 267, 18589-18597.
- Dangel, O., Mergia, E., Karlisch, K., Groneberg, D., Koesling, D., Friebe, A.**
 NO-sensitive guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating platelet inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.8:1343 – 1352.
- Degerman, E., Belfrage, P. und Manganiello, V. C.**
 Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J. Biol. Chem.* 272, 6823-6826.
- Diamond, J.**
 Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 327-340.
- Ding, B., Abe, J., Wei, H., Huang, Q., Walsh, R.A., Molina, C.A., Zhao, A., Sadoshima, J., Blaxall, B.C., Berk, B.C. und Yan C.**
 Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation*. May 17;111(19):2469-76.
- Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V. und Hofmann F.**
 Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology*. 33(11): 1275-82.
- Drewett, J.G. und Garbers D.L.**
 The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr. Rev.* 15, 135-62.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. und Lyubarsky, A.L.**
 Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*. 313: 310-3.
- Field, M., Graf, L. H., Jr., Laird, W. J. und Smith, P.L.**
 Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2800-2804.
- Förstermann U.**
 Properties and mechanisms of production and action of endothelium-derived relaxing factor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 8 Suppl 10:S45-51.
- Förstermann, U., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M. und Murad, F.**
 Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* Oct 24;42(10):1849-57.
- Francis SH, Houslay MD, Conti M.**
 Phosphodiesterase inhibitors: factors that influence potency, selectivity, and action. *Handb Exp Pharmacol.* (204):47-84.
- Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. und Koesling, D.**
 Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:7699-704.

- Friebe A, und Koesling D.**
Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):96-105.
- Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegn, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B, Redfield, M.M. und Burnett, J.C. Jr.**
Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 17(6):251-8.
- Gerzer, R., Hofmann, F. und Schultz, G.**
Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem.* 116: 479-86.
- Groneberg D., König P., Wirth A., Offermanns S., Koesling D., Friebe A.**
Deletion of the NO receptor in smooth muscle leads to hypertension Hypertension based on smooth muscle-specific deletion of the NO receptor guanylyl cyclase. *Circulation.* 2010;121: 401 - 409.
- Groneberg D., König P., Koesling D., Friebe A.**
Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is dispensable for nitrergic signaling and gut motility in mouse intestinal smooth muscle. *Gastroenterology.* 2011 May;140(5):1608-17.
- Gibbins, J.M.**
Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 117 (Pt16): 3415-25.
- Goldberg, N.D., Dietz, S.B. und O'Toole, A.G.**
Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine. *J Biol Chem.* 244(16): 4458-66.
- Gyrko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M.C. und Huang, P.L.**
Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278(3): 971-81.
- Hambleton, R., Krall, J., Tikishvili, E., Honeggar, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C. und Movsesian, M.A.**
Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. *J Biol Chem.* Nov 25;280(47):39168-74.
- Hardman, J.G. und Sutherland, E.W..**
Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* 244(23): 6363-70.
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G. und Böhme, E.**
Expression of soluble Guanylyl-Cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 272: 221-3.
- Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E. und Schultz, G.**
Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 292, 217-222.
- Haslam, R. J., Davidson, M. M., Davies, T., Lynham, J. A. und McClenaghan, M. D.**
Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 533-552.
- Henry, Y., Lepoivre, M., Drapier, J.C., Ducrocq, C., Boucher, J.L. und Guissani, A.**
EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.* Sep;7(12):1124-34.

- Hevel, J.M., White, K.A., und Marletta, M.A..**
Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.* 266(34): 22789-91.
- Hofmann, F., Ammendola, A. und Schlossmann, J.**
Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* 113, 1671-1676.
- Hofmann, F.**
The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 280(1): 1-4.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. und Schlossmann, J.**
Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* 86(1): 1-23.
- Houdebine, L.M.**
Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol.* 360: 163-202.
- Hughes, J. M., Murad, F., Chang, B. und Guerrant, R. L.**
Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. *Nature* 271, 755-756.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K.D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G. und Böhme, E.**
Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur. J. Biochem.* 190: 273-8
- Huang P.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Snyder S.H. und Fishman M.C.**
Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75, 1273-1286.
- Huang P.L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A. und Fishman MC.**
Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.
- Huang, S.H., Zhang, W., Pixley, R.A., Jameson, B.A., Huang, Y.C., Colman, R.F. und Colman, R.W.**
New insights from the structure-function analysis of the catalytic region of human platelet phosphodiesterase 3A: a role for the unique 44-amino acid insert. *J Biol Chem.* Sep 29;281(39):29236-44.
- Hunter, W.M. und Greenwood, F.C.**
A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem J.* 91(1): 43-56.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. und Chaudhuri, G.**
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9265-9.
- Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S. und Kadowitz, P. J.**
Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237, 893-900.
- Iwata, T., Uchida-Mizuno, K., Katafuchi, T., Ito, T., Hagiwara, H. und Hirose, S.**
Bifunctional atrial natriuretic peptide receptor (type A) exists as a disulfide-linked tetramer in plasma membranes of bovine adrenal cortex. *J. Biochem. (Tokyo)* 110, 35-39.
- Janis, R.A. und Diamond, J.**
Relationship between cyclic nucleotide levels and drug-induced relaxation of smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* Dec;211(3):480-4.

- Laemmli, U.K.**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lincoln, T.M., Komalavilas, P. und Cornwell, T.L.**
Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension*. Jun;23(6 Pt 2):1141-7.
- Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. und De Jonge, H.R.**
Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 307-312.
- Lowe, D.G.**
Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry* 31, 10421-10425.
- Manganiello, V.C., Taira, M., Degerman, E., Belfrage, P.**
Type III cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE3 gene family). *Cell Signal*. Jul;7(5):445-55.
- Makino, H., Manganiello, V.C. und Kono, T.**
Roles of ATP in insulin actions. *Annu Rev Physiol.* 56:273-95.
- Mayer, B., John, M. und Böhme, E.**
Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* 277, 215-219.
- Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Ohlstein, E.H., Pontecorvo, E.G., Hyman, A.L., Murad, F., Mittal, C.K., Arnold, W.P., Katsuki, S. und Kimura, H.**
Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 145-158.
- Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L. und Kadowitz, P. J.**
Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'- monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57: 946-55.
- Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M. und Koesling, D.**
Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J. Clin. Invest.* 116: 1731-1737.
- Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. und Koesling, D.**
Major occurrence of the new alpha(2)beta(1) isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell. Signal.* 15, 189-195.
- Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Sabanai K., Tasaki H., Suda O., Nakata S., Tanimoto A., Wang K.Y., Ueta Y., Sasaguri Y., Nakashima Y. und Yanagihara N.**
Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10616-10621.
- Murad, F., Förstermann, U., Nakane, M., Pollock, J., Tracey, R., Matsumoto, T. und Buechler, W.**
The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 28, 101-109.

- Murad, F.**
Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. *Adv Pharmacol.* 26: 1-5.
- Murray, F., MacLean, M.R. und Pyne, N.J.**
Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol.* 2002 Dec;137(8):1187-94.
- Nathan, C.F. und Hibbs, J.B..**
Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 3(1): 65-70.
- Nathan, C.**
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064.
- Nakamura, T. und Gold, G.H.**
A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature.* 325: 442-444.
- Nakane, M., Saheki, S., Kuno, T., Ishii K. und Murad F.**
Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1139-1147.
- Nakane, M., Arai, K., Saheki, S., Kuno, T., Buechler, W. und Murad, F.**
Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 265, 16841-16845.
- Nilius, B. und Droogmans, G.**
Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 81, 1415-1459.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H.R., Lohmann, S.M. und Walter, U.**
Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9426-30.
- Kasuya, J., Goko, H. und Fujita-Yamaguchi, Y.**
Multiple transcripts for the human cardiac form of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *J Biol Chem.* Jun 16;270(24):14305-12.
- Keilbach, A., Ruth, P. und Hofmann, F..**
Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* 208: 467-73.
- Kimura, H. und Murad, F..**
Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem.* 249(21): 6910-6.
- Klages, B., Brandt, U., Simon, M.I., Schultz, G. und Offermanns, S.**
Activation of G12/13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell Biol.* 144: 745-54.
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. und Moncada, S.**
Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5159- 5162.

- Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K.D., Mülsch, A., Böhme, E., Schultz, G. und Frank, R.**
The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* 239, 29-34.
- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G. und Böhme, E.**
The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 266, 128-132
- Koesling, D. und Friebe, A..**
Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 135: 41-65.
- Kots A.Y., Martin E., Sharina I.G. und Murad F.**
Handb Exp Pharmacol.;(191):1-14.
- Kuhn M.**
Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases.
Handb Exp Pharmacol.;(191):47-69.
- Pfeifer A., Aszódi A., Seidler U., Ruth P., Hofmann F. und Fässler R.**
Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science.* 1996 Dec 20;274(5295):2082-6.
- Pfeifer A., Klatt P., Massberg S., Ny L., Sausbier M., Hirneiss C., Wang G.X., Korth M., Aszódi A., Andersson K.E., Krombach F., Mayerhofer A., Ruth P., Fässler R. und Hofmann F.**
Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998;17:3045–3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. und Hofmann, F..**
Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 135: 105-49.
- Pryzwansky, K.B., Kidao, S., Wyatt, T.A., Reed, W. und Lincoln, T.M..**
Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol.* 57(4): 670-8.
- Rall, T.W. und Sutherland, E.W..**
Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem.* 232(2): 1065-76.
- Russwurm, M., Wittau, N. und Koesling, D.**
Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 44647-44652.
- Sanders, K.M. und Ward, S.M..**
Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol.* 262(3 Pt 1): 379-92.
- Schultz, G., Böhme, E. und Munske, K..**
Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 8(24): 1323-32.
- Schmidt, H.H. und Murad, F.**
Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(3): 1372-7.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C.**
Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- Steiner, A. L., Wehmann, R. E., Parker, C. W. und Kipnis, D. M.**
Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 2, 51-61.
- Sixma, J.J. und Wester, J..**
The hemostatic plug. *Semin Hematol.* 14(3): 265-99.
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F. und Nathan, C.F..**
Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(17): 7773-7.
- Stone, J.R. und Marletta, M.A.**
Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* 34, 14668-74.
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V.**
Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* Oct; 83(4):1325-58.
- Tesmer J.J. und Sprang S.R.**
Structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol.* 8: 713-9.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Tranguch S. und Huet-Hudson Y.**
Decreased viability of nitric oxide synthase double knockout mice. *Mol Reprod Dev* 65, 175-179.
- Vandeput, F., Krall, J., Ockaili, R., Salloum, F.N., Florio, V., Corbin, J.D., Francis, S.H., Kukreja, R.C., und Movsesian M.A.**
cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 330:884–891.
- Walter, U. und Gambaryan, S.**
Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood.* 104(8): 2609.
- Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E., et al.,**
Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562
- Wernet, W., Flockerzi, V. und Hofmann, F.**
The cDNA of the two isoforms of bovine cGMPdependent protein kinase. *FEBS. Lett.* 251: 191-6.
- Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. und Liew, F.Y.**
Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375(6530): 408-11.

- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Muller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. und Kaupp, U.B.**
Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature*. 368(6474): 859-63.
- White, A.A. und Aurbach, G.D.**
Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. **191(3)**: 686-97.
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U.B. und Weyand, I..**
Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol*. 142(2): 473-84.
- Yau, K.W. und Nakatani, K.**
Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. *Nature*. 317: 252-255.
- Yuen, P.S., Potter, L.R. und Garbers, D.L.**
A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 29, 10872-10878.
- Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K. und Kawai, C..**
Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem*. 266(19): 12544-7.
- Zatz, R. und de Nucci, G.**
Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am J Physiol*. Aug;261(2 Pt 2):F360-3.
- Zou, M.H., Klein, T., Pasquet, J.P. und Ullrich, V.**
Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. *Biochem J*. 336, 507-512.
- Zou, M.H., Leist, M., Ullrich, V.**
Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am.J.Pathol*. 154, 1359-1365.

8 Eigene Publikationen

Publikationen

Dangel O., Mergia E., **Karlisch K.**, Groneberg D., Koesling D., Friebe A.:
NO-sensitive guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating platelet inhibition.
Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2010;8:1343 - 1352.

Abstracts

Karlisch K., Groneberg D., Koesling D., Friebe A.:
Role of PDE3 on cGMP/cAMP crosstalk in mice deficient in NO-sensitive guanylyl
cyclase. 51. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und
klinische Pharmakologie und Toxikologie, 23. - 25.03.2010, Mainz.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Friebe danke ich für Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und für seine jederzeit gewährte, freundliche und kompetente Betreuung. Danke für die Förderung von methodischem Denken, Danke für die Hilfestellung beim Erstellen von wissenschaftlichen Texten und Danke für Würzburg.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Stefan Frantz für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Bei Frau Prof. Dr. Doris Koesling möchte ich mich für die Aufnahme an ihrem Institut (Pharmakologie und Toxikologie in Bochum) bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Team der Pharmakologie und Toxikologie in Bochum, die mir immer tatkräftig zur Seite gestanden haben und mit denen ich viele schöne Stunden in der Pause oder bei privaten Treffen erlebt habe (Ronald Jäger, Oliver Dangel, Ulla Krabbe, Arkadius Pacha, Medah Öczan, Friedrich Eichhorst, Erika Mannheim).

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kommilitonen und Kommilitoninnen bedanken, die während des Studiums immer für mich da waren und mit denen ich auch das sessile-serratierte Adenom und das Landesprüfungsamt überstanden habe (Anne-Kathrin Dalchow, Anna-Charlotte Dieckhoff, Marco Höler, Katharina Schlang, Simona Schneppe, Sascha Zaraket).

Selbstverständlich wäre diese Arbeit nicht ohne die grenzenlose Unterstützung meiner Eltern zu Stande gekommen, die mir das Studium und eine Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Danke an meine Eltern und meine Geschwister für die vielen außergewöhnlichen Stunden, die wir zusammen erlebt haben.

Besonders danke ich natürlich Dr. Dieter Groneberg, ohne den diese Arbeit nie Ihre Form bekommen hätte. Danke für die Einarbeitung in die einzelnen Methoden, die administrative Unterstützung und danke für deine unermüdliche Geduld mit mir. Danke, dass Du in meinem Leben bist.