

**Untersuchungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation von cAMP in  
intakten vaskulären Myocyten**



**Analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of cAMP in intact  
vascular smooth muscle cells**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

**Kathrin von Hayn**

aus

**Kronach**

**Würzburg, 2010**

**Eingereicht**

**am:**

.....

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r:**

.....

**1.**

**Betreuer:**

.....

**2. Betreuer:** .....

**3.**

**Betreuer:**

.....

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden**

**ausgehändigt**

**am:**

.....

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
3.1. <i>Physiologische Grundlagen.....</i>	11
3.1.1. Regulation der glatten Gefäßmuskulatur .....	11
3.1.2. Ca <sup>2+</sup> und cAMP in der glatten Gefäßmuskulatur: Mediatoren von Kontraktion und Relaxation .....	11
3.2. <i>Pharmakologische Grundlagen.....</i>	12
3.2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren .....	13
3.2.2. G-Proteine .....	13
3.2.3. Bildung und Abbau von cAMP .....	16
3.2.4. Das cAMP-Effektorprotein Epac.....	18
3.2.5. Mechanismen, die zum Anstieg der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration führen...	19
3.2.6. Das Wechselspiel von Ca <sup>2+</sup> und cAMP .....	21
3.3. <i>Detektion von cAMP-Änderungen und Ca<sup>2+</sup>-Signalen .....</i>	23
3.3.1. Fura-2-AM zur Detektion von Ca <sup>2+</sup> Signalen in intakten Zellen .....	23
3.3.2. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zur Detektion von cAMP-Änderungen in intakten Zellen .....	24
3.3.3. cAMP-Änderungen in lebenden Geweben und <i>in vivo</i> .....	25
3.4. <i>Zielsetzung.....</i>	27
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Material.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Methoden .....</b>	<b>32</b>
4.2.1. <i>Zellen.....</i>	32
4.2.1.1. Präparation vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC).....	32
4.2.1.2. Transfektion der glatten Muskelzellen .....	32
4.2.1.3. Transfektion der HEK-TsA201 Zellen.....	33
4.2.1.4. FRET-Messungen <i>in-vitro</i> .....	33
4.2.1.5. cAMP Messungen in intakten Zellen .....	34
4.2.1.6. Ca <sup>2+</sup> -Messungen .....	35
4.2.1.7. Simultanmessung von Ca <sup>2+</sup> und cAMP .....	35

4.2.1.8. RNA Isolierung und RT-PCR Experimente.....	35
4.2.1.9. Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität.....	36
4.2.1.10. Western-Blot-Analyse.....	37
4.2.1.10.1. Probenvorbereitung:.....	37
4.2.1.10.2. Proteinbestimmung: .....	38
4.2.1.10.3. SDS-Polyamid-Gelelektrophorese und Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen .....	39
4.2.1.10.4. Detektion der immobilisierten Proteine.....	40
4.2.1.11. Aufbereitung der Daten und statistische Analyse.....	40
4.2.1.11.1. Photometrische FRET-Messungen (cAMP-Messungen): .....	40
4.2.1.11.2. Bildgebende Messungen (Ca <sup>2+</sup> -Messungen, Simultanmessungen):.....	41
4.2.2. <i>Transgene Mäuse</i> .....	41
4.2.2.1. DNA-Klonierung .....	41
4.2.2.2. Aufreinigung der DNA für Pronukleus-Injektion.....	43
4.2.2.3. Genotypisierung .....	43
4.2.2.4. Überprüfung der Fluoreszenzintensität von VSMCs aus transgenen Mäusen..	44
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Beobachtung von Ca<sup>2+</sup>- und cAMP-Signalen in intakten VSMCs in Echtzeit .....</b>	<b>45</b>
5.1.1. <i>Endogen exprimierte G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren auf VSMCs.....</i>	45
5.1.2. <i>Stimulation von P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren führt nicht zu einer Änderung der basalen cAMP-Konzentrationen .....</i>	46
5.1.3. <i>Stimulation von P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs.....</i>	47
5.1.4. <i>Berechnung absoluter cAMP-Konzentrationen mit Hilfe einer in vitro-Kalibrierung .</i>	49
5.1.5. <i>Der Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration .....</i>	51
5.1.5.1. <i>Die Aktivierung von P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.....</i>	51
5.1.5.2. <i>Der Rückgang der cAMP-Konzentration in vorstimulierten VSMCs wird auch durch andere Ca<sup>2+</sup>-erhöhende Substanzen verursacht.....</i>	53
5.1.5.3. <i>Die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Änderung der cAMP-Konzentration ist unabhängig von PDE1 .....</i>	54
5.1.5.4. <i>Die Überexpression der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen AC4 verhindert den UDP-induzierten Rückgang der cAMP-Konzentration.....</i>	56
5.1.5.5. <i>Überexpression von AC6 bewirkt keine Änderung des durch UDP verursachten Effekts .....</i>	57

5.1.5.6. Transfektion der VSMCs mit siRNA gegen die Adenylatcyclasen 5 und 6 verringert den UDP-induzierten Rückgang der cAMP-Konzentration.....	59
5.1.5.7. Die durch $\beta$ -Rezeptoren vermittelte Stimulation der Adenylatcyclasen ist durch $\text{Ca}^{2+}$ hemmbar .....	61
<b>5.2. Generierung glattmuskelspezifischer Epac1-camps-transgener Mäuse .....</b>	<b>61</b>
5.2.1. Expression des Transgens unter dem glattmuskelspezifischen Promotor SM445 ..	62
5.2.2. Generierung glattmuskelspezifischer Epac1-camps transgener Mäuse mit Hilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems .....	64
5.2.3. FRET-Messungen in glattmuskelspezifischen Epac1-camps-transgenen Mäusen .	66
5.2.4. Funktionalität des von den transgenen Tieren exprimierten Epac1-camps .....	67
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>6.1. Die Wechselwirkung von <math>\text{Ca}^{2+}</math> und cAMP in isolierten VSMCs .....</b>	<b>68</b>
6.1.1. Der Epac1-camps erlaubt die Berechnung absoluter cAMP-Konzentrationen in lebenden Zellen.....	69
6.1.2. UDP verursacht nur in vorstimulierten VSMCs physiologisch relevante Änderungen der cAMP-Konzentration .....	70
6.1.3. $\text{Ca}^{2+}$ ist Mediator des durch UDP ausgelösten Effekts.....	71
6.1.4. Phosphodiesterasen sind nicht primär für den durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs verantwortlich.....	73
6.1.5. Adenylatcyclase 5 und 6 werden durch den Anstieg von intrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ gehemmt und führen so zum Rückgang der cAMP-Konzentration .....	73
6.1.6. Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen: Unterschiede und ähnliche Ergebnisse..	75
6.1.7. Ausblick.....	77
<b>6.2. Gewebsspezifische Expression des Epac1-camps in einer transgenen Mauslinie .....</b>	<b>78</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>

## 1. Zusammenfassung

Die Regulation des Tonus glatter Muskelzellen wird entscheidend von den beiden antagonistisch wirkenden second messengern cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst. Ein Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob diese beiden Botenstoffe auch direkten Einfluss aufeinander haben können und welche Enzyme in diesem Fall an den Prozessen beteiligt sind.

cAMP-Signale in intakten Zellen konnten wir in Echtzeit mit Hilfe des FRET-basierten cAMP-Sensors Epac1-camps beobachten;  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale durch Markieren der Zellen mit Fura-2. Anstiege der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in VSMCs wurden durch Aktivierung von endogen exprimierten,  $\text{G}_q$ -gekoppelten  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren mit Uridindiphosphat (UDP) ausgelöst. Durch eine zusätzliche *in-vitro* Kalibrierung des Epac1-camps konnten darüber hinaus absolute cAMP-Konzentrationen in einzelnen lebenden Zellen berechnet werden.

Während ein Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf nicht vorstimulierte VSMCs keinen signifikante Einfluss auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen hatte, bewirkte die Aktivierung der purinergen Rezeptoren einen deutlichen Rückgang der intrazellulären cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs. Dieser Effekt konnte sowohl durch die Komplexbildung von  $\text{Ca}^{2+}$  mit BAPTA-AM als auch durch die Überexpression der  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitiven AC4 antagonisiert werden. Adenylatcyclase-Aktivitäts-Assays in VSMC-Membranen zeigten ebenfalls einen Rückgang der Cyclaseaktivität nach Zugabe von 2 und 5  $\mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Hemmung der einzigen  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierbaren PDE1 mit dem selektiven PDE1-Inhibitor 8-Methoxymethyl-IBMX (8-MM-IBMX) hatte im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die durch UDP verursachte Änderung der cAMP-Konzentration in vorstimulierten VSMCs. Schließlich bewirkte die Herunterregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibierbaren AC5 und 6 mit siRNA einen signifikante Hemmung des durch UDP verursachten Effekts.

Fasst man alle diese Ergebnisse zusammen, so lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Der durch purinerge Stimulation verursachte Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs wird durch eine Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -hemmbaren AC5 und 6 vermittelt. Dadurch sind zwei für die Regulation des

Tonus wichtige Signalwege in VSMCs miteinander verbunden, die sich somit gegenseitig entscheidend beeinflussen können.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Entwicklung eines transgenen Mausmodells, das glattemuskelspezifisch den cAMP-Sensor Epac1-camps exprimiert. Mit Hilfe eines solchen Tiermodells könnten in Zukunft cAMP-Änderungen in intakten Geweben und vielleicht sogar in lebenden Tieren beobachtet werden. Durch Anwendung des Cre-loxP-Rekombinationssystems gelang es eine glattemuskelspezifische, für den Epac1-camps transgene Mauslinie zu generieren. Mit isolierten VSMCs dieser Tiere konnten bereits erste FRET-Messungen durchgeführt und agonistinduzierte cAMP-Änderungen beobachtet werden.

## 2. Abstract

Regulation of smooth muscle tone is crucially determined by the antagonistic second messengers cAMP and  $\text{Ca}^{2+}$ . One aim of this work was to investigate, if these two mediators can also affect each other directly and which enzymes take part in these processes.

For observing cAMP signals in living cells with a temporally high resolution, we used the fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cAMP sensor Epac1-camps. For monitoring changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , cells were labeled with Fura-2. Rises in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  were achieved by activation of on vascular smooth muscle cells (VSMCs) endogenously expressed  $G_q$ -coupled  $\text{P2Y}_6$  receptors with uridine diphosphate (UDP). Additional, *in-vitro* calibration of the Epac1-camps allowed the calculation of absolute cAMP concentrations in single living cells.

An increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in non-prestimulated VSMCs did not significantly influence intracellular cAMP concentrations. Activation of purinergic receptors of isoproterenol-prestimulated cells with UDP provoked a clear decrease of intracellular cAMP concentrations. This effect was blocked by the complexation of  $\text{Ca}^{2+}$  with BAPTA-AM as well as by overexpression of  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitive AC4. Furthermore, adenylyl cyclase activity assays in the presence of 2 and 5  $\mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$  in VSMC membranes showed a decline in cyclase activity. Inhibition of PDE1, the only  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphodiesterase (PDE), with the selective PDE1 inhibitor 8-methoxymethyl-IBMX, in contrast, had no effect on UDP-evoked changes in cAMP concentrations in isoproterenol-prestimulated VSMCs. Finally, knockdown of  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitable AC5 and 6 with siRNA significantly inhibited the UDP-evoked decrease in cAMP concentrations in isoproterenol-prestimulated VSMCs.

To merge all these results, one can draw the following conclusion:

The purinergically evoked decrease in cAMP concentrations in isoproterenol-prestimulated VSMCs is caused by an inhibition of AC5 and 6 which is mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ . This mechanism interlinks two essential antagonistic signaling pathways for the regulation of smooth muscle tone.

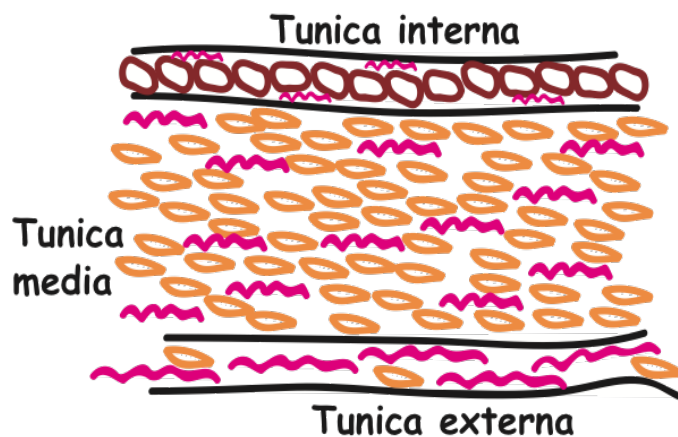
An additional part of this work was to develop a transgenic mouse model, which expresses smooth-muscle-specifically Epac1-camps. In the future, these animals



could provide the possibility to observe cAMP signals in intact tissues or even in living animals. With the help of the Cre-loxP recombination system, we achieved to generate such a smooth-muscle-specific transgene. Afterwards FRET measurements in isolated vascular smooth muscle cells of these animals were possible and we were also able to observe agonist-induced cAMP changes in these isolated cells.

### 3. Einleitung

Das aus der Gesamtheit aller Blutgefäße gebildete Gefäßsystem stellt das wichtigste Transportsystem des Körpers dar [2]. Es transportiert Atemgase, Nährstoffe, Metabolite des Zellstoffwechsels und Hormone. Durch seine Transportfunktion ist es sowohl an der zellulären als auch der humoralen Immunantwort des Körpers beteiligt, sorgt zusätzlich für eine Konstanz des Wasser und Elektrolythaushalts, für die



**Abb. 1:** Die Gefäßwand besteht aus 3 unterschiedlich aufgebauten Schichten.

Außen befindet sich die tunica externa, die das Gefäß durch elastische und kollagene Fasern mit der Umgebung verbindet. Vereinzelt können sich bereits in dieser Schicht glatte Muskelzellen befinden [1].

In der Mitte schließt sich die tunica media an, die hauptsächlich aus glatten Muskelzellen besteht. Je näher ein Gefäß am Herzen ist, desto stärker ist diese Schicht von elastischen Fasern durchsetzt, und desto dehnbarer ist es.

Die innerste Schicht eines Gefäßes wird als tunica interna bezeichnet. Sie besteht aus einer einzelligen Schicht von Endothelzellen, die von feinen kollagenen Fasern und einer gefensterten Membran umgeben sind [2].

Modifiziert nach Thews, Mutschler, Vaupel [2]

und Relaxation glatter Muskelzellen, die je nach Gefäßtyp, zusammen mit mehr oder weniger elastischen Fasern, in der mittleren Schicht der Gefäßwand (tunica media) angeordnet sind [2] (Abb.1).

Die Regulation von Relaxation und Kontraktion der glatten Muskelzellen selbst wird durch verschiedenste extrazelluläre Botenstoffe vermittelt. Diese regulieren, vornehmlich über heptahelikale Rezeptoren, intrazelluläre Signale. Vermittelt werden

Regulation des pH-Wertes und dient der Wärmeregulation des Körpers [2].

Der für die Aufrechterhaltung der Transportfunktion wichtige Blutdruck im Gefäßsystem wird neben dem Herzzeitvolumen durch den peripheren Widerstand geregelt und aufrechterhalten [1]. Durch Veränderung des Gefäßtonus kann der periphere Widerstand den jeweiligen Bedürfnissen des Körpers angepasst werden. Reguliert wird er dabei hauptsächlich durch Kontraktion

diese meist über die intrazellulären Botenstoffe  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP, die in der Regel gegensätzliche Effekte in der Zelle auslösen.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit Veränderungen dieser beiden Mediatoren in lebenden glatten Muskelzellen zu beobachten und gleichzeitig deren gegenseitigen Einfluss aufeinander zu untersuchen.

### **3.1. Physiologische Grundlagen**

#### **3.1.1. Regulation der glatten Gefäßmuskulatur**

Durch Kontraktion und Relaxation steuert die glatte Muskulatur, wie bereits erwähnt, Blutfluss und -druck [3]. Hauptregulatoren der Spannung der glatten Gefäßmuskulatur sind Sympathikus, dessen Impulse zur Kontraktion führen, und Parasympathikus, dessen Einfluss die Relaxation des Gefäßsystems zur Folge hat [2]. Zusätzlich gibt es, gewissermaßen zur autonomen Feinregulation, periphere Regulationsmechanismen. So kann die Kontraktion eines Gefäßes einfach durch einen erhöhten Druck auf die Gefäßwand ausgelöst werden. Zur Dilatation kommt es beispielsweise bei sinkenden Sauerstoff- und steigenden Kohlendioxidkonzentrationen im Blut. Weitere wichtige Regulatoren des Gefäßtonus sind zirkulierende Hormone wie Noradrenalin und Adrenalin und körpereigene Botenstoffe wie beispielsweise Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Auch vom Gefäßendothel freigesetztes NO und ATP spielen eine wichtige Rolle bei der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [2-5].

#### **3.1.2. $\text{Ca}^{2+}$ und cAMP in der glatten Gefäßmuskulatur: Mediatoren von Kontraktion und Relaxation**

Die Aktivierung der Kontraktion glatter Muskelzellen wird durch eine meist periodisch oszillierende Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern verursacht [6]. Hormone oder Neurotransmitter aktivieren, beispielsweise durch Bindung an  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren die Bildung von  $\text{IP}_3$  und DAG, die beide  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auslösen, aber auch verstärken können.  $\text{IP}_3$  führt zunächst zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern durch Aktivierung und Sensibilisierung von  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren. Gleichzeitig können durch die Agonisten selbst oder durch das gebildete DAG  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Zytoplasmamembran aktiviert werden, was einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außen bewirkt [6]. Dieses, von der extrazellulären Seite stammende  $\text{Ca}^{2+}$ , dient nun hauptsächlich der Wiederauffüllung der intrazellulären

Speicher und dadurch zur Sensibilisierung von Ryanodinrezeptoren (RyR). Je nach Glattmuskelzelltyp kann nun das initiale  $\text{Ca}^{2+}$  Signal durch RyR oder  $\text{InsP}_3$  amplifiziert werden und sich über die ganze Zelle ausbreiten [6]. Dieses globale Signal ist für die Kontraktion der Zelle verantwortlich. Dafür bindet das freie  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin, das durch Phosphorylierung die Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) aktiviert, die wiederum durch Phosphorylierung die leichten Ketten des Myosin II aktiviert. Diese Phosphorylierung erlaubt nun die Bindung an Aktin und führt letztendlich zur Kontraktion der Zelle [7, 8].

Durch Rückführung des freien  $\text{Ca}^{2+}$  in intrazelluläre Speicher mit Hilfe der SERCA (sarco/endoplasmatic reticulum calcium ATP-ase) oder durch Auswärtstransport mit Hilfe von ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen oder  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern wird die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle eingeleitet. Die MLCK-Aktivität sinkt daraufhin und die Phosphatgruppen am Myosin werden durch eine Myosinphosphatase (MLCP) wieder abgespalten [7].

cAMP kann nun auf unterschiedliche Art und Weise die Relaxation der glatten Muskulatur fördern. Meist wird dies durch die durch cAMP-aktivierte Proteinkinase A (PKA) vermittelt. PKA soll durch Phosphorylierung der MLCK deren Affinität zum  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex senken und somit deren Aktivierung verhindern [9]. Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob dieser Mechanismus in glatten Muskelzellen von Bedeutung ist [10]. Wahrscheinlich ist aber die durch PKA vermittelte Phosphorylierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen relevant, deren Öffnungswahrscheinlichkeit dadurch vermindert wird, so dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außen abnimmt [11]. cAMP selbst kann den Rho (Ras homolog gene family)/ROK (Rho-Kinase)-Signalweg inhibieren [12, 13]. Dies steigert die Aktivität der MLCP, die folglich in größerem Maße die aktive, phosphorylierte Form von Myosin II dephosphoryliert, was dessen Interaktion mit Aktin verhindert und letztendlich zur Relaxation der glatten Muskelzelle führt. Relaxierend wirkt sich weiterhin eine durch cAMP vermittelte Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit von  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren aus. Dies hat eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation zur Folge und führt damit zu einem verminderten Glattmuskeltonus [14].

### **3.2. Pharmakologische Grundlagen**

cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  spielen, wie bereits beschrieben, eine zentrale Rolle in der Regulation von Relaxation und Kontraktion der glatten Muskulatur. Sie dienen dabei

als Botenstoffe (second messenger) und leiten, zusammen mit in den Zellen lokalisierten Enzymen, Signalkaskaden ins Innere einer Zelle weiter.

Ausgelöst werden solche Signalkaskaden durch zwei verschiedene Prinzipien. Zum einen gibt es sehr kleine, lipophile Moleküle, die direkt durch die Plasmamembran in das Zellinnere vordringen können um dort durch Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül die Weiterleitung eines Signals initiieren. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass größere, hydrophile Moleküle, die auf Grund dieser Eigenschaften nicht durch die Zellmembran diffundieren können, von außen an in der Zellmembran lokalisierte Rezeptoren binden. Diese membranständigen Rezeptoren lassen sich in 3 Hauptgruppen unterteilen: Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren, Enzym-gekoppelte Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Letztere stellen die größte Gruppe membranständiger Rezeptoren dar.

### **3.2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bestehen aus 7 transmembranären Domänen, haben einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus [15]. Außerhalb und innerhalb der Zellmembran besitzt jeder GPCR 3 interhelikale Loops. Die große Gruppe der GPCRs kann in 5 Hauptfamilien unterteilt werden: Die Rhodopsinfamilie als bekannteste und größte, die Secretin-, die Adhäsions- und die frizzled-taste-2-Familie. Unter anderem sind GPCRs für das Riechen, für das Sehen und für die Wahrnehmung sensorischer Reize verantwortlich. Auch wirken etwa 30% aller zugelassenen Arzneimittel an GPCRs [15]. Es existieren sehr viele verschiedene Signalmoleküle, wie Hormone, Neurotransmitter und lokale Mediatoren, die durch Bindung an den jeweiligen Rezeptor, dessen Aktivierung auslösen [16]. Auch strukturell unterscheiden sich diese Agonisten sehr stark voneinander. Die Bandbreite reicht von sehr kleinen Molekülen, wie beispielsweise Adrenalin und Noradrenalin, bis hin zu sehr großen Glykoproteinen, wobei die Bindungsstellen am Rezeptor an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sein können. Auch kann ein und derselbe Agonist an mehrere verschiedene Rezeptoren binden und diese aktivieren [16].

### **3.2.2. G-Proteine**

Um das Signal, das von der Bindung eines Agonisten an einen GPCR ausgeht, ins Zellinnere weiterzuleiten, bindet ein G-Protein an den aktivierten Rezeptor, der nun

durch eine Konformationsänderung eine Bindungsstelle für das G-Protein freigegeben hat. Dieses heterotrimere Protein ist dann für die Signalweiterleitung in das Zellinnere verantwortlich. G-Proteine sind Heterotrimere und bestehen aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit, wobei  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit so fest aneinander gebunden sind, dass sie nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziieren [15]. Die  $\alpha$ -Untereinheit kann sich hingegen zumindest *in vitro* relativ einfach abspalten. Es sind 21  $\alpha$ -, 6  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Untereinheiten bekannt. Die 21  $\alpha$ -Untereinheiten lassen sich wiederum in 4 Gruppen einteilen:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$  und  $\alpha_{12}$  [15]. Die Gruppenzugehörigkeit der  $\alpha$ -Untereinheit entscheidet hauptsächlich, welcher weiterführende Signalweg durch das G-Protein angeschaltet wird, aber auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten haben Einfluss auf die Signaltransduktion [17]. Gemeinsam sind allen  $\alpha$ -Untereinheiten ein im Ruhezustand gebundenes GDP, eine intrinsische GTPase Aktivität und eine Bindungsstelle für  $\beta\gamma$ . Grundsätzlich können verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten an verschiedene  $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden, wobei sich die verschiedenen Kombinationen aber in der Signalweiterleitung unterscheiden können. Die Signaltransduktion ins Zellinnere durch das G-Protein beginnt damit, dass durch die Bindung an den Rezeptor die Konformation des G-Proteins so geändert wird, dass ein bis dahin an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenes GDP dissoziieren kann. Nachfolgend bindet ein GTP-Molekül an die  $\alpha$ -Untereinheit, was den Komplex zwischen aktiviertem Rezeptor und G-Protein destabilisiert. Rezeptor,  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta\gamma$ -Untereinheit ändern daraufhin, zumindest wenn es sich um  $G_i$ -Proteinen handelt, ihre relative Anordnung zueinander [18, 19]. Für  $G_s$ - und  $G_q$ -Proteine ist noch nicht abschließend geklärt, ob sich diese ebenfalls reorganisieren oder, wie bisher angenommen, dissoziieren. In jedem Fall können aber  $\alpha$  und  $\beta\gamma$  im Anschluss an die Destabilisierung des Komplexes an nachgeschaltete Proteine der Signalkaskade binden. Das Ende der Signaltransduktion ist die Umwandlung von GTP in GDP durch die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit. Einige Bakterielle Toxine können durch Ribosylierungen in den G-Protein-Zyklus eingreifen und somit die Aktivität von G-Proteinen entscheidend beeinflussen. Die ADP-Ribosylierung von  $G_i$ -/ $G_o$ -Proteinen durch PTX entkoppelt diese irreversibel vom Rezeptor und verhindert dadurch die Aktivierung des  $G_i$ -/ $G_o$ -Signalwegs [17]. Cholera-Toxin aktiviert, in diesem Fall durch Ribosylierung von  $\alpha_s$ -Untereinheiten, permanent den  $G_s$ -Signalweg.

Wie bereits erwähnt entscheidet hauptsächlich die Gruppenzugehörigkeit der  $\alpha$ -Untereinheit darüber, welches Effektorprotein durch das G-Protein angesprochen wird. Stimulatorische G-Proteine ( $G_s$ -Proteine mit  $\alpha_s$ -Untereinheit) aktivieren Adenylatcyclasen, die aus der Zellmembran stammendem ATP unter Abspaltung eines Pyrophosphatrests cAMP synthetisieren. cAMP bindet anschließend an Proteinkinase A (PKA), deren katalytische Aktivität dadurch manifest wird [7]. PKA kann dann verschiedene, am Stoffwechsel beteiligte Enzyme aktivieren oder inhibieren. PKA bewirkt dadurch beispielsweise Synthese und Abbau von Glucagon, die Synthese von Steroidhormonen, den Abbau von Fettgewebe und, durch Hemmung der Myosinkinase, die Relaxation der glatten Muskulatur [7]. Erhöhte cAMP-Spiegel in der Zelle können aber auch direkt auf die Transkription verschiedener Enzyme wirken. PKA wird in diesem Fall in den Zellkern transloziert und aktiviert dort durch Phosphorylierung das cAMP-response-element binding protein (CREB). Dieses löst, nach Bindung an das cAMP-response-element (CRE), zusammen mit einem anderen Transkriptionsfaktor und einer Polymerase, die Transkription des betreffenden Gens aus [7].

Die Familie der inhibitorischen G-Proteine ( $G_i$ -Proteine mit  $\alpha_i$ -Untereinheit) besteht aus 4 Mitgliedern ( $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$ ,  $\alpha_{i3}$  und  $\alpha_{iz}$ ). Alle binden, genau wie die stimulatorischen G-Proteine, an Adenylatcyclasen. Allerdings bewirkt die Bindung von  $G_i$  an eine Cyclase deren Hemmung und führt dadurch zu einer Erniedrigung der cAMP-Konzentration in der Zelle.  $G_i$ -Proteine fungieren also gewissermaßen als Gegenspieler der stimulatorischen G-Proteine. Weit überwiegend sind Effekte nur dann feststellbar, wenn vorher Adenylatcyclasen durch  $G_s$ -Proteine aktiviert wurden [20]. Dabei können sie wahrscheinlich auch auf Ionenkanäle und Phosphodiesterasen wirken [17]. Weiterhin scheint es im Falle der inhibitorischen G-Proteine so zu sein, dass nicht nur die  $\alpha$ -Untereinheiten für die Signalweitergabe verantwortlich sind. V.a. nach  $G_i$ -Aktivierung werden durch  $\beta\gamma$  verursachte Signalkaskaden ausgelöst. Dies hängt aber wahrscheinlich hauptsächlich damit zusammen, dass  $G_i$ -Proteine die am häufigsten in Zellen vorkommenden G-Proteine sind und somit nach deren Aktivierung hier in größerem Maße als bei anderen  $\beta\gamma$ -Untereinheiten frei werden, um als Signalüberträger zu fungieren [20].

Die dritte wichtige Gruppe der G-Proteine sind  $G_q$ -gekoppelte G-Proteine. Diese aktivieren das membrangebundene Enzym Phospholipase C $\beta$ . Diese spaltet

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, die sich in kleinen Mengen in der inneren Hälfte der Plasmamembran befinden, in Inositol-1,4,5-Phosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) [16, 21]. IP<sub>3</sub> verlässt dann die Plasmamembran und diffundiert im Cytosol schnell zum Endoplasmatischen Reticulum (ER). In dessen Membran bindet es an IP<sub>3</sub>-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, was zu einer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung in den Intrazellularraum führt [16]. Der Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann dann beispielsweise die Kontraktion glatter Muskelzellen bewirken. Zur Beendigung der Signalübertragung wird IP<sub>3</sub> durch spezielle Phosphatasen schnell zu IP<sub>2</sub> abgebaut. Es kann allerdings auch zu IP<sub>4</sub> phosphoryliert werden und wiederum als Signalmolekül wirken. Das freigesetzte Ca<sup>2+</sup> wird schnell aus der Zelle oder wieder zurück ins ER gepumpt. Das zweite Spaltprodukt der Phospholipase C $\beta$ , das Diacylglycerol, bleibt im Gegensatz zum IP<sub>3</sub> in der Zellmembran. Zum einen wird es dort weiter zu Arachidonsäure gespalten, aus der letztendlich Prostaglandine und Leukotriene entstehen. Zum anderen aktiviert Diacylglycerol Proteinkinase C (Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteinkinase) [13]. Diese Aktivierung erfolgt an der Plasmamembran durch Diacylglycerol zusammen mit Ca<sup>2+</sup> und dem negativ geladenem Membranphospholipid Phosphatidylserin. PKC wiederum phosphoryliert, abhängig vom Zelltyp, viele verschiedene Zielproteine, die meist Einfluss auf Genexpression, Proliferation und Differenzierung nehmen.

### **3.2.3. Bildung und Abbau von cAMP**

Wie bereits beschrieben wird cAMP durch Adenylatcyclasen aus ATP synthetisiert. Adenylatcyclasen sind Proteine mit 12 Transmembrandomänen. Sie haben 2 homologe ATP-Bindedomänen, große C- und N-Termini und alle 9 Isoformen besitzen eine hochkonservierte katalytische Domäne, die sich im Cytosol befindet [22]. Bis auf die Isoformen 2, 4 und 7 befinden sich wahrscheinlich alle Adenylatcyclasen in bestimmten Mikrodomänen, den sog. lipid rafts [22-24] in der Zellmembran. Dies erlaubt eine gewisse räumliche Nähe zu anderen Enzymen (z.B. Ca<sup>2+</sup>-Kanälen), die ebenfalls vorzugsweise in diesen Domänen lokalisiert sind. Neben den 9 membrangebundenen Isoformen existiert auch eine lösliche, die aber im Gegensatz zu den membrangebundenen nicht durch G-Proteine regulierbar ist [22, 25]. Alle anderen sind, wenn auch unterschiedlich stark, durch stimulierende G-Proteine aktivierbar [20]. Die Unterschiede in der Empfindlichkeit der Aktivierung



durch  $G_s$  sind aber wahrscheinlich nicht abhängig vom Rezeptor, durch den das  $G$ -Protein aktiviert wird, sondern viel mehr abhängig davon, wie der zelluläre Gesamtkontext aussieht. Im Falle der Hemmung durch inhibitorische  $G$ -Proteine zeigen die verschiedenen Isoformen aber charakteristische Verhaltensweisen.  $G_i$  kann die Cyclasen 1, 3, 5, 6, 8 und 9 entweder über die  $\alpha$ - oder die  $\beta\gamma$ -Untereinheit oder beide inhibieren, im Falle der Cyclasen 2, 4 und 7 führt  $\beta\gamma$  nach  $G_i$ -Stimulation dahingegen zu einer Aktivierung [22]. Bis auf AC2, 4 und 7 sind alle Isoformen durch  $Ca^{2+}$  bzw. den Komplex aus  $Ca^{2+}$  und Calmodulin (CaM) regulierbar [25]. Alle Adenylatcyclasen sind durch unphysiologisch hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen hemmbar, AC5 und 6 verlieren jedoch bereits bei  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen unter 1  $\mu$ M stark an Aktivität [26]. In diesem Fall durch eine direkte Bindung von  $Ca^{2+}$  an das Enzym und dadurch eine Verdrängung von  $Mg^{2+}$ , das normalerweise als Cofaktor zur Aktivierung der beiden Cyclasen beiträgt [27, 28]. Die Isoformen 1 und 8 werden durch den  $Ca^{2+}$ /CaM-Komplex aktiviert und auch AC 3 wird durch diesen Komplex moduliert, wobei in diesem Fall noch nicht genau geklärt wurde, ob  $Ca^{2+}$ /CaM zu einer Aktivierung oder Hemmung führt [22]. Ein weiterer Mechanismus zur Beeinflussung der Adenylatcyclaseaktivität ist die Phosphorylierung durch Proteinkinasen (PKs). PKA wirkt so auf AC5 und 6 hemmend, während PKC alle  $Ca^{2+}$ -insensitiven Cyclasen (AC2, 4 und 7) stimuliert [22]. Wie oben bereits beschrieben wird sowohl die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER als auch die Aktivierung der PKC durch eine Stimulierung  $G_q$ -gekoppelter Rezeptoren ausgelöst. Da ACs entweder durch  $Ca^{2+}$ , oder wenn dafür insensitiv, durch PKC beeinflusst werden, hat der  $G_q$ -Signalweg Einfluss auf jede Isoform der ACs.

Im Ruhezustand einer Zelle ist die cAMP-Konzentration kleiner als 10 nM, kann aber nach Aktivierung einer Cyclase innerhalb weniger Sekunden bis auf das 20fache ansteigen. Ein so schneller Aufbau eines Botenstoffes macht einen ebenso schnellen Abbau desselben nötig. Dies geschieht durch Phosphodiesterasen (PDEs), die cAMP zu AMP aber auch cyclischen Guaninmonophosphat (cGMP) hydrolysieren können. Die in Säugetieren vorkommenden Klasse-I-PDEs lassen sich in 11 Familien unterteilen, wobei sich einige in jeweils weitere 2-4 Subfamilien aufspalten [29]. Gemeinsam ist ihnen allen eine regulatorische Domäne am N-Terminus, die die enzymatischen Eigenschaften der katalytischen Domäne kontrolliert [29]. PDEs, die den Familien 4, 7 und 8 angehören, hydrolysieren spezifisch nur cAMP, PDEs 5, 6

und 9 nur cGMP. Beide zyklischen Nukleotide werden durch PDE1, 2, 3, 10 und 11 abgebaut [30]. Zur Regulation der Aktivität von PDEs sind verschiedenste Mechanismen bekannt. Beispielsweise werden einige durch die zyklischen Nukleotide selbst aktiviert (PDE2) oder inhibiert (PDE3, 10) [29]. Weiter können neben Enzymen wie PKA (PDE3, 4, 5, 6, 8), PKG (PDE5, 8) oder ERK (PDE4) auch der Komplex aus  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin (CaM) (PDE1) die Aktivität der PDEs regulieren [30].

#### **3.2.4. Das cAMP-Effektorprotein Epac**

Intrazellulär synthetisiertes cAMP leitet Signale einerseits, wie bereits beschrieben, durch die Aktivierung der PKA weiter, kann aber auch an Epac-Proteine binden, die ebenso der Signalübertragung dienen können. Epac steht für „exchange protein directly activated by cAMP“. Bekannt sind bis jetzt die beiden Isoformen Epac1 und Epac2. Beide gehören zur Familie der GEFs („guanine nucleotide exchange factor“) [31]. GEFs dienen dazu, den GDP/GTP-Austausch kleiner G-Proteine zu beschleunigen. Epac1 und Epac2 sind GEFs, die spezifisch an kleine G-Proteine der RAS-Familie, v.a. Rap1 und Rap2, binden [31, 32]. Aktiviert werden beide Epac-Subtypen spezifisch durch cAMP.

Epac1 und Epac2 enthalten eine „cyclic nucleotide binding domain“, eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale katalytische Region. Epac2 besitzt zusätzlich eine zweite Bindestelle für cAMP [31].

Epac-Proteine sind, wie sich im Laufe der letzten 10 Jahre herausstellte, für viele verschiedene intrazelluläre Abläufe verantwortlich [32]. So sind sie beispielsweise zusammen mit PKA für den Rückgang der Zellpermeabilität in Endothelzellen verantwortlich [33]. Auch an der Regulierung der Insulinsekretion sind Epac-Proteine beteiligt. Zum einen kann Epac2 den ATP-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanal in menschlichen beta-Zellen inhibieren [34] und zum anderen sind Epac-Proteine an der Regulierung der Exozytose der Insulin-enthaltenden Vesikel in beta-Zellen beteiligt [35, 36]. Weiterhin ist bekannt, dass Epac an der cAMP-abhängigen Regulation von Mikrotubuli beteiligt ist [37, 38].

In vaskulären glatten Muskelzellen reguliert Epac ebenfalls die cAMP-abhängige Aktivität von ATP-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanälen [39]. Pathophysiologisch ist Epac in vaskulären glatten Muskelzellen deshalb relevant, weil es an der Bildung von

Gefäßverengungen beteiligt ist. Epac fördert die Bildung einer Neointima und führt zusätzlich zu einer verstärkten Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Plaques [40].

### **3.2.5. Mechanismen, die zum Anstieg der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen**

Wie bereits erwähnt erfolgt die Signalweitergabe nach Aktivierung von  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren v.a. durch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [8]. Aber nicht nur hier, sondern auch bei vielen anderen Prozessen in der Zelle spielt  $\text{Ca}^{2+}$  als „second messenger“ eine wichtige Rolle.  $\text{Ca}^{2+}$  kann verschiedene Signalwege aktivieren, welchen ist davon abhängig, durch welchen Stimulus  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt wurde und wie groß und wie lange das daraus resultierende Signal ist, genauso wie dessen räumliche Anordnung und Ausbreitung [41]. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt beispielsweise zur Kontraktion der Muskulatur, zur Sekretion von Neurotransmittern oder Hormonen und ist sogar für den Beginn der Zellteilung nach der Befruchtung einer Eizelle verantwortlich [41].

Grundsätzlich ist es so, dass die meisten Zellen im Ruhezustand eine zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von weniger als 100 nM haben. Steigt diese auf etwa 1  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$  an, so ist die Zelle aktiviert [7, 41]. Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt entweder durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (ER, SR) oder Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum in die Zelle. In beiden Fällen geschieht das durch Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die entweder in der ER-Membran oder der Zellmembran lokalisiert sind.

Die Unterscheidung dieser Kanäle erfolgt nach der Art und Weise wie sie geöffnet werden. Wird die Öffnung durch Bindung eines Liganden an den Kanal ausgelöst, handelt es sich um ligandengesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [7]. Aktiviert werden diese, wenn sie in der Zellmembran lokalisiert sind, beispielsweise durch ATP, Glutamat oder Acetylcholin [41].

Außerdem gibt es ligandengesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Ein Beispiel dafür wäre der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare Ryanodinrezeptor (RyR), ein weiteres, der für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach  $G_q$ -Aktivierung wichtige  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) [41]. Der  $\text{IP}_3\text{R}$  wird, neben ATP [42], vornehmlich durch  $\text{IP}_3$  und durch  $\text{Ca}^{2+}$  selbst reguliert [42-44].  $\text{Ca}^{2+}$  nimmt dabei

eine Sonderstellung ein. Es kann den Kanal nämlich einerseits aktivieren, andererseits aber auch inhibieren. Möglich ist das durch unterschiedlich hohe Affinitäten der inhibitorischen und der stimulatorischen Bindungsstelle des Kanals für  $\text{Ca}^{2+}$ . Die hohe Affinität der vermutlich direkt am Kanalprotein lokalisierten stimulatorischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle für das Ion sorgt für eine Öffnung des Kanals bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an, so bindet das Ion auch an die niedriger affine inhibitorische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle und der Kanal wird inaktiviert [42, 43]. Die inhibitorische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle wird, anders als die stimulatorische, nicht direkt am Kanal vermutet, sondern an einem akzessorischen Protein, höchstwahrscheinlich dem Calmodulin.  $\text{IP}_3$  selbst kommt bei der Regulierung der  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren eine eher indirekte Rolle zu.  $\text{IP}_3$  reguliert den Zugang von  $\text{Ca}^{2+}$  zur stimulatorischen Bindungsstelle. Weiterhin verhindert  $\text{IP}_3$  die Inhibierung des Rezeptors durch  $\text{Ca}^{2+}$ , vermutlich durch Störung des Zusammenspiels von Calmodulin und  $\text{Ca}^{2+}$ . So kann ein  $\text{IP}_3\text{R}$  nur durch  $\text{Ca}^{2+}$  inaktiviert werden, wenn kein  $\text{IP}_3$  mehr am Rezeptor gebunden ist [43].

Eine weitere Möglichkeit, die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erhöhen, ist die Aktivierung einer Gruppe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die sich nur öffnen, wenn die intrazellulären Speicher, z.B. nach Aktivierung von  $\text{IP}_3$  Rezeptoren, geleert wurden. Dieser, als „store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry“ (SOCE) bezeichnete, Mechanismus kann vermutlich durch unterschiedliche Kanäle vermittelt werden, obwohl bis jetzt nur einer, mit dem Namen CRAC ( $\text{Ca}^{2+}$ -release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  current), ausführlich untersucht und charakterisiert wurde [45]. Er gilt aber auf Grund seiner klaren biophysikalischen Eigenschaften als Prototyp für SOC-Kanäle [45]. CRAC-Kanäle zeichnen sich durch eine extrem hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität, wie sie sonst nur von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen bekannt ist, aber eine extrem niedrige Leitfähigkeit aus. Außerdem sind sie ausschließlich und quantifizierbar durch die Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aktivierbar [45]. Man nimmt an, dass der CRAC-Kanal entweder aus direkt interagierenden Orai1- und STIM1-Molekülen besteht oder aus einem Multiproteinkomplex, der diese beiden Proteine beinhaltet [46]. STIM1 fungiert dabei als „ $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor“, der die Leerung des Speichers anzeigt und so die Aktivierung des Kanals einleitet [46].

Liegt schließlich eine genügend hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle vor, so können dadurch verschiedenste „ $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren“, wie das ubiquitär vorkommende Calmodulin, aktiviert werden, die dann das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in der Zelle weitergeben.

### 3.2.6. Das Wechselspiel von $\text{Ca}^{2+}$ und cAMP

Mittlerweile wurde in vielen Arbeiten beschrieben, dass  $\text{Ca}^{2+}$  direkten Einfluss auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen nehmen kann.

Für eine elektrisch erregbare, Insulin-freisetzende MIN6  $\beta$ -Zelllinie, die mit dem Epac1-camps transfiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass cAMP  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig nach Depolarisation durch hohes  $\text{K}^+$  oder Tolbutamid oder durch Behandlung der Zellen mit Glucose periodisch oszillierend ansteigt und abfällt [47]. Diese Oszillationen sind synchron mit den induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen in den Zellen. Die Autoren führen die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige cAMP-Synthese auf AC1 und 8 zurück. Für den Abbau des cAMP machen sie die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare PDE1C verantwortlich. In ganzen Langerhans'schen Inseln von Mäusen, die transgen für einen PKA-abhängigen cAMP-Sensor sind, führt der durch Glucose induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in den Zellen nur zu einem stabilen Anstieg des intrazellulären cAMP, nicht jedoch zu Oszillationen [48].

cAMP-Konzentrationen von HEK293-Zellen, die mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren AC8 transfiziert wurden, oszillieren synchron mit künstlich verursachten oder durch Agonist induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten [49], solange die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen eine bestimmte Frequenz nicht überschreiten. Die Aktivierung der AC8 funktioniert in diesen Zellen nur durch  $\text{Ca}^{2+}$ , das durch Aktivierung des CCE von außen in die Zelle einströmt. Der diesen Beobachtungen zugrunde liegende Mechanismus ist zunächst die  $\text{Ca}^{2+}$  induzierte Aktivierung der AC8, das dadurch synthetisierte cAMP aktiviert PKA, die wiederum PDE4 aktiviert, was anschließend den Abbau des zuvor gebildeten cAMP zur Folge hat. Steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dann, durch erneute Aktivierung des CCE wieder an, so beginnt der beschriebene Zyklus von neuem.

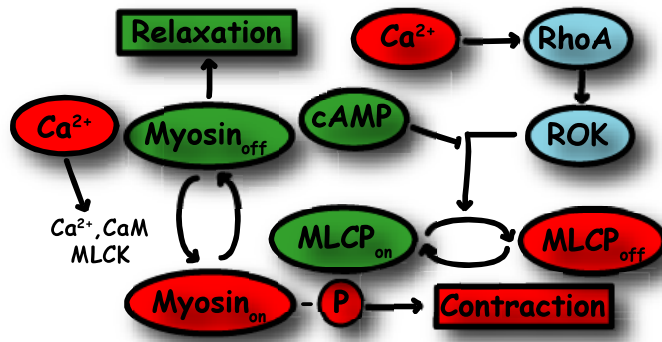
Für die glatte Muskelzelllinie A7r5 wurde gezeigt, dass der CCE nur transient die AC-Aktivität verstärken kann [50]. Vielmehr ist es in diesen Zellen so, dass  $\text{Ca}^{2+}$ , das über  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, zu einer langfristigen Hemmung der AC3 führt. Als möglicher Mechanismus für diese

Beobachtung wird eine Wechselwirkung der  $IP_3$ -Rezeptoren mit CaMKII vorgeschlagen [50]. Die dadurch entstehende Nähe zwischen Rezeptor und CaMKII bewirkt, dass das aus den intrazellulären Speichern freigesetzte  $Ca^{2+}$  CaMKII durch Phosphorylierung aktivieren kann. Aktivierte CaMKII ist anschließend in der Lage AC3 langfristig zu inhibieren.

Wie die oben angeführten Beispiele zeigen, besteht die Wirkung von  $Ca^{2+}$  auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration meist aus der Beeinflussung cAMP-synthetisierender und cAMP-abbauender Enzyme. So bewirkt der Anstieg von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  eine Aktivierung von AC1, 3 und 8 und eine Hemmung von AC5 und 6. Weiterhin kann  $Ca^{2+}$  den Abbau von cAMP durch Aktivierung der PDE1 verstärken.

Umgekehrt kann jedoch auch die Erhöhung der cAMP-Konzentration Einfluss auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration nehmen. In glatten Muskelzellen führt ein cAMP-Anstieg zu einer Reduktion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch Verminderung der Öffnungsfrequenz der  $IP_3$  Rezeptoren [14, 51]. Weiterhin kann durch cAMP aktivierte PKA L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle phosphorylieren [52]. Dies führt zu einer verminderten Kanalaktivität und somit ebenfalls zu einer Absenkung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration [11]. Zumindest in glatten Muskelzellen wird durch cAMP auch der SOC moduliert. Hier bewirkt wiederum die aktivierte PKA eine Inhibierung der Kanäle und somit eine Verringerung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms von außerhalb der Zelle [53].

Eine weitere Möglichkeit von cAMP, auf die Signalweitergabe durch  $Ca^{2+}$  Einfluss zu nehmen, ist die Inhibierung des Rho/ROK-Signalwegs (Abb. 2). Dadurch wird die Aktivität der MLCP in glatten Muskelzellen erhöht. Dies bewirkt eine verstärkte Bildung der inaktiven Form des Myosins und in Folge dessen eine Verringerung der Kontraktion der glatten Muskelzellen [12, 54]. cAMP antagonisiert in diesem Fall also die Wirkung von  $Ca^{2+}$ , ohne die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu verringern.



**Abb. 2:** Durch die cAMP-vermittelte Hemmung der Überführung der aktiven (MLCP<sub>on</sub>) in die inaktive Form der MLCP (MLCP<sub>off</sub>) wird aktives Myosin in stärkerem Maße dephosphoryliert. Dies führt zu einer Relaxation der Zelle, ohne, dass cAMP direkt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflusst.

(RhoA: Ras homolog gene family, member A, ROK: Rho A Kinase, MLCP: myosin light chain phosphatase, MLCK: myosin light chain kinase, CaM: Calmodulin)

Modifiziert nach Pfitzer *et al*, 2006, [12].

### 3.3. Detektion von cAMP-Änderungen und Ca<sup>2+</sup>-Signalen

#### 3.3.1. Fura-2-AM zur Detektion von Ca<sup>2+</sup> Signalen in intakten Zellen

Auch Änderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration können mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden beobachtet werden. Es gibt dafür zwei Arten von Fluoreszenzindikatoren. Zum einen gibt es nicht-ratiometrische Indikatoren, wie Fluo-3 oder Calcium-Green, deren Fluoreszenz sich durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup> deutlich verstärkt [55]. Zum anderen existieren ratiometrische Indikatoren wie Fura-2 oder Fura-3, deren Anregungsspektrum sich, nach Bindung von Ca<sup>2+</sup>, verschiebt, was dazu führt, dass sowohl die Fluoreszenz der Ca<sup>2+</sup>-freien als auch der Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Form durch Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen detektierbar ist. Die ratiometrische Darstellung von Ca<sup>2+</sup>-Änderungen ist weniger störanfällig, da diese nicht abhängig von der intrazellulären Konzentration des Indikators ist und auch nicht durch Autofluoreszenz von Zellbestandteilen gestört werden kann [55].

Fura-2 ist eine Polyamino-Carbonsäure mit fünf freien Carboxylgruppen, die, mit hoher Selektivität gegenüber anderen Metallkationen, Chelatkomplexe mit Ca<sup>2+</sup> bildet [56]. Durch die hohe Anzahl an konjugierten freien Elektronenpaaren fluoresziert sowohl das einzelne Molekül, als auch die Komplexverbindung mit Ca<sup>2+</sup>. Da Fura-2 nicht zellpermeabel ist, wurde das membrangängige Derivat Fura-2-AM entwickelt. Die Veresterung der Carboxylgruppen mit Essigsäure führt dazu, dass das Molekül lipidlöslich wird und durch die Zellmembran ins Zellinnere gelangen kann. Dort spalten unspezifische Esterasen die Acetoxymethylgruppen ab, die Verbindung

verliert ihre Lipidlöslichkeit wieder und kann nicht mehr aus der Zelle heraus gelangen.

Das Optimum des Anregungsspektrums für die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Form liegt bei 340 nm, das der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen bei 380 nm. Die emittierte Fluoreszenz beider Formen wird bei 510 nm detektiert.

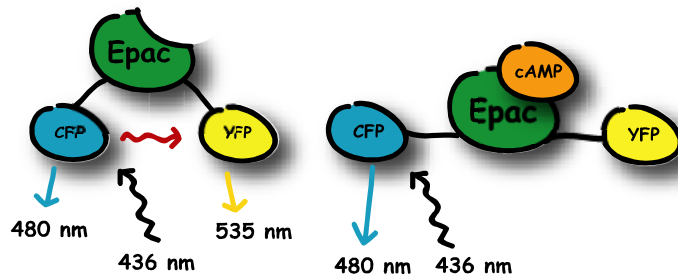
### **3.3.2. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zur Detektion von cAMP-Änderungen in intakten Zellen**

Um cAMP-Änderungen in intakten lebenden vaskulären glatten Muskelzellen zu beobachten, wurden Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierte Assays benutzt. Bei dieser Methode wird ein, erstmals durch Förster im Jahre 1948 beschriebenes physikalisches Phänomen ausgenutzt. Zwei Fluorophore, deren Fluoreszenzspektren einander überlappen und die sich in einem bestimmten Abstand (Försterradius,  $R_0$ ) zu einander befinden, können strahlungslos Energie aufeinander übertragen. Das mit der kürzeren Exzitationswellenlänge angeregte Fluorophor (Donor) kann so das mit der längeren Exzitationswellenlänge (Akzeptor) anregen. Die als Fluoreszenz sichtbare emittierte Energie des ersten nimmt dabei proportional zur Energiezunahme des anderen ab. Vergrößert sich der Abstand der beiden Fluorophore, so kann diese Energieübertragung nicht mehr oder nur noch in geringem Maße stattfinden; die Fluoreszenzintensität des Donors nimmt dann wieder zu, die des Akzeptors ab.

R. Tsien entdeckte 1995 [57, 58] die Möglichkeit genetisch kodierte fluoreszierende Proteine durch Fusion mit anderen Proteinen zu deren Detektion zu benutzen. Mit Hilfe dieser Methode kann die Lokalisation von Proteinen in Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden und es ist auch möglich, FRET zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen zu messen. Dies kann, wenn beide Fluorophore an ein Protein gebunden sind, dazu dienen, Konformationsänderungen eines Proteins zu beobachten. Wenn die Fluorophore an zwei verschiedene Proteine gebunden sind, können damit Bewegungen dieser Proteine zueinander oder voneinander weg dargestellt werden. Mit dieser Methode ist es, im Gegensatz zu herkömmlichen biochemischen Verfahren möglich, Abläufe in intakten lebenden Zellen in Echt-Zeit zu beobachten.



2004 entwickelte V.O. Nikolaev einen cAMP-Sensor, der aus einer der cAMP-bindenden Domänen des Epac-Proteins besteht, an die ein cyan fluoreszierendes Protein (CFP; Donor) und ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP; Akzeptor) gebunden ist [59]. Im cAMP freien Zustand sind die beiden Fluorophore in diesem Sensor so nahe bei einander, dass FRET stattfinden kann. Bindet cAMP an die



**Abb. 3:** Der FRET basierte cAMP-Sensor Epac1-camps besteht aus einer der cAMP-bindenden Domänen des Epac-Moleküls. Daran gebunden sind ein cyan fluoreszierendes Protein (CFP) und ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP). Sobald cAMP an den Sensor bindet entfernen sich beide Fluorophore so weit voneinander, dass kein FRET mehr möglich ist, so dass das FRET-Ratio bei einer Erhöhung der cAMP-Konzentration ansteigt.

Bindedomäne, so entfernen sich CFP und YFP durch eine Konformationsänderung so weit voneinander, dass FRET nur noch sehr eingeschränkt stattfinden kann (Abb. 3).

Ein Anstieg des cAMP resultiert also in einem Abfall der YFP-Fluoreszenz, einem Anstieg der CFP-Fluoreszenz und folglich

einem Abfall des FRET-Ratios ( $F_{YFP}/F_{CFP}$ ), das jeweils berechnet wird, um einzelne Messungen besser miteinander vergleichen zu können.

### 3.3.3. cAMP-Änderungen in lebenden Geweben und *in vivo*

Messungen von cAMP an intakten lebenden glatten Muskelzellen sind weitaus aufschlussreicher als herkömmliche Messungen an Zellmembranen oder lysierten Zellen, weil die zu beobachtenden Signalwege hier in Echtzeit beobachtet werden und in ihrer natürlichen Umgebung ablaufen können. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass der Stress einer transienten Transfektion der Zellen zu einem veränderten Verhalten führt. Auch die Kultivierung solcher primärer Zellen hat häufig eine Änderung der Expression verschiedener Enzyme oder eine Veränderung der Morphologie der Zelle zur Folge [60, 61]. Es wäre deshalb wichtig VSMCs beobachten zu können, die noch Bestandteil von intakten Geweben, beispielsweise ganzen Gefäßen, sind. Einen Weg hierzu wäre die Generierung von transgenen Mäusen, die glattnuskelpezifisch Epac1-camps exprimieren. In der Kombination mit Fluoreszenzanregung durch 2-Photonen-Laserscanning-Mikroskopie könnte es

möglich werden cAMP-Signale auch in tieferliegenden Schichten von Geweben zu detektieren.

Die Generierung glattmuskelspezifischer transgener Tiere kann durch die Voranschaltung eines glattmuskelspezifischen Promotors, wie SM22 $\alpha$ , erreicht werden, unter dessen Kontrolle der Sensor ausschließlich in differenzierten glatten Muskelzellen, vornehmlich arterieller Gefäße, exprimiert wird. Eine weitere Möglichkeit bietet das Cre/loxP-Rekombinationssystem. Damit kann ein „universelles“, den Sensor zunächst nicht exprimierendes transgenes Tier generiert werden, dass erst nach Verkreuzen mit einer Maus, die glattmuskelspezifisch Cre(=cyclization-recombination)-Rekombinase exprimiert, den Sensor ausschließlich in glatten Muskelzellen besitzt [62]. Bei einer solchen Rekombination wird DNA an bestimmten Stellen durch ein Enzym (Rekombinase) gespalten und anschließend neu verknüpft. Die hier verwendete Rekombinase heißt Cre-Rekombinase, weil sie, nach Schneiden an bestimmten Stellen im Chromosom, die ausgeschnittene Sequenz zu einem freien ringförmigen Produkt umwandelt, das anschließend in der Zelle degradiert wird. Die Sequenz, an der das Enzym spezifisch schneidet, wird als loxP (locus of X-over of P1) bezeichnet [63] und besteht aus acht, für die Orientierung essentiellen Basenpaaren und einer jeweils davor und dahinter angeordneten palindromischen Sequenz, die aus je 13 Basenpaaren besteht. Das „universelle“ Transgen besteht nun aus einem ubiquitär angeschalteten Promotor, der für den Sensor kodierende Sequenz mit Enhancer-Element. Beide Komponenten sind durch eine von 2 loxP-sites flankierte Sequenz voneinander getrennt. Wird nun eine Maus, die dieses Transgen besitzt mit einer Maus verkreuzt, die unter der Kontrolle eines glattmuskelspezifischen Promotors Cre-Rekombinase exprimiert, so schneidet die Cre-Rekombinase nur in den glatten Muskelzellen der Nachkommen dieser Tiere die loxP-flankierte Sequenz zwischen Promotor und der Sequenz für Epac1-camps aus. Der Promotor rückt so vor den Sensor und ermöglicht damit die Produktion des Proteins in der Zelle.

### 3.4. Zielsetzung

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit war es, cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in intakten vaskulären glatten Muskelzellen darzustellen. Da solche Signale sehr schnell und räumlich komplex ablaufen, sollte die Beobachtung dieser Signale fluoreszenzmikroskopisch in Echtzeit erfolgen, um möglichst genaue Rückschlüsse auf die in intakten Zellen ablaufenden Prozesse ziehen zu können. Wir verwendeten deshalb den FRET-basierten cAMP-Sensor Epac1-camps [59] und, um  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in lebenden Zellen beobachten zu können, den fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fura-2.

Von besonderem Interesse war dabei die Wirkung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen auf die cAMP-Konzentration in VSMCs, nachdem im Vorfeld bereits von verschiedenen Wirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen auf intrazelluläre cAMP-Spiegel in anderen Zelltypen berichtet wurde [47-50]. Weiterhin sollte auch der zugrunde liegende Signalweg untersucht und die an der Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die cAMP-Konzentrationen beteiligten Enzyme verifiziert werden.

Da primäre, in Kultur gehaltene Zellen dazu neigen, bestimmte natürliche Eigenschaften zu verlieren [60] und damit ihr Verhalten zu verändern, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit eine glattemuskelspezifische, für den Epac1-camps transgene Mauslinie zu generieren, mit deren Hilfe es möglich sein sollte, FRET-basiert cAMP-Änderungen in intakten lebenden Gewebsverbänden durchzuführen. Hier sollte eine noch natürlichere Umgebung der VSMCs zu noch genaueren Aussagen über Abläufe im lebendigen Organismus beitragen. Eine solche transgene Mauslinie könnte letztendlich auch die Möglichkeit bieten, *in vivo*-Messungen in narkotisierten Tieren vornehmen zu können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, immer pyrogenfreies, vollentsalztes Reinstwasser verwendet.

Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) mit Zusatz von 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 2 mM Glutamin und 10% FCS wird im Folgenden als DMEM+++ bezeichnet.

Antikörper:	
ERK	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
pERK	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
A23187	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
rylamid 30 %	Roth
Adenosindesaminase	Roche Pharma AG, Grenzach-Whylen, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
AMAXA Basic Nucleofector Kit for Primary Smooth Muscle Cells	Lonza, Basel, Schweiz
Ampicillin	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
APS	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BCA-Protein Assay Kit	Perbio Science
Bradford Reagenz (Coomassie-Brilliant-Blau G-250)	BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA
Bovines Serum Ablumin (BSA)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Benzamidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Calciumchlorid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Collagenase ( <i>clostridium histolyticum</i> , Typ H)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Complete-mini	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
DharmaFECT2 siRNA Transfection Reagent	Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
ECL-Plus Chemolumineszenz Detection Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fura 2-AM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gelex <sup>®</sup> -100 (Natriumsalz, 100-200 mesh, Biorad)	BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA
Glutamin	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Hyaluronidase	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
iQ™ SYBR Green Supermix	BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumglutamat	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
8-Methoxymethyl-IBMX (8-MM-IBMX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Papain (Papaya Latex)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
peqGold TriFast™	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pertussis Toxin (PTX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pfu Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Primer	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Quiagen Kits:	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Gel-Extraction Kit PCR-Purification Kit Plasmid Mini-Kit Plasmid Midi-Kit	
PMSF	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
RO 201724	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silencer <sup>®</sup> siRNA Labelling Kit – Cy <sup>™</sup> 3	Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA
siGENOME SMART pools: M-051739-00-0010 M-043463-00-0010	Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA
SuperScript <sup>™</sup> II reverse transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA
T4 Ligase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Taq Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton-X	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Uridindiphosphat (UDP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Zellen

#### 4.2.1.1. Präparation vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC)

##### Puffer/Lösungen:

<u>Ca<sup>2+</sup>-freies Medium:</u>	<u>Enzymlösung A:</u>	<u>Enzymlösung B:</u>
85 mM Natriumglutamat	0,7 mg/ml Papain	10 mg/ml Collagenase
60 mM Natriumchlorid	1 mg/ml DTT	10 mg/ml Hyaluronidase
10 mM HEPES	1 mg/ml BSA	1 mg/ml BSA
5,6 mM Kaliumchlorid	in Ca <sup>2+</sup> -freien Medium	in Ca <sup>2+</sup> -freiem Medium
1 mM Magnesiumchlorid		

Die Zellen wurden, mit kleinen Änderungen, wie von Kühbandner et al. [64] beschrieben aus Mäusen isoliert. Die Aorten wurden aus 5-20 Wochen alten Mäusen entnommen, in PBS Puffer gereinigt und von Bindegewebe befreit. 4-7 Aorten wurden dann zunächst bei 37°C für 45 Min in Enzymlösung A inkubiert, bevor sie bei 37 °C für 25 min in Enzymlösung B weiterverdaut wurden. Der Verdau wurde durch Überführen der Zellsuspension in 10 ml DMEM+++ gestoppt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 174 g und Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in DMEM+++ (Zusätze s.o.; 1 ml/Aorta) resuspendiert, auf Zellkulturschalen ausgesät und 1 Woche kultiviert. Mediumwechsel erfolgten nach 1 und 4 Tagen.

#### 4.2.1.2. Transfektion der glatten Muskelzellen

Um cAMP in VSMCs zu messen, wurden die Zellen durch Elektroporation mit dem „AMAXA Nucleofector“ und dem „AMAXA Basic Kit for Primary Smooth Muscle Cells“, nach Anweisung des Herstellers, transient mit einem für den Epac1-camps kodierenden Plasmid transfiziert. Für Versuche, mit AC4- oder AC6 Überexpression, wurden die, für die jeweiligen ACs kodierenden Plasmide zusätzlich zum Epac1-camps transfiziert. (Es wurden immer 5 µg DNA-Gesamtmenge verwendet.) Anschließend wurden die Zellen auf mit 0,1 % Gelatine beschichtete Glas-Coverslips ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein schnelleres Anheften der Zellen konnte durch suspendieren der Zellen in nur einem Tropfen DMEM+++ pro Coverslip erreicht werden. Nach einer Stunde wurde mit 2 ml serumfreiem DMEM aufgefüllt.



Diese Methode erzielte eine Transfektionseffizienz von 30-60 %, welche auf Basis der YFP-Fluoreszenz bestimmt wurde. Die Messungen begannen 24 h nach der Transfektion. 0,5 Units/ml Adenosindesaminase, die 30 Min vor Beginn der Experimente zu den Zellen gegeben wurden, verhinderten die Bildung von intrazellulärem cAMP durch Aktivierung von endogenen Adenosinrezeptoren.

Die Transfektion der siRNAs erfolgte mit Hilfe des „DharmaFECT2 siRNA Transfection Reagent“ nach den Anweisungen des Herstellers. Die siRNA Gesamtmenge betrug immer 120 pmol pro Reaktion (siRNA gegen AC5 und 6: je 60 pmol; scrambled siRNA: 120 pmol). Für die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die siRNA mit Hilfe des „Silencer<sup>®</sup> siRNA labelling Kit-Cy<sup>TM</sup>3“, nach den Anweisungen des Herstellers, markiert.

Die Zellen wurden entweder 24 h nach der Transfektion mit siRNA zusätzlich mit dem Epac1-camps transfiziert und weitere 24 h später für cAMP-Messungen verwendet oder 48 h nach siRNA-Transfektion für RT-PCR Experimente benutzt.

Für Experimente mit Zusatz des Ca<sup>2+</sup>-Puffers BAPTA-AM wurden die Zellen vor der Messung 30-90 min mit 10 µM BAPTA-AM vorinkubiert.

Experimente, für die die Zellen mit PTX behandelt wurden, erfolgten nach 16-18 h Inkubation mit 100 ng/mg PTX.

Wenn die Zellen für die Western-Blot-Analyse mit ATP stimuliert wurden, erfolgte dies für 3 min mit 100 µM ATP, nachdem die Zellen über Nacht in serumfreiem DMEM gehalten wurden.

#### **4.2.1.3. Transfektion der HEK-TsA201 Zellen**

1250 µl Serum-freies DMEM, 1 µg Epac1-camps-cDNA und 25 µg PEI wurden gemischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine 10 cm Zellkulturschale, bewachsen mit 70 % konfluenten Zellen in frischem DMEM+++, gegeben [65]. 16-18 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Messungen wurden 24 h später durchgeführt.

#### **4.2.1.4. FRET-Messungen *in-vitro***

*In-vitro* FRET-Messungen wurden ähnlich wie bei Nikolaev *et al.* [59] beschrieben durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurden HEK-TsA201 Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, von der Zellkulturschale gelöst und anschließend in 5 mM Tris-HCl mit 2 mM EDTA (pH = 7,3) resuspendiert. Die Zellen wurden durch

Behandlung mit einem Ultraturrax<sup>®</sup> für 40 s auf Eis aufgeschlossen und für 20 min bei 280.000 g zentrifugiert. Danach wurde das Fluoreszenzemissionsspektrum des Überstands mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS50B, PerkinElmer Life Sciences) vor und nach Zugabe aufsteigender Mengen von cAMP aufgenommen. Die Anregungswellenlänge des Spektrometers betrug 436 nm, die Emission wurde zwischen 460 und 550 nm aufgenommen.

#### 4.2.1.5. cAMP Messungen in intakten Zellen

##### **Puffer/Lösungen:**

##### FRET-Puffer (pH 7,3):

137 mM NaCl

5,4 mM KCl

2 mM CaCl<sub>2</sub>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM HEPES

Während der Messungen befanden sich die Zellen in FRET-Puffer, sie wurden zusätzlich, wenn nicht anders angezeigt, kontinuierlich mit dem gleichen Puffer superfundiert, um einen kontinuierlichen Lösungsaustausch zu gewährleisten. Agonisten wurden mit Hilfe einer **rapid solenoid valve superfusion device** (ALA Scientific Instruments, Inc., Westbury, NY, USA) appliziert, die einen Lösungswechsel innerhalb von 5-10 ms zulässt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv verwendet, wobei eine Polychrome IV Lampe (TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) als Lichtquelle diente. Die Beleuchtungszeit war  $\leq 100$  ms mit einer Frequenz von 1 Hz. Angeregt wurde die Fluoreszenz der Zellen mit einer Wellenlänge von  $436 \pm 10$  nm (beam splitter dichroic long pass 460 nm, DCLP460). Die Emissionen einzelner Zellen wurden bei  $535 \pm 15$  (F<sub>YFP</sub>) und  $480 \pm 20$  (F<sub>CFP</sub>; DCLP505) detektiert. Während aller Messungen wurde darauf geachtet, dass Fluoreszenzstärke und -verteilung in allen untersuchten Zellen gleich waren.

#### 4.2.1.6. Ca<sup>2+</sup>-Messungen

Auf Coverslips ausgesäte VSMCs wurden zweimal mit FRET-Puffer gewaschen, mit 2 µM Fura-2-AM in FRET-Puffer überschichtet und für 45 Min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit FRET-Puffer gewaschen und darin für 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde der Puffer entfernt und die Zellen wurden bis zur Messung (für 20-90 Min) bei 37 °C in serumfreiem Medium aufbewahrt. Für die Fura-2-Messungen wurden Bilder der Zellen mit einer CoolSNAP-HQ CCD-Kamera und einem inversen Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen. Die Bilderfassung erfolgte mit Metaflour-Software (Visitron Systems, Fuchheim, Deutschland). Zur Fluoreszenzanregung wurde ein Polychrome VI-Monochromator (TILL-Photonics) benutzt. Die Anregungswellenlängen wechselten zwischen 340 nm und 380 nm (beam splitter DLCP 400, Emissionsfilter 510 ± 20 nm, AHF Analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) und Belichtungszeit betrug 60 ms. Jede Sekunde wurde ein Bild aufgenommen.

#### 4.2.1.7. Simultanmessung von Ca<sup>2+</sup> und cAMP

VSMCs wurden, wie bereits beschrieben, mit dem Epac1-camps Plasmid transfiziert und 18-24 h später mit Fura-2 behandelt. Für die simultane Aufnahme von Fura-2-Fluoreszenz und den Epac1-camps-FRET-Änderungen wurde ein dichroider Spiegel (DCLP455) verwendet. Die Emission beider Fura-Anregungswellenlängen sowie die des CFP wurden bei 480 (± 15 nm) aufgenommen, die Emission des YFP wurde bei 535 nm (± 20) registriert. Die jeweiligen Anregungszeiten für beide Fura Wellenlängen betrugen 100 ms, die für CFP zwischen 100 und 200 ms. Der Wechsel zwischen den verschiedenen Wellenlängen dauerte weniger als 10 ms.

#### 4.2.1.8. RNA Isolierung und RT-PCR Experimente

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit „peqGold TriFast™“ nach den Anweisungen des Herstellers. Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde SuperScript™ II reverse Transkriptase verwendet. Umgeschrieben wurde jeweils 1 µg RNA in 20 µl Reaktionsansätzen.

Für die Detektion endogener PDE1, AC5, AC6 und die Expression von AC4 nach Transfektion diente die umgeschriebene cDNA als PCR-„Template“. Folgende Primer-Paare wurden verwendet: **PDE1a**: FW: 5'-TTT CTC TCC TGA CGG ACT

CAA-3'; REV: 5'-GCATAG CTC CCA TCA CAC AC-3'; **PDE1B**: FW: 5'-ACT TCA TTG TGG AGC CAA CC-3'; REV: 5'-CAC GGA AAC TGA CCA CAT CA-3'; **PDE1C**: FW: 5'-AAG CTG AAC AAG GCA CAA CC-3'; REV: 5'-CTC ATT TCC GGT GTT GGA GT-3'; **AC5**: FW: 5'-CCA AGG TGG CGC TGA AGG TGG-3'; REV1: 5'-TCC TGT TTC CCT TAC AGG GCA TTG-3'; REV2: 5'-AGT TCC ATG GAC ACC CCC AGG C-3'; **AC6**: FW: 5'-TGA TGG GCT GGA CTG CCC AGC-3'; REV: 5'-CCC TTT TGC TGT CAG CAA GAT CCG-3'; **AC4**: FW: 5'-GGA GCG AGA GGA GAC TGA GA-3'; REV: 5'-GAC GCG AAG AGG ACA CAA AC-3'.

Die quantitative Analyse der mRNA erfolgte per RT-qPCR mit Hilfe des iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix und des iCycler (BIO-RAD laboratories, Hercules, California, USA). Hierfür wurden folgende Primer Paare verwendet: **AC5**: FW: 5'-CAA GGC AGG CAA GAC CCA-3'; AD5 REV: 5'-CTC CAG CCA CTA CAG GTC CAA TG-3'; **AC6**: FW: 5'-ACA ACG AGG GTG GAG T-3'; REV: 5'-AGG TGC TAC CGT CTT-3'. Das Design dieser Primer erfolgte mit Hilfe des „ENSEMBL genome browser“. Die Daten wurden mit Hilfe der 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode analysiert [66]. Zur Kalibrierung wurde für jedes Experiment RT-qPCR einer RNA Verdünnungsreihe durchgeführt. GAPDH und passende cDNA-Primer dienten als Referenz. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 2 min 94 °C, 40 Zyklen mit je 15 s bei 94 °C, 30 s bei 57 °C und 40 s bei 72 °C. Nach jedem Experiment wurde die Reinheit der Produkte mit Hilfe von Dissoziationskurven bestimmt.

#### 4.2.1.9. Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität

Die Präparation der Membranen und die Aktivitätsbestimmung wurden, wie von Hoffmann *et al.* [67] beschrieben, mit den folgenden Änderungen durchgeführt: 100  $\mu$ M IBMX wurde gegen 500  $\mu$ M RO 201724 ausgetauscht. Zusätzlich wurden zu jedem Reaktionsansatz 0,24 units Adenosindesaminase und 60  $\mu$ M EGTA gegeben. Um den Einfluss von Ca<sup>2+</sup> auf die Cyclaseaktivität zu untersuchen, wurden 62,6  $\mu$ M (ergibt eine freie Ca<sup>2+</sup> Konzentration von 2  $\mu$ M) oder 65  $\mu$ M (ergibt eine freie Ca<sup>2+</sup> Konzentration von 5  $\mu$ M) Ca<sup>2+</sup> verwendet. Die Cyclaseaktivität wurde mit Isoproterenol stimuliert.

#### 4.2.1.10. Western-Blot-Analyse

##### 4.2.1.10.1. Probenvorbereitung:

###### Aus Gewebe (Aorta):

###### Puffer/Lösungen:

###### RIPA-Puffer:

1 ml 1 M Tris (pH 7,4)

6 ml 0,5 M NaCl

40 µl 0,5 M EDTA

200 µl 1 % TritonX-100

0,2 g Sodiumdeoxicholat

0,2 ml 10% SDS-Lösung

2 Tabletten Complete-mini

H<sub>2</sub>O ad 20 ml

Eine Aorta wurde in 100 µl RIPA-Puffer mit einem Ultraturrax für 15 s zerkleinert. Um die in dem Homogenisat vorhandene DNA zu entfernen, wurde anschließend 10 % des Gesamtvolumens Benzonase zugegeben und der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Schütteln inkubiert. Wenn nötig wurde die Probe zur weiteren Homogenisierung bei 4 °C ins Ultraschallbad gestellt, bevor sie für 10 min bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert wurde.

10 µl des Ansatzes wurden zur Proteinbestimmung verwendet, der Rest wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von Lämmli-puffer (25 % des Gesamtvolumens) und 10 min Erhitzen auf 60 °C direkt zum Auftragen auf das SDS-Gel verwendet.

###### Aus Zellen:

###### Puffer/Lösungen:

###### Lösung zum Ablösen der Zellen:

50 mM NaF

5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

0,1 mM Na<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>

1 mM PMSF

0,06 mg/ml Benzamidin

VSMCs wurden auf 6-well-Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag konfluent gewachsen waren. Anschließend wurden sie 16-24 h in serumfreiem DMEM gehalten. Mit 150 µl von oben beschriebenem Puffer wurden die Zellen von den Schalen abgelöst und die Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße überführt. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben zum Schluss für 10 min auf 60 °C erhitzt.

#### **4.2.1.10.2. Proteinbestimmung:**

##### **BCA-Methode:**

Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure erfolgt kolorimetrisch. Bei diesem Verfahren wird durch die Anwesenheit von Protein Kupfer (II) zu Kupfer (I) reduziert, das dann unter Komplexbildung mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure eine violette Verbindung bildet, deren Absorption bei 562 nm gemessen werden kann.

Die Proteinbestimmung mit dieser Methode wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte durch einen im Kit enthaltenen internen Standard.

##### **Nach Bradford:**

Diese Art der Proteinbestimmung wurde dann durchgeführt, wenn lediglich eine grobe Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Proben nötig war. Das vom Hersteller angebotene Konzentrat des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 wurde hierfür mit Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt. Zu 20 µl Probe wird 1 ml der verdünnten Bradfordlösung gegeben. Zur Kalibrierung der Messungen dienten reines, verdünntes Bradfordreagenz und solches mit dem Zusatz von 1 mg/ml BSA (=1 mg/ml Gesamtprotein). Da Coomassie-Brilliant-Blau G-250 proportional zum Proteingehalt der Lösung sein Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt kann der Proteingehalt der Proben durch Absorptionsmessungen bei 595 nm bestimmt werden.

### 4.2.1.10.3. SDS-Polyamid-Gelelektrophorese und Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen

#### **Puffer/Lösungen:**

##### 4 x lower-buffer:

4 g SDS  
500 ml 3 M Tris (pH 8,8)  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

##### 4 x upper-buffer:

2 g SDS  
250 ml 1 M Tris (pH 6,8)  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O

#### SDS-Gel:

##### 10 % Trenngel:

5,6 ml lower-buffer  
7,2 ml 30% A.a./Bis  
9,75 ml H<sub>2</sub>O  
22,5 µl TEMED  
300 µl APS

##### 5 % Sammelgel:

3 ml upper-buffer  
1,5 ml 30% A.a./Bis  
7,5 ml H<sub>2</sub>O  
24 µl TEMED  
240 µl APS

##### 10 x Laufpuffer:

30,3 g Tris  
144 g Glycin  
10 g SDS  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

##### 10 x Transferpuffer:

6,06 g Tris (25 mM)  
144 g Glycin  
10 g SDS  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

##### Waschpuffer:

50 mM Tris (pH 7,4)  
150 mM NaCl  
0,2 % BSA  
0,2 % NP-40

Zum Auftrennen der in den Proben enthaltenen Proteine wurde von allen Proben so viel aufgetragen, dass bei einer möglichst hohen Proteinmenge der Gesamtproteingehalt gleich war. Als Marker für das Proteingewicht wurde BenchMark™ Prestained Protein Ladder in eine separate Spur des Gels geladen.

Zur Konzentrierung der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Die Auftrennung der einzelnen Proteine im Trenngel erfolgte bei 150 V.

Um die der Größe nach getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran zu transferieren, wurde das Gel auf eine solche Membran gelegt. Durch Anlegen eines

elektrischen Feldes (100 V) für 60 min wandern die Proteine in Richtung der Anode vom Gel auf die Membran.

#### **4.2.1.10.4. Detektion der immobilisierten Proteine**

##### **Puffer/Lösungen:**

###### Blockpuffer:

5 % (w/v) Milchpulver

100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl pH 7,4

0,1 % (v/v) Tween 20

Die auf der Membran gebundenen Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran zunächst für 60 min mit Blockpuffer behandelt. Über Nacht folgte die Behandlung mit Erstantikörper, 1:1000 in Waschpuffer verdünnt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 20 min mit Waschpuffer gewaschen, bevor der an eine Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper (1:10000 Verdünnung) für 60 min auf die Membran gegeben wurde. Die Membran wurde schließlich noch dreimal für jeweils 20 min gewaschen, bevor die gesuchten Proteine mit Hilfe einer Chemolumineszenzreaktion und dem ECL-plus Chemolumineszenz-Detektionssystem auf einem Film sichtbar gemacht werden konnten.

#### **4.2.1.11. Aufbereitung der Daten und statistische Analyse**

##### **4.2.1.11.1. Photometrische FRET-Messungen (cAMP-Messungen):**

Die Fluoreszenz-Intensitäten der photometrischen Experimente wurden mit CLAMPEX 9.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) aufgenommen. Die statistische Analyse und die Kurvenanpassung wurden mit Hilfe von Prism 4.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) und CLAMPFIT 9.0 (Axon Instruments) durchgeführt [65]. Für die Korrektur von  $F_{YFP}$  wurden die Direktanregung und das Durchbluten wie beschrieben [19] berücksichtigt.



#### 4.2.1.11.2. Bildgebende Messungen (Ca<sup>2+</sup>-Messungen, Simultanmessungen):

Die Daten wurden mit MetaMorph 5.0 (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) aufgenommen und mit MetaMorph 5.0, Microsoft Excel 2008 für Mac und Prism 4.0 analysiert. Das Photobleichen während der Ca<sup>2+</sup>-Messungen wurde korrigiert. Bei den Simultanmessungen wurde die Hintergrundfluoreszenz von F<sub>YFP</sub> und F<sub>CFP</sub> abgezogen und der durch das Durchbluten des CFP und die direkte Anregung von YFP verursachte Fehler von F<sub>YFP</sub> korrigiert.

Alle Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von n Experimenten dargestellt.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit ungepaarten T-Tests durchgeführt.

Die p-Werte wurden dafür wie folgt definiert: \*: p ≤ 0,05; \*\*: p ≤ 0,01; \*\*\*: p ≤ 0,0001.

Waren multiple Testverfahren nötig, so wurden die Mittelwerte mit Hilfe von nach Bonferroni korrigierten, T-Tests verglichen. Die p-Werte hierfür sind definiert als: \*: p ≤ 0,025; \*\*: p ≤ 0,005 und \*\*\*: p ≤ 0,0005.

### 4.2.2. Transgene Mäuse

#### 4.2.2.1. DNA-Klonierung

##### Puffer/Lösungen:

<u>5xKCM-Puffer:</u>	<u>LB-Medium:</u>	<u>selektiver LB-Agar:</u>
150 mM CaCl <sub>2</sub>	1 % NaCl (m/V)	LB-Medium
250 mM MgCl <sub>2</sub>	1 % Pepton (m/V)	1,5 % Agar
500 mM KCl	0.5 % Hefeextrakt (m/V)	100 µg/ml Ampicillin
H <sub>2</sub> O ad 50 ml		

1. Strategie: An die Sequenz des SM445-Promoters wurden durch PCR die zusätzlichen Schnittstellen KpnI und NdeI angefügt. Als Template für diese PCR diente das Plasmid SM445pxpl. Anschließend sollte die Sequenz des Promotors über die gleichen Schnittstellen in den Vektor pBMHC-leer, der bereits den Epac1-camps sowie eine passende SV40pA-Sequenz enthält, kloniert werden.
2. Strategie: Die SV40pA-Sequenz aus pBMHC-leer wurde mit den Enzymen EcoRV und NotI ausgeschnitten und mit den gleichen Schnittstellen in den Vektor pcDNA3 kloniert. Zwischen die Schnittstellen HindIII und NdeI wurde

anschließend die Sequenz für den SM445-Promoter in das Zwischenprodukt kloniert. Zum Schluss wurde die Sequenz des Epac1-camps mit den Schnittstellen HindIII und EcoRV in dieses Plasmid inseriert. Zur Linearisierung des fertigen Plasmids wurden die Enzyme NdeI und NotI verwendet.

3. Strategie: Zunächst wurde mit Hilfe der PCR (FW: 5'-AAA GGA TCC AAG CTT AAA GAT ATC ACT CCT CAG GTG CAG GCT GCC TA-3'; REV: 5'-AAA GAG CTC GCA GGT CGA GGG ATC TCC AT-3') ein DNA-Fragment hergestellt, das wie folgt aufgebaut war: Vor einer beta-Globin-polyA Sequenz befinden sich die Schnittstellen BamHI, HindIII und EcoRV, dahinter die Schnittstelle SacI. Aus dem Plasmid pBSIISK(+)-CAG-CAT-EGFP wurden dann die Sequenzen für EGFP und das dort enthaltene beta-Globin-polyA durch die Enzyme BamHI und SacI ausgeschnitten. Das durch PCR hergestellte Fragment konnte so anschließend mit dem geschnittenen Vektor ligiert werden. In einem dritten Schritt war es dann möglich die Sequenz des Epac1-camps zwischen den Schnittstellen HindIII und EcoRV in das Plasmid einzufügen. Zur Linearisierung für die Generierung der transgenen Tiere wurde das Plasmid mit KpnI und SacI linearisiert.

Wenn nötig wurden passende Schnittstellen an die jeweiligen DNA-Fragmente mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) angefügt. Pro 100 µl Reaktionsansatz bestand dieser aus 10 µl 10x Pfu-Polymerase-Puffer, 2 µl dNTPs, 20 µM Vorwärts-Primer, 20 µM Rückwärts-Primer und 1 µl Pfu Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser aufgefüllt. Für kleinere Ansätze wurden die Mengen entsprechend angepasst. Die PCR-Produkte liefen über 1 %ige Agarosegele und wurden anschließend mit dem Quiagen Gel-Extraction Kit nach Anweisung des Herstellers gereinigt. Die Klonierung der Plasmide erfolgte, nach Schneiden der Edukte mit den entsprechenden Enzymen, durch Ligation mit T4 Ligase entweder für 20 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C.

Zur Vervielfältigung der klonierten Zwischenprodukte und der fertigen Plasmide wurden die durch die Ligation entstandenen Produkte mit Hilfe eines KCM-Puffers in kompetente *e.coli* Bakterien (XL-1 Blue) eingebracht. Dafür wurden 15-80 µl Ligationsansatz, 0-65 µl Wasser, 20 µl 5x KCM Puffer und 100 µl kompetente Zellen (Kompetenz  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Kolonien/µg DNA) für 20 min auf Eis, 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 37 °C für 50 min zusammen mit 1 ml LB Medium geschüttelt (Thermomixer 5436, Eppendorf). 100 µl des Reaktionsansatzes wurden zum Schluss auf 10 cm Zellkulturschalen mit selektivem LB-Agar ausplattiert. Nachdem die Bakterienkolonien über Nacht gewachsen waren, konnten sie am nächsten Tag auf das Vorhandensein des klonierten Plasmids getestet werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Quiagen Plasmid Mini-Kits nach Anweisung des Herstellers und anschließender Kontrolle spezifischer Fragmente nach Schneiden mit den entsprechenden Enzymen. Kolonien, die das richtig klonierte Plasmid enthielten, wurden über Nacht in 200 ml LB-Medium weitergezüchtet und die enthaltenen Plasmide mit dem Quiagen Plasmid Midi-Kit nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt.

#### **4.2.2.2. Aufreinigung der DNA für Pronukleus-Injektion**

Nach Schneiden der Plasmide mit den, zur Linearisierung jeweils angegebenen Enzymen wurden die gesuchten Produkte auf 1 %igen Agarosegelen größenfraktioniert. Die jeweils benötigte Bande wurde ausgeschnitten und nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des Quiagen Gel-Extraction Kits gereinigt. Die gereinigten Produkte wurden dann einmal über Nacht und anschließend zweimal durch Dialyse in einer Dialysekassette gereinigt und dann sterilfiltriert. Die Konzentration wurde durch Gelelektrophorese bestimmt. Das Produkt wurde dafür zusammen mit einem Standard bekannter Konzentration in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen. Die Konzentration der linearisierten und gereinigten DNA-Fragmente wurde für die anschließende Pronukleusinjektion auf 2 ng/µl eingestellt [68] .

#### **4.2.2.3. Genotypisierung**

##### **Puffer/Lösungen:**

##### Lysis-Puffer:

5,0 ml 10 %ige Natriumlaurylsarcosinlösung

2,0 ml 5 M NaCl

5,0 g Gelex<sup>®</sup>-100

ad 100 ml Wasser

Zur Genotypisierung der transgenen Tiere wurde 3-4 Wochen alten Mäusen ein kleiner Teil der Schwanzspitze entfernt. Diese Gewebeproben wurden anschließend über Nacht, bei 55 °C mit 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) in 200 µl Lysis-Puffer, verdaut. Nach kurzer Zentrifugation (13 000 rpm) wurde durch 10-minütiges Erhitzen der Proben auf 95 °C der Verdauungsvorgang gestoppt. Die Proben wurden ein zweites Mal zentrifugiert (13 000 rpm). 2 µl einer 1 : 2,5 Verdünnung der Proben dienten dann als Vorlage für eine PCR mit folgendem **Reaktionsansatz**: 0,1 µl pro Primer (20 pM), 2 µl 10xPuffer, 0,4 µl dNTPs, 0,6 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl Taq-Polymerase und 16 µl H<sub>2</sub>O. Die PCR lief mit folgenden **Bedingungen**: 5 min 94 °C, dann 35 Zyklen mit 30 s bei 94 °C, 30 s bei 59 °C, 1 min 15 s bei 72 °C. Zum Schluss 7 min lang bei 72 °C. Jeder Ansatz enthielt 2 verschiedene Primer Paare. Eines zur Amplifikation eines Teils des Transgens (FW: 5'-AAG GGT TCC GGA TVV AAG C-3'; REV: AAA GAA TCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GA) und eines zur Bestätigung des erfolgten Reaktionsablaufs (sp-Primer).

Bei Proben von Tieren, die das Transgen exprimieren, wird bei späterer Auftrennung der PCR-Produkte auf 1 %igen Agarosegelen unter UV-Licht neben der Kontrollbande eine spezifische Bande sichtbar.

#### **4.2.2.4. Überprüfung der Fluoreszenzintensität von VSMCs aus transgenen Mäusen**

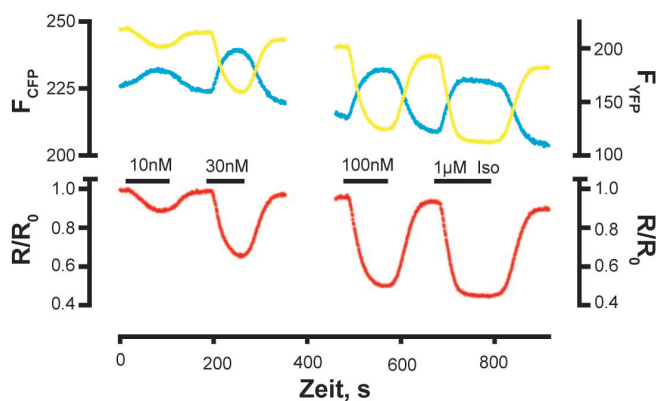
Da das Vorhandensein des Transgens in einem Tier noch nicht bedeutet, dass das Protein in so großem Maße gebildet wird, dass die Fluoreszenz im Gewebe sichtbar wird, wurden alle für das Transgen positiv getesteten Mauslinien auf die Stärke der Fluoreszenz in glatten Muskelzellen (VSMCs) getestet. Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, präpariert und eine Woche kultiviert. Bei Tieren, die das Epac1-camps-Protein unter Kontrolle des glattemuskelspezifischen Promotors SM445 exprimieren, konnte die Stärke der Fluoreszenz durch Fluoreszenzmikroskopie direkt untersucht werden. Handelte es sich um Tiere, deren gewebsspezifische Expression mit Hilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems erfolgen sollte, mussten die Zellen zunächst per Elektroporation mit Cre-Rekombinase (5 µg DNA, Protokoll wie oben beschrieben) transfiziert werden, um einen Tag später auf potentiell sichtbare Fluoreszenz getestet werden zu können.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Beobachtung von $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Signalen in intakten VSMCs in Echtzeit

$\text{Ca}^{2+}$  und cAMP sind wichtige Komponenten der Steuerung des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Als ein Teil dieser Arbeit sollten Konzentrationsänderungen dieser beiden Botenstoffe in glatten Muskelzellen beobachtet werden. Außerdem war die Wirkung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen auf die cAMP-Konzentrationen in VSMCs einschließlich der zugrunde liegenden Signalwege von Interesse.

Der FRET-basierte cAMP-Sensor Epac1-camps [59] bietet die Möglichkeit cAMP-



**Abb.4:** cAMP-Messungen wurden in mit dem Epac1-camps transfizierten VSMCs durchgeführt. Die Fluoreszenz einzelner intakter Zellen wurde bei  $436 \pm 10$  nm angeregt und die Emissionen von YFP und CFP wurden mit Photodioden detektiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt in blau die CFP-Emissionen und in gelb die für das Durchbluten korrigierte YFP-Emissionen. Im unteren Teil der Abbildung sind in rot die jeweils zugehörigen FRET-Ratios, berechnet als  $F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}}$  und normalisiert auf das Anfangsratio  $R_0$ , zu sehen.

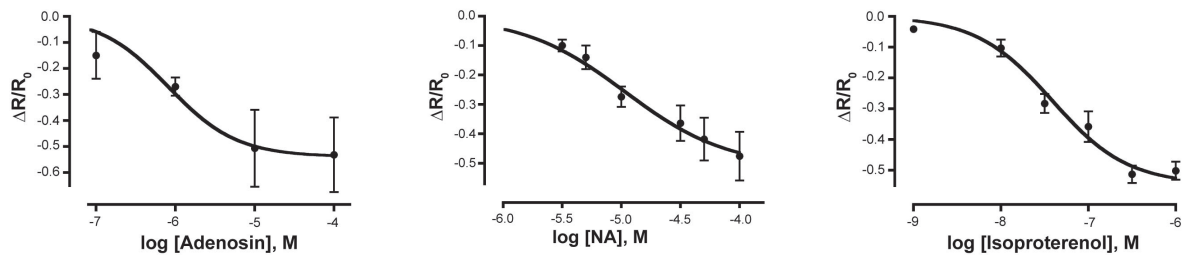
Änderungen in lebenden, intakten vaskulären Zellen in Echtzeit zu beobachten. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt ein Anstieg von cAMP in der Zelle zu einer vermehrten Bindung von cAMP an den Sensor, was zu einem Rückgang des FRET-Ratios führt. Die Änderungen des FRET-Ratios wurden proportional zu steigenden Agonist-

Konzentrationen größer. Dies bedeutet, dass die beobachteten Signale des Sensors deutlich dosisabhängig waren (Abb.4)

#### 5.1.1. Endogen exprimierte $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren auf VSMCs

Die Kultivierung primärer Zellen kann dazu führen, dass sich die Expression endogen exprimierter Rezeptoren verändert [60]. Deshalb sollte zunächst herausgefunden werden, welche  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren auf den isolierten und anschließend

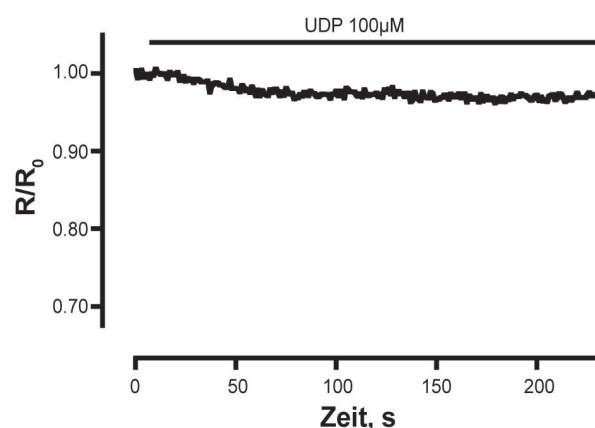
kultivierten VSMCs vorhanden waren. Dafür wurden die Zellen durch Elektroporation transient mit Epac1-camps transfiziert. Durch die Aktivierung der Zellen mit verschiedenen, an  $G_s$  koppelnde Agonisten und dem damit verbundenen Anstieg der cAMP-Konzentration in den Zellen, konnten konzentrationsabhängige Änderungen des Epac1-camps FRET mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen werden (Abb.5).



**Abb.5:** Gezeigt werden Konzentrations-Wirkungskurven für die Effekte, die durch verschiedene Agonisten (links: Adenosin, Mitte: Noradrenalin, rechts: Isoproterenol) in primären VSMCs hervorgerufen wurden. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für Adenosin ergab sich ein  $\log EC_{50}$  von  $-6,1 \pm 0,49$  ( $n=6$ ), für Noradrenalin von  $-5,0 \pm 0,19$  ( $n=6$ ) und für Isoproterenol von  $-7,4 \pm 0,1$  ( $n=29$ ).

### 5.1.2. Stimulation von $P2Y_6$ Rezeptoren führt nicht zu einer Änderung der basalen cAMP-Konzentrationen

Anstiege des intrazellulären  $Ca^{2+}$  können sowohl die Produktion als auch den Abbau von cAMP in VSMCs beeinflussen [30]. Der purinerge Agonist UDP ist bekannt dafür,



**Abb.6:** Gezeigt wird ein repräsentatives Beispiel der Messung einer VSMC, die für mehrere Minuten mit UDP behandelt wurde (siehe Balken). UDP alleine führte in der Zelle nur zu einer sehr geringen Änderung des FRET-Ratios.

VSMCs zu untersuchen.

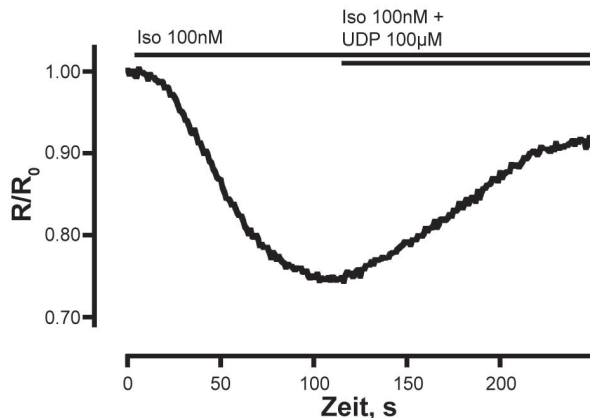
Die Behandlung von mit Epac1-camps transfizierten Zellen mit  $100 \mu\text{M}$  UDP führte zu keiner detektierbaren Veränderung der FRET-Ratios in VSMCs (Abb.6), was

primär den  $G_q$ -gekoppelten  $P2Y_6$  Rezeptor zu aktivieren [69, 70]. Wir gingen deshalb davon aus, dass durch die Behandlung der Zellen mit UDP keine anderen Signalwege, als die  $G_q$ -vermittelte intrazelluläre Freisetzung von  $Ca^{2+}$  ausgelöst wurden und verwendeten UDP um den Einfluss von  $Ca^{2+}$  auf die cAMP-Konzentrationen in

bedeutet, dass die Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  keinen Einfluss auf die basalen cAMP-Konzentrationen hatte, oder dieser so gering war, dass er mit Hilfe des Epac1-camps nicht detektierbar war.

### 5.1.3. Stimulation von $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs

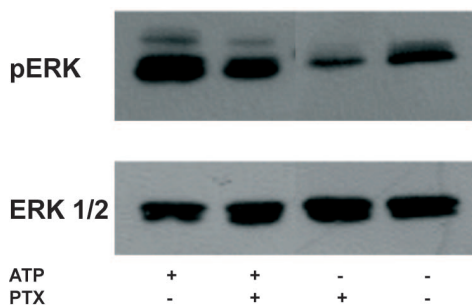
Da die Aktivierung von  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren keinen messbaren Einfluss auf die basale



**Abb.7:** Wurden VSMCs zunächst mit Isoproterenol vorstimuliert und anschließend zusätzlich mit UDP behandelt, so konnte durch UDP ein deutlicher Anstieg der FRET-Ratios, gleichbedeutend einer Abnahme der cAMP-Konzentration beobachtet werden.

der  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren ein deutlicher Anstieg des FRET-Ratios und somit ein Rückgang der cAMP-Konzentration in VSMCs beobachtet werden (Abb.7).

Trotz der für UDP bekannten Selektivität für  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren sollte eine eventuell doch mögliche Beteiligung von  $\text{G}_i$ -gekoppelten Rezeptoren an dem beobachteten



**Abb.8:** Die Phosphorylierung von ERK1/2 wird sowohl durch  $\text{G}_q$  als auch  $\text{G}_i$  stimuliert. Da die  $\text{G}_i$ -abhängige Komponente durch PTX inhibiert werden kann, verringert sich die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Inkubation der Zellen mit PTX sowohl nach Stimulation mit ATP als auch unter basalen Bedingungen.

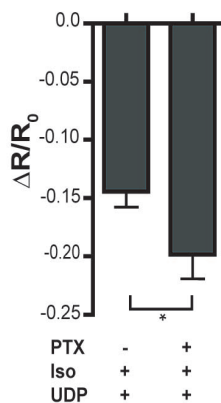
cAMP-Konzentration in den Zellen hatte, wurde die cAMP-Synthese in mit dem Sensor transfizierten VSMCs zunächst durch Behandlung mit Isoproterenol vorstimuliert. Sobald das FRET-Signal einen konstanten Wert erreicht hatte, wurde zusätzlich UDP zu den Zellen gegeben. In diesem Fall konnte durch die Aktivierung

Effekt ausgeschlossen werden. Dafür wurden die Zellen über Nacht mit 100 ng/ml Pertussis-Toxin (PTX) inkubiert. Um die Funktionalität des verwendeten PTX zu überprüfen, wurde der Anstieg der ERK-Phosphorylierung nach Stimulation der Zellen mit ATP mit und ohne vorherige Inkubation mit PTX überprüft. Die Detektion von ERK und phosphoryliertem ERK erfolgte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse

[71, 72]. Abb.8 zeigt als ein repräsentatives Beispiel, dass die ERK-Phosphorylierung

in den mit PTX behandelten Zellen, im Vergleich zu den nicht behandelten, sichtbar kleiner ist. So konnte also nachgewiesen werden, dass das verwendete PTX funktional ist.

Um die eventuelle  $G_i$ -Beteiligung des Effekts zu überprüfen, wurden die Zellen, wie oben beschrieben mit Isoproterenol vorstimuliert und anschließend zusätzlich mit

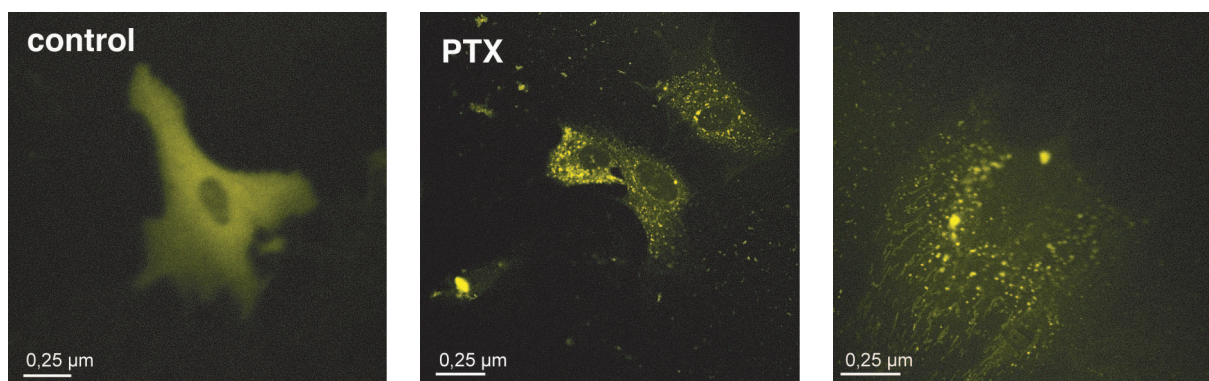


**Abb.9:** VSMCs, die über Nacht mit PTX behandelt wurden, zeigten nach Vorstimulation mit Isoproterenol und anschließender zusätzlicher UDP-Gabe einen signifikant größeren Rückgang ( $*p < 0.1$ ,  $n=22$ ) des FRET-Ratios ( $\Delta R/R_0$ ) als die nicht mit PTX behandelten Zellen ( $n=29$ ).

UDP behandelt. Verglichen wurde dann das Ausmaß des Anstiegs des FRET-Ratios in mit PTX behandelten Zellen verglichen mit unbehandelten. Trotz der bekannten Selektivität von UDP für  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren [69, 70] war der durch UDP hervorgerufene Effekt in den mit PTX behandelten Zellen signifikant kleiner (Abb.9).

Da die mit PTX behandelten Zellen aber, wie Abb.10 zeigt, deutliche morphologische Veränderungen und auch eine deutliche veränderte Verteilung des Sensors in den Zellen zeigten, sind die Daten dieser Zellen nicht zuverlässig mit denen vergleichbar, die aus unbehandelten Zellen gewonnen wurden. Der signifikante Unterschied bei

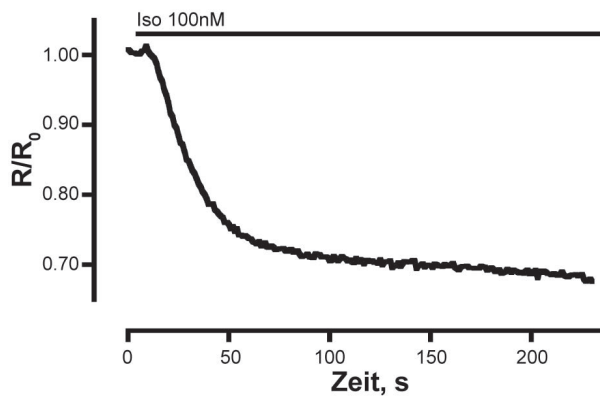
dem durch UDP verursachten Effekt ist also möglicherweise alleine auf den Zustand der Zellen und nicht auf eine  $G_i$ -Beteiligung zurückzuführen.



**Abb.10:** Im linken Bild ist die YFP-Fluoreszenz einer mit dem Epac1-camps transfizierten VSMC zu sehen. Der Sensor ist hier gleichmäßig verteilt und die Zelle ist von eher langgestreckter Gestalt. Das mittlere und das rechte Bild zeigen die YFP-Fluoreszenz von VSMCs, die ebenfalls mit dem Epac1-camps transfiziert wurden, aber zusätzlich über Nacht mit PTX behandelt wurden. Diese Zellen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch durch die ungleichmäßige Verteilung des Sensors in der Zelle deutlich von den Kontrollzellen.



Um einen eventuell durch Isoproterenol hervorgerufenen Desensibilisierungseffekt auszuschließen, wurden im Vergleich Zellen für mehrere Minuten nur mit



**Abb.11:** Die Behandlung von VSMCs mit Isoproterenol führt zu einem Abfall des FRET-Ratios ( $R/R_0$ ), das nach Erreichen des Gleichgewichtszustands über mehrere Minuten konstant blieb. (Repräsentatives Beispiel für  $n=9$ ).

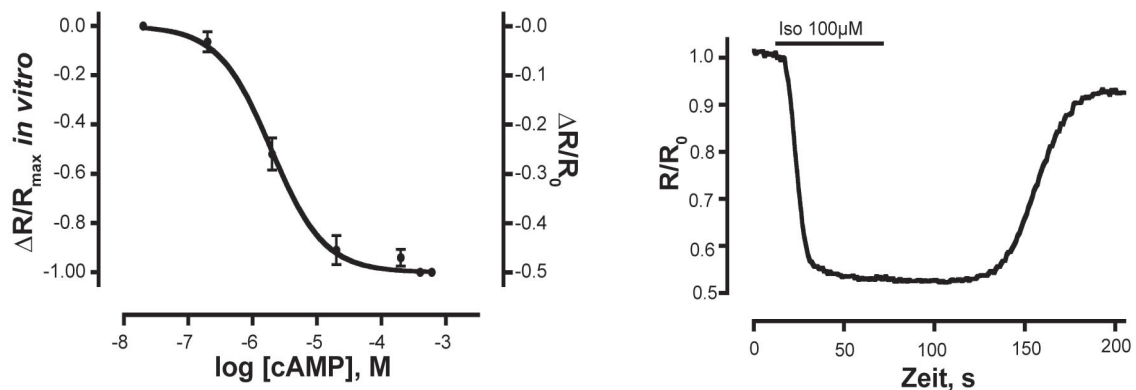
Isoproterenol behandelt. In diesen Fällen blieb das resultierende FRET-Ratio über mehrere Minuten konstant und zeigte im Gegensatz zu den Zellen, die zusätzlich mit UDP stimuliert wurden, keine Änderung (Abb.11). Der Rückgang der cAMP-Konzentration in vorstimulierten VSMCs nach zusätzlicher Behandlung mit UDP

war also auf einen UDP-spezifischen Effekt zurückzuführen.

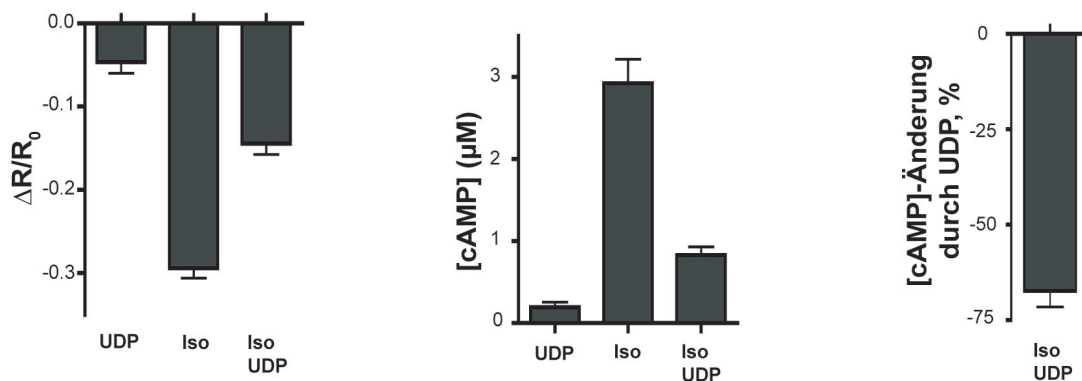
#### 5.1.4. Berechnung absoluter cAMP-Konzentrationen mit Hilfe einer *in vitro*-Kalibrierung

Die von der Agonistenkonzentration abhängige Änderung des Epac1-camps-FRET [59] ist prinzipiell dafür geeignet absolute cAMP-Änderungen in intakten VSMCs zu messen. Eine Kalibrierung des Sensors mit genauen cAMP-Konzentrationen ist in lebenden Zellen nicht möglich. Deshalb wurde die Kalibrierung des Systems *in vitro* mit Lysaten von mit Epac1-camps transient transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Die Zellysate wurden dafür mit ansteigenden Konzentrationen von cAMP versetzt. Die Änderung der FRET-Ratien wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer bestimmt (Abb.12 links, linke Y-Achse). Für die Berechnung absoluter cAMP-Konzentrationen mit Hilfe der *in vitro* erstellten Kalibrierung waren zwei Annahmen nötig. Erstens ist die cAMP-Konzentration in unstimulierten VSMCs so gering, dass sie unter der Detektionsgrenze des Sensors liegt und damit unter 100 nM cAMP. Zweitens ist die Stimulation (hier mit Isoproterenol) einer intakten Zelle maximal und sättigend, wenn sie eine Änderung des FRET-Ratios von  $50 \pm 2\%$  ( $n=26$ ) hervorruft (Abb.12 links, rechte Y-Achse und 12 rechts). Das bedeutet, eine 50-prozentige Änderung des Epac1-camps-FRET-Ratios *in vivo* entspricht der maximalen Änderung der FRET-Ratios *in vitro*. Mit Hilfe dieser Kalibrierung war es nun möglich absolute cAMP-

Konzentrationen und Änderungen von cAMP-Konzentrationen in intakten Zellen zu berechnen (Abb.13).



**Abb.12:** (links) Für die *in-vitro* Kalibrierung des Epac1-camps wurden HEK-TsA201-Zellysate mit ansteigenden Konzentrationen von cAMP inkubiert und die FRET-Ratios wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Aufgetragen ist die Änderung des FRET-Ratios ( $\Delta R/R_0$ ) relativ zu der maximalen FRET-Ratio-Änderung verursacht durch Zugabe von 600  $\mu\text{M}$  cAMP (als 1,00 gesetzt) gegen die cAMP-Konzentration. Um die gemessene Konzentrations-Wirkungskurve auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen der mit dem Epac1-camps transfizierten VSMCs, anzupassen wurde die y-Achse auf die mittlere, durch Behandlung mit sättigenden Konzentrationen von Isoproterenol (100  $\mu\text{M}$ ) hervorgerufene Änderung des FRET-Ratios skaliert (rechts).



**Abb.13:** Das linke Diagramm zeigt die durch den jeweiligen Agonisten verursachte Änderung des FRET-ratios, berechnet als  $\Delta R/R_0$ . Die Gabe von UDP alleine hatte kaum Einfluss auf das FRET-Ratio ( $n=9$ ), während die Behandlung der Zellen mit submaximalen Konzentrationen von Isoproterenol zu einem robusten Abfall des FRET-Ratios führte ( $n=29$ ). Die zusätzliche purinerge Stimulation mit UDP rief einen signifikanten Rückgang des FRET-Ratios in mit Isoproterenol vorstimulierten Zellen hervor ( $n=29$ ).

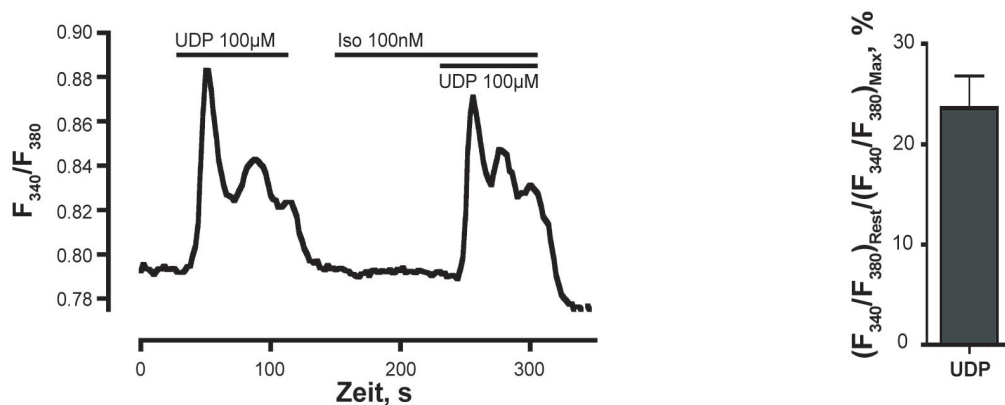
In der Mitte sind die, jeweils zu den FRET-Ratio-Änderungen gehörigen, absoluten cAMP-Konzentrationen gezeigt, die mit Hilfe der in Abb.4 gezeigten Kalibrierungskurve berechnet wurden.

Im linken Diagramm sind die normalisierten Änderungen der cAMP-Konzentration zu sehen, die durch die zusätzliche Behandlung der VSMCs mit UDP nach Vorstimulation mit Isoproterenol verursacht wurden ( $n=29$ ).

## 5.1.5. Der Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

### 5.1.5.1. Die Aktivierung von $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

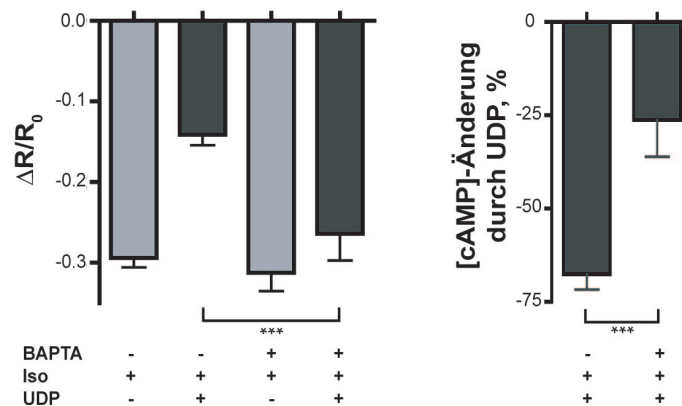
Nachdem die Aktivierung von  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs zu einem deutlichen Anstieg des FRET-Signals und damit verbunden zu einem Rückgang der intrazellulären cAMP-Konzentration führte, sollte als nächstes geklärt werden, ob wirklich der durch UDP hervorgerufene intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg für diesen Effekt verantwortlich ist. Um zunächst sicherzustellen, ob durch UDP tatsächlich ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervorgerufen werden kann, wurden VSMCs mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fura-2 beladen. Die durch UDP-Gabe verursachte Änderung der Fluoreszenzintensität der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen und der freien Form von Fura-2 wurden aufgenommen. Die Fluoreszenz der Zellen wurde dafür abwechselnd mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt. Zur besseren Darstellung wurden die Änderungen als  $F_{340}/F_{380}$  (=Fura-2-Ratio) berechnet. Wie in Abbildung 14 gezeigt, rief die Stimulation der VSMC mit UDP sofort einen deutlichen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  hervor, der anschließend schnell wieder abfiel.



**Abb.14:** (links) VSMCs wurden mit Fura-2-AM markiert. Die hier bildgebende Erfassung der Fluoreszenzänderungen wurde durch abwechselnde Anregung des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen (340 nm) und des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Fura-2 (380 nm) erreicht. Die zugehörigen Emissionen wurden aufgenommen und für Photobleichen korrigiert, bevor das Fura-2-Ratio ( $F_{340}/F_{380}$ ) daraus berechnet wurde. VSMCs wurden, wie angegeben, mit 100  $\mu\text{M}$  UDP oder 100  $\mu\text{M}$  UDP und 100 nM Isoproterenol superfundiert. In beiden Fällen zeigte sich, hervorgerufen durch die purinerge Stimulation, ein schneller Anstieg des Fura-2-Ratios, der unabhängig von der adrenergen Stimulation war. (rechts) Während der UDP-Stimulation fällt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht wieder zurück bis zum Ausgangswert. Die Quantifizierung dieses Effekts zeigt, dass das Fura-2-Ratio nur bis auf  $24 \pm 3\%$  ( $n=5$ ) des Ausgangsratios zurück geht.

Zu beachten ist, dass in Anwesenheit von UDP die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht wieder bis auf den Ausgangswert absinkt, sondern bei durchschnittlich  $24 \pm 3\%$  des Ausgangswertes bleibt (Abb.14).

Nachdem nachgewiesen wurde, dass UDP eine Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt, sollte untersucht werden, ob der durch UDP verursachte Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs wirklich  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig ist. Dafür wurden VSMCs mit dem Epac1-camps transfiziert und zusätzlich mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM behandelt, um intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zu komplexieren. Im Vergleich zu VSMCs, die nicht mit BAPTA-AM behandelt wurden, zeigten diese Zellen einen signifikanten Rückgang des beschriebenen Effekts (Abb.15).

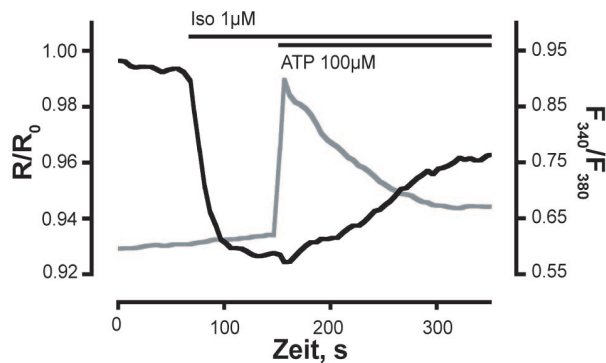


**Abb.15:** Die Komplexbildung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM verringerte signifikant den UDP-induzierten Anstieg des Epac1-camps-FRET-Ratios in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs (BAPTA: n=12, control: n=32, \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) (links).

Genauso wurden die zugehörigen Änderungen der cAMP-Konzentrationen signifikant durch die Behandlung der Zellen mit BAPTA-AM reduziert (BAPTA: n=12, control: n=31, \*\*\*  $p < 0.0001$ ) (rechts).

Dies deutet darauf hin, dass der durch UDP verursachte Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten Zellen durch den Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgerufen wird.

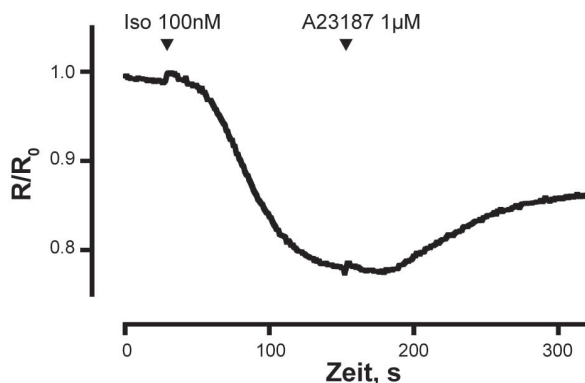
### 5.1.5.2. Der Rückgang der cAMP-Konzentration in vorstimulierten VSMCs wird auch durch andere $\text{Ca}^{2+}$ -erhöhende Substanzen verursacht



**Abb.16:** Für simultane Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  (grau)- und cAMP (schwarz)-Änderungen in VSMCs wurden diese zunächst mit dem Epac1-camps transfiziert und anschließend mit Fura-2 markiert. Die für 3 Experimente repräsentative Beispielabbildung zeigt, dass auch ein anderer purinerges Agonist ( $100 \mu\text{M}$  ATP) nach submaximaler Vorstimulation mit Isoproterenol zunächst einen schnellen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt, dem ein deutlicher Rückgang des FRET-Ratios und somit der cAMP-Konzentration folgt.

2-Ratio zeigt, führt die Behandlung von vorstimulierten VSMCs mit dem, auch  $G_q$ -aktivierenden, purinerges Agonisten ATP zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , gefolgt von einem Anstieg des FRET-Ratios, gleichbedeutend mit einem Rückgang der cAMP-Konzentration (Abb.16).

Die Wiederholung des Experiments mit Isoproterenol und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 anstelle von UDP zeigte ebenso einen vergleichbaren Verlauf des FRET-



Zur weiteren Bestätigung der Hypothese, dass nach zusätzlicher Stimulation von mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs mit UDP  $\text{Ca}^{2+}$  für den Rückgang der cAMP-Konzentration verantwortlich ist, wurde das Experiment mit dem purinerges Agonist ATP oder dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 anstelle von UDP wiederholt.

Wie die mit Isoproterenol und ATP durchgeführte Simultanmessung von FRET- und Fura-

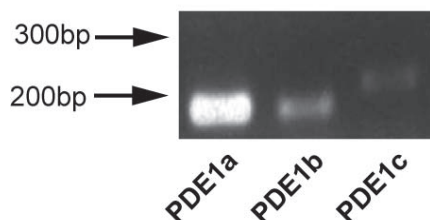
**Abb.17:** Mit dem Epac1-camps transfizierte VSMCs wurden mit Isoproterenol vorstimuliert und anschließend zusätzlich, an Stelle des purinerges Agonisten UDP, mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 ( $1 \mu\text{M}$ ) behandelt. Wegen der lipophilen Eigenschaften von A23187 wurden beide Substanzen durch manuelles Pipettieren zu den Zellen gegeben, was in einer verzögerten Antwort resultierte. Trotzdem konnte nach Zugabe von A23187, ein in der Kinetik mit den durch UDP hervorgerufenen Änderungen vergleichbarer Anstieg des FRET-Ratios beobachtet werden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel für mindestens 3 Experimente.

Ratios. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor führte zu einem deutlichen Anstieg des FRET-Ratios und somit zu einem deutlichen Rückgang der cAMP-Konzentration (Abb.17).

Es konnte also durch die Wiederholung des Experiments mit verschiedenen anderen, das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -erhöhenden Substanzen das gleiche Ergebnis wie bei Verwendung von UDP beobachtet werden. Dies deutet, zusammen mit den Befunden aus den Experimenten, die unter Zusatz von BAPTA durchgeführt wurden, auf eine klare  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des beschriebenen Effekts hin.

### 5.1.5.3. Die $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Änderung der cAMP-Konzentration ist unabhängig von PDE1

Nachdem nachgewiesen wurde, dass der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  den durch UDP hervorgerufenen Effekt in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs verursacht, sollte nun der Frage nachgegangen werden, welches Enzym diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Effekt vermittelt. Wie in der Einleitung beschrieben, kann  $\text{Ca}^{2+}$  sowohl die Synthese - durch Beeinflussung von ACs - als auch den Abbau durch Wirkung auf PDEs modulieren [30].

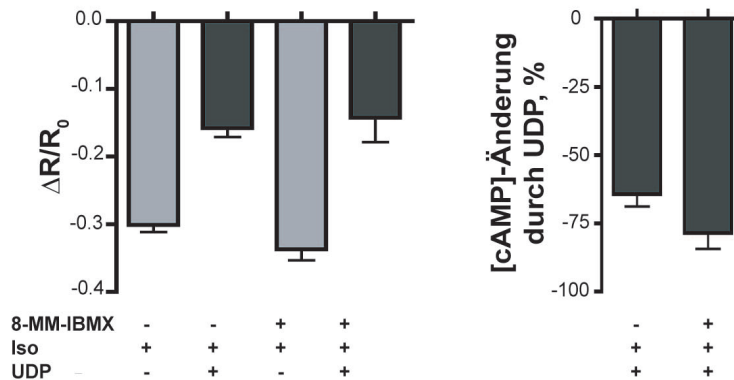


**Abb.18:** Die endogene Expression von PDE1a, b und c wurde mit, aus VSMCs isolierter, RNA durch RT-PCR bestimmt.

Auf der Seite der Phosphodiesterasen kann der beobachtete Effekt potentiell nur durch PDE1 verursacht werden, da diese die einzige bekannte  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiverbare PDE ist. Die Expression der drei PDE1-Isoformen in VSMCs wurde mit Hilfe von RT-PCR überprüft, wobei sich herausstellte, dass

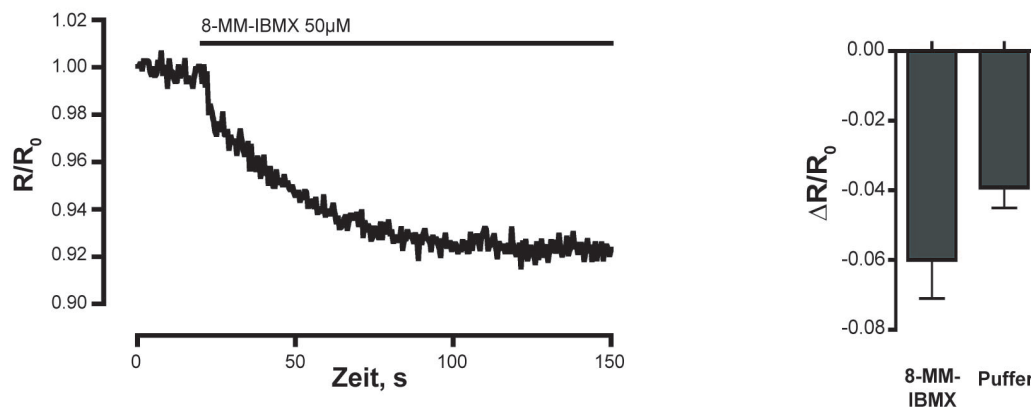
PDE1a die vorrangig Exprimierte ist (Abb.18).

Um den Einfluss von PDE1 auf den durch UDP hervorgerufenen Effekt in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs zu untersuchen, wurde das beschriebene Experiment in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  des spezifischen PDE1-Inhibitors 8-MM-IBMX wiederholt. Die Zellen wurden dafür während des gesamten Versuchs zusätzlich mit dem Inhibitor behandelt. Die Hemmung der PDE1 hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf den Rückgang des FRET-Ratios (Abb.19 links) und die Änderung der cAMP-Konzentration (Abb.19 rechts) im Vergleich zu Zellen, die nicht mit 8-MM-IBMX behandelt worden waren.



**Abb.19:** Mit dem Epac1-camps transfizierte VSMCs wurden mit Isoproterenol vorstimuliert und anschließend zusätzlich mit 100  $\mu\text{M}$  UDP behandelt. Die Versuche wurden entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  8-MM-IBMX durchgeführt. Die Änderungen des FRET-Ratios ( $\Delta R/R_0$ ) (links) und der durch UDP verursachten Änderungen der cAMP-Konzentration (rechts) werden im Vergleich zu Daten von Zellen gezeigt, die nicht mit 8-MM-IBMX behandelt wurden (8-MM-IBMX: n=7; control: n=35,  $p \geq 0.05$ ).

Die Wirkung des PDE1-Inhibitors 8-MM-IBMX wurde durch Behandlung von VSMCs mit demselben überprüft. Hier konnte ein Rückgang des FRET-Ratios um  $6 \pm 1\%$  beobachtet werden (Abb.20).



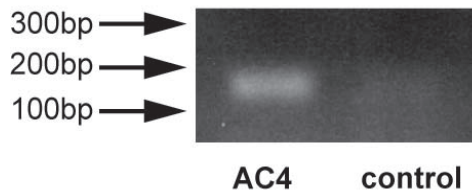
**Abb.20:** Die Funktionalität des verwendeten 8-MM-IBMX wurde überprüft, indem VSMCs, die mit dem Epac1-camps transfiziert waren, mit 50  $\mu\text{M}$  des selektiven PDE1-Inhibitors behandelt wurden. Das auf der linken Seite abgebildete repräsentative Beispiel zeigt einen kleinen, aber konstanten Effekt von 8-MM-IBMX.

Nach der Berechnung von  $\Delta R/R_0$  zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die mit 8-MM-IBMX superfundiert wurden und solchen, die für die gleiche Zeit mit Puffer behandelt wurden. (8-MM-IBMX: n=13, Puffer: n=13;  $p=0.11$ ).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare PDE1 [29, 73, 74] scheint also nicht primär für den UDP-induzierten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs verantwortlich zu sein. Das den Effekt vermittelnde Enzym sollte entsprechend auf der Ebene der cAMP-synthetisierenden ACs zu finden sein.



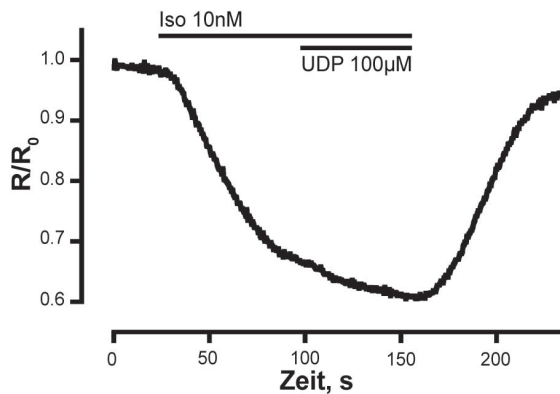
#### 5.1.5.4. Die Überexpression der $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen AC4 verhindert den UDP-induzierten Rückgang der cAMP-Konzentration



**Abb.21:** Die Expression von AC4 in VSMCs wurde durch RT-PCR mit spezifischen Primern in mit AC4 transfizierten Zellen und in Kontrollzellen überprüft.

Um den potentiellen Effekt der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cyclasen zu überdecken, wurden die Zellen mit der nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen AC4 [22, 24] und dem Epac1-camps transfiziert. Die Expression der AC4 wurde mit Hilfe von RT-PCR überprüft (Abb.21).

Die AC4-überexprimierenden Zellen wurden anschließend, wie bereits beschrieben, bis zum Erreichen eines stabilen Zustandes mit Isoproterenol vorstimuliert und dann



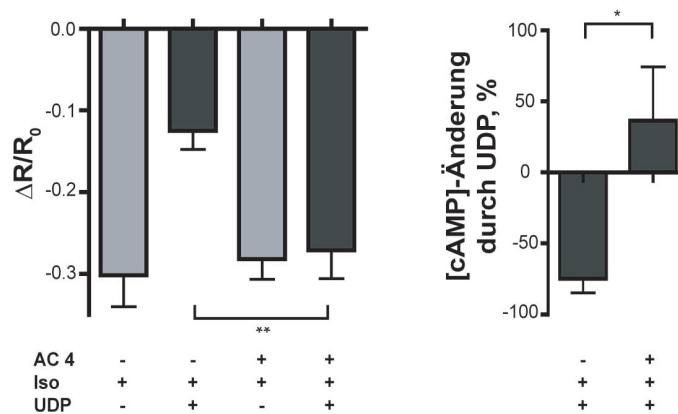
**Abb.22:** Hier ist ein repräsentatives Beispiel eines FRET-Experiments einer VSMC gezeigt, die mit dem Epac1-camps und zusätzlich AC4 transfiziert wurden. UDP konnte nach Vorstimulation mit Isoproterenol in diesen Zellen keinen Anstieg des FRET-Ratios hervorrufen

zusätzlich mit UDP behandelt. Signifikante Unterschiede zwischen mit AC4 transfizierten Zellen und den Kontrollzellen waren weder bei den  $R_0$ -Werten noch dem Ausmaß der Vorstimulation mit Isoproterenol festzustellen (Abb.23 links).

Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigte sich aber in mit AC4 transfizierten Zellen eine Aufhebung des durch UDP verursachten Rückgangs der cAMP-Konzentration (Abb.22).

Die statistische Auswertung der FRET-Ratio-Änderungen  $\Delta R$ , bezogen auf das Anfangsratio  $R_0$ , zeigte ebenfalls einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen mit AC4 transfizierten und Kontrollzellen (Abb.23 links). Die Berechnung der durch UDP verursachten Änderung der absoluten cAMP-Konzentrationen zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Bedingungen (Abb.23 rechts).

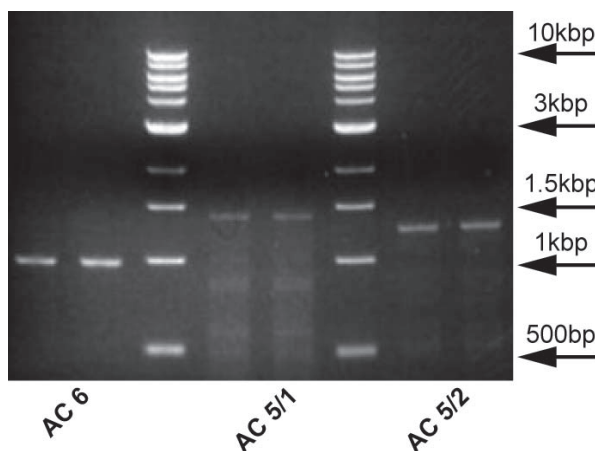




**Abb.23:** Die statistische Auswertung der UDP-induzierten FRET-Änderungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen, die mit AC4 transfiziert waren und den Kontrollzellen (\*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 6-10$ ) (links). Die dazugehörigen Änderungen der cAMP-Konzentrationen unterschieden sich ebenfalls signifikant voneinander (\*  $p < 0.05$ ;  $n = 6-10$ ) (rechts).

#### 5.1.5.5. Überexpression von AC6 bewirkt keine Änderung des durch UDP verursachten Effekts

Durch RT-PCR mit spezifischen Primern wurde zunächst überprüft, ob die  $Ca^{2+}$ -hemmbaren Adenylatcyclasen 5 und 6 in den verwendeten VSMCs endogen

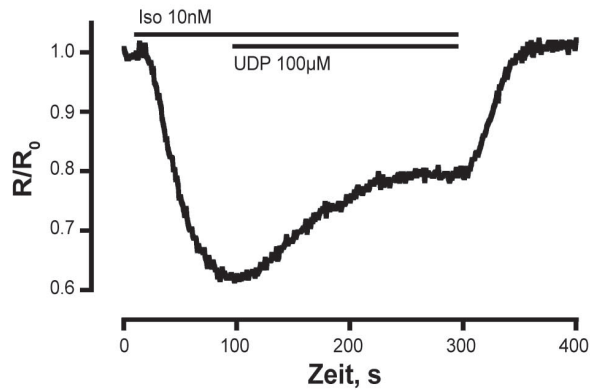


**Abb.24:** Die endogene Expression von AC6 und beiden Splicevarianten von AC5 wurde durch RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren überprüft.

exprimiert werden. Wie Abb.24 zeigt, sind sowohl AC6 als auch beide Varianten der AC5 vorhanden.

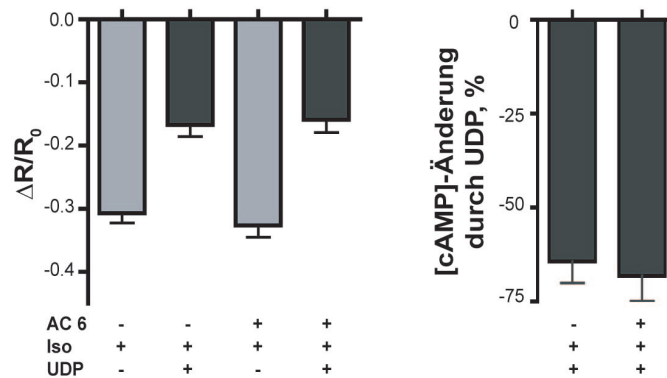
Anschließend wollten wir testen, welchen Effekt die Überexpression der  $Ca^{2+}$ -inhibierbaren AC6 [75-

77] auf die durch UDP induzierte cAMP-Abnahme hat. Im Vergleich zu Kontrollzellen führte die Überexpression von AC6 in VSMCs zu keiner signifikanten Verstärkung der durch UDP verursachten FRET-Zunahme (Abb.25, linker und mittlerer Graph). Entsprechend wurde auch keine signifikante Verstärkung der Abnahme der cAMP-Konzentration beobachtet (Abb.25 rechts).



**Abb.25:** Mit dem Epac1-camps und zusätzlich mit AC6 transfizierte VSMCs wurden wie in dem repräsentativen Beispiel (links) angegeben, mit den Agonisten superfundiert. Die durch UDP verursachte Änderung des FRET-Ratios nach Vorstimulation mit Isoproterenol unterschied sich in den AC6 überexprimierenden Zellen nicht von der in den Kontrollzellen.

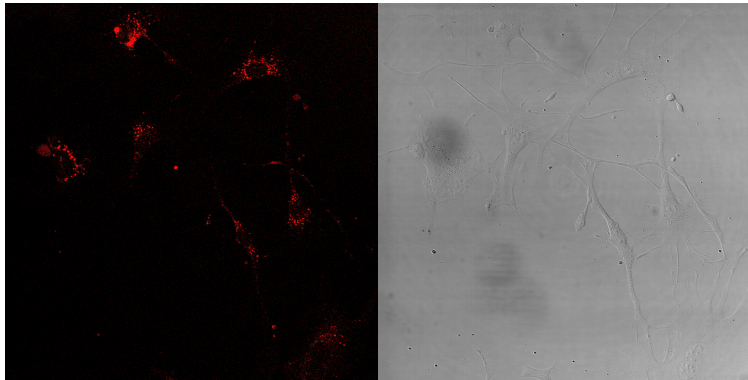
Die durch UDP verursachten Änderungen von  $\Delta R/R_0$  (unten Mitte) und den daraus resultierenden cAMP-Änderungen (unten rechts) wurden durch die zusätzliche Transfektion der Zellen mit AC6 nicht beeinflusst (n=15-22), p>0.05)



Begründet ist dies möglicherweise darin, dass durch die endogen exprimierten  $\text{Ca}^{2+}$ -hemmbaren Adenylatcyclasen 5 und 6 bereits der maximale Effekt verursacht wird, der durch zusätzliche Expression der AC6 nicht mehr vergrößert werden kann.

### 5.1.5.6. Transfektion der VSMCs mit siRNA gegen die Adenylatcyclasen 5 und 6 verringert den UDP-induzierten Rückgang der cAMP-Konzentration

Zur Überprüfung der Effizienz der Transfektion der VSMCs mit siRNA wurde diese mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Die Zellen wurden anschließend,

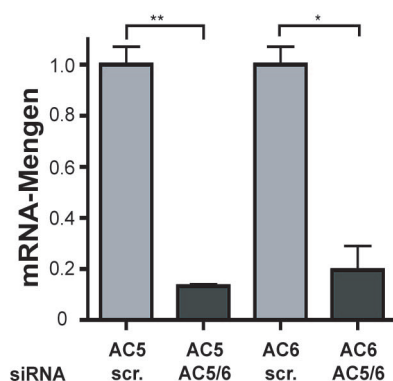


**Abb.26:** Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz der VSMCs mit den siRNAs gegen AC5 und 6 wurde die siRNA mit Cy3 markiert, bevor die Zellen damit transfiziert wurden. Gezeigt sind ein repräsentatives Fluoreszenzbild (links) der VSMCs 48 h nach Transfektion mit Cy3-markierter siRNA und das dazugehörige Durchlichtbild (rechts). Die so abgeschätzte Transfektionseffizienz war  $\geq 75\%$ .

wie gewöhnlich, mit siRNA und am nächsten Tag durch Elektroporation mit dem Epac1-camps transfiziert. Wie Abbildung 26 zeigt wurde so eine Transfektionseffizienz von etwa 75 % erreicht.

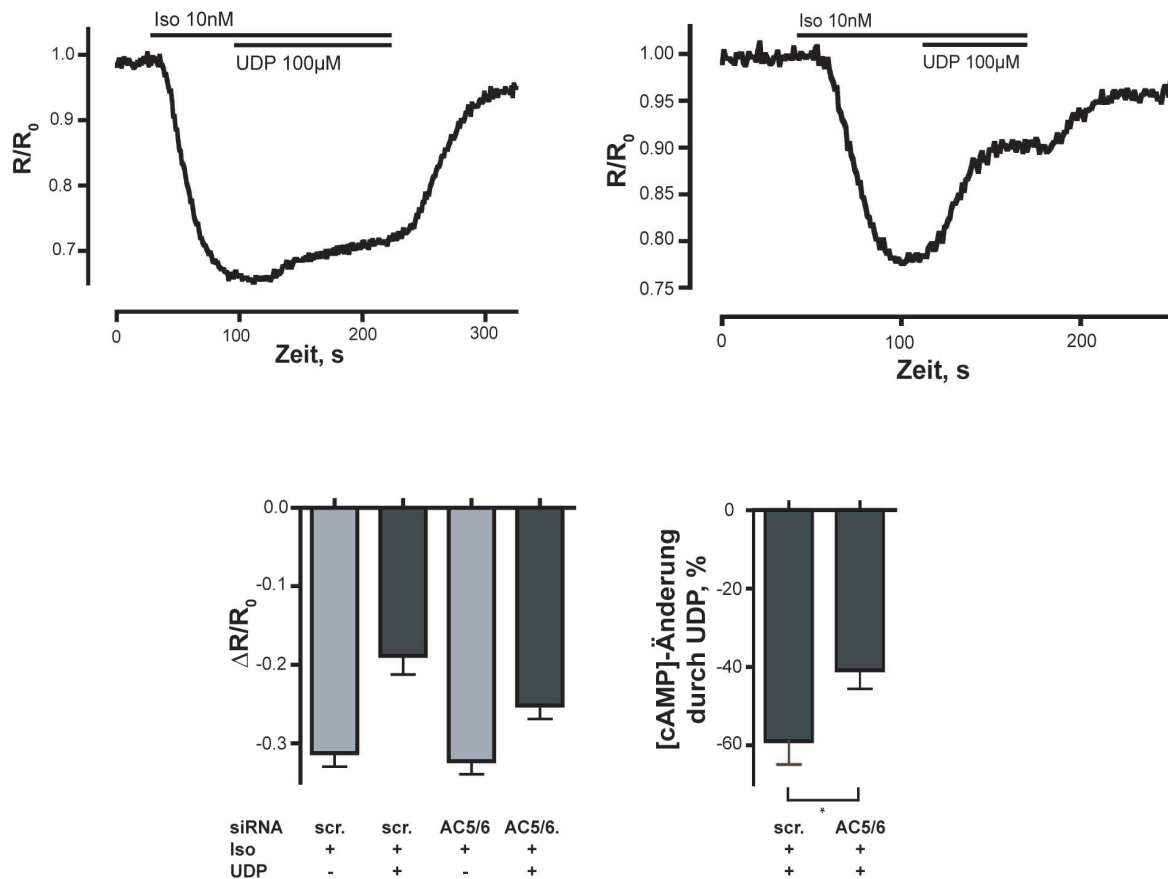
Durch quantitative RT-PCR überprüften wir als nächstes, wie effektiv die beiden verwendeten siRNA-

Pools die mRNA von AC5 und 6 reduzieren konnten. Da mehrere verwendete, eigentlich spezifische Primerpaare Kreuzreaktivität für beide Cyclasen zeigten, konnte nicht deutlich zwischen beiden unterschieden werden. Trotzdem zeigte sich mit beiden Primerpaaren ein signifikanter Unterschied der mRNA-Mengen in Zellen, die mit siRNA gegen AC5 und 6 behandelt wurden im Vergleich zu solchen, die mit nicht-zielgerichteter Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abb. 27).



**Abb.27:** Die mRNA-Mengen in VSMCs, die entweder mit siRNA gegen die AC5 und 6 oder mit nicht-zielgerichteter siRNA transfiziert waren, wurden mit Hilfe von quantitativer RT-qPCR bestimmt. Berechnet wurden die mRNA-Mengen aus den durchschnittlichen Zyklenzahlen, die auf die mittleren RNA-Werte von GAPDH normalisiert wurden (AC5: \*\*  $p < 0.01$ , AC6: \*  $p < 0.05$ ). Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und wurden dreifach bestimmt.

Nach Vorstimulation mit Isoproterenol und anschließender zusätzlicher Behandlung mit UDP zeigten die mit siRNA transfizierten Zellen eine signifikante Verkleinerung des UDP-abhängigen Rückgangs der cAMP-Konzentration im Vergleich zu mit nicht-zielgerichteter Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb.28).



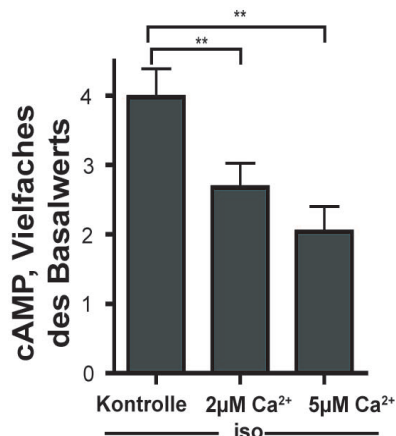
**Abb.28:** Mit dem Epac1-camps und siRNA gegen AC5 und 6 (oben links) oder nicht zielgerichteter siRNA (oben rechts) transfizierte Zellen wurden wie angegeben mit Agonisten behandelt. Beide Abbildungen zeigen repräsentative Beispiele.

Die mittlere Änderung des FRET-Ratios, angegeben als  $\Delta R/R_0$  ( $n=28-31$ ) (unten links) und die daraus resultierenden, durch UDP verursachten Änderungen der cAMP-Konzentrationen ( $n=26-29$ , \*  $p<0.05$ ) (unten rechts) wurden für beide Bedingungen berechnet.

Dieses Ergebnis deutet auf eine für den  $Ca^{2+}$ -abhängigen Effekt relevante Bedeutung von AC5 und 6 hin.

### 5.1.5.7. Die durch $\beta$ -Rezeptoren vermittelte Stimulation der Adenylatcyclasen ist durch $\text{Ca}^{2+}$ hemmbar

Um zusätzlich direkt nachzuweisen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  die durch Isoproterenol verursachte Stimulation der Adenylatcyclasen in VSMCs hemmt, führten wir radioenzymatische



**Abb.29:** In Membranen von VSMCs, die in Anwesenheit des PDE-Inhibitors RO 201724 mit 1  $\mu\text{M}$  Isoproterenol stimuliert wurden, führten sowohl 2 als auch 5  $\mu\text{M}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$ , im Vergleich zu  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen, zu einer signifikanten Inhibierung der Adenylatcyclase-Aktivität in VSMC-Membranen (2  $\mu\text{M}$ : n=4, \*\* p<0.005; 5  $\mu\text{M}$ : n=4, \*\* p<0.005;  $\text{Ca}^{2+}$ -free: n=4).

Adenylatcyclase-Aktivitäts-Bestimmungen durch. Um alle PDEs zu inhibieren liefen alle Versuche unter Zusatz von RO 201724 ab.

Unter basalen Bedingungen, d.h. ohne Stimulation der Membranen mit Isoproterenol, hatte der Zusatz von 2 und 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  keinen signifikanten Effekt auf die Cyclase-Aktivität (2  $\mu\text{M}$ : n=4, p>0.05; 5  $\mu\text{M}$ : n=4, p<0.05;  $\text{Ca}^{2+}$ -free: n=4). Nach Vorstimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Isoproterenol konnten sowohl 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  als auch 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  die Cyclase-Aktivität signifikant verringern

(Abb.29). Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch Isoproterenol verursachte cAMP-Synthese in VSMC-Membranen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist und stützt die Annahme, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Hemmung von AC5 und 6 zumindest einen wichtigen Anteil an der durch UDP hervorgerufenen Hemmung der cAMP-Synthese in VSMCs hat.

## 5.2. Generierung glattemuskelspezifischer Epac1-camps-transgener Mäuse

Die Untersuchungen in isolierten, lebenden VSMCs haben gezeigt, dass sich der FRET-basierte cAMP-Sensor Epac1-camps sehr gut dafür eignet, Änderungen der cAMP-Konzentrationen in VSMCs im physiologisch relevanten Bereich in Echtzeit zu beobachten. Um noch natürlichere Bedingungen als in isolierten Zellen zu schaffen und cAMP-Änderungen in ganzen isolierten Geweben beobachten zu können war ein zweites Ziel dieser Arbeit transgene Mäuse zu generieren, die glattemuskelspezifisch den Epac1-camps exprimieren.

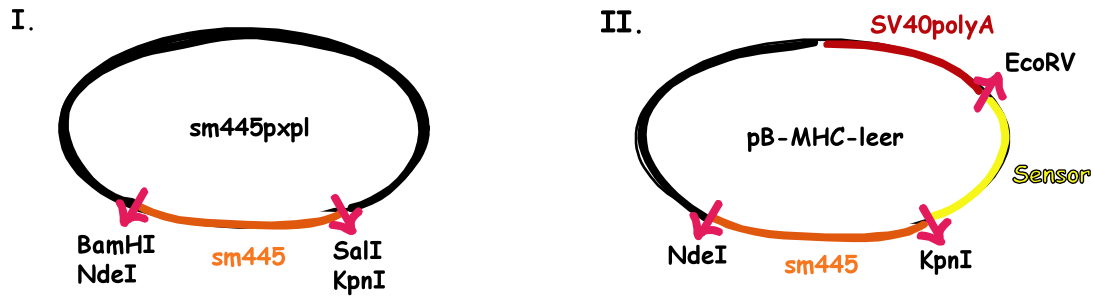
### **5.2.1. Expression des Transgens unter dem glattmuskelspezifischen Promotor SM445**

Der glattmuskelspezifische Promotor SM22 $\alpha$  wurde bereits erfolgreich verwendet [64]. Deshalb wollten auch wir diesen Promotor nutzen, um den Epac1-camps glattmuskelspezifisch in transgenen Mäusen zu exprimieren.

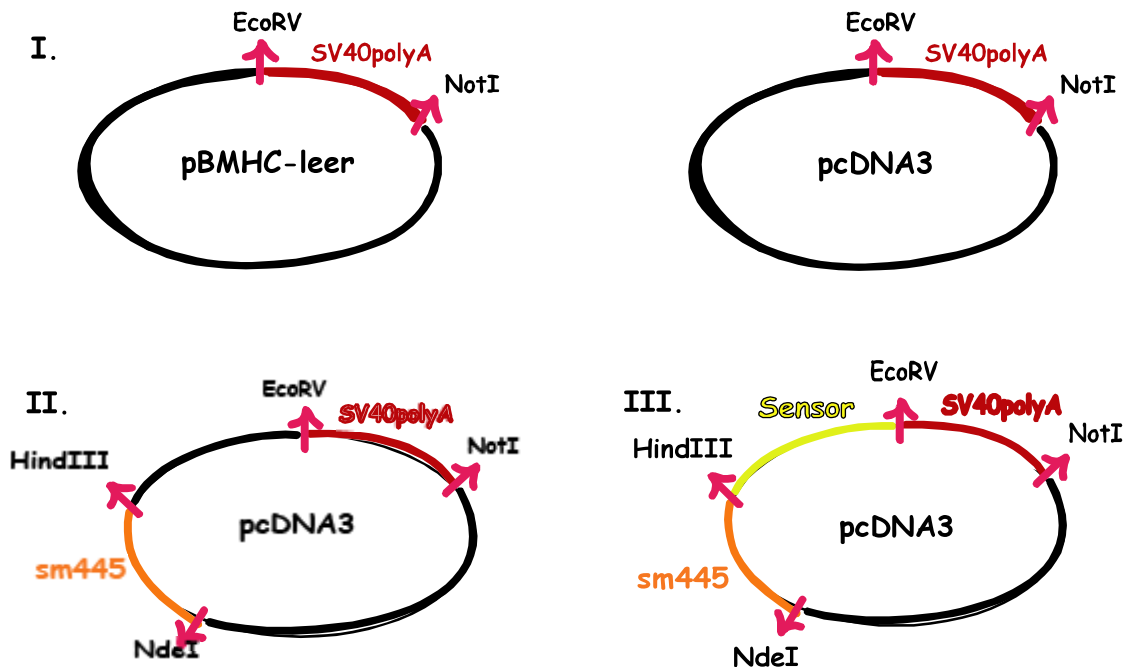
Das 1986 von Lees-Miller et al. [78] isolierten und charakterisierte Protein SM22 $\alpha$  wird v.a. in den glatten Muskelzellen der Aorta, des Uterus, der Lunge und des Darms in großen Mengen exprimiert. Auch in primären Kulturen von glatten Muskelzellen aus der Aorta und der Gattmuskel-Zelllinie A7r5 ist der Promotor nachweisbar [79]. Wichtig ist, dass die Aktivität des SM22 $\alpha$  Promotors in Gefäßen hauptsächlich auf den arteriellen Teil beschränkt ist und kaum in venösen oder visceralen glatten Muskelzellen zu finden ist.

Von Li *et al* [80] und Moessler *et al* [81] wurde 1996 gezeigt, dass eine vom ersten Exon ausgehende, 445 bp lange Sequenz des Promotors bereits völlig ausreichend für die vollständige Expression eines durch diesen Promotor kontrolliertes Protein ist. Wir verwendeten deshalb diese, 445 bp lange Sequenz, die als SM445-Promoter bezeichnet wird, um glattmuskelspezifische für den Epac1-camps transgene Mäuse zu generieren.

Die erste Strategie zur Klonierung eines Plasmids (Abb.30) für die Generierung solcher transgener Mäuse sah vor, dass die aus dem Plasmid sm445pxpl ausgeschnittene Sequenz des SM445-Promotors in das Plasmid pBMHC-leer ligiert wird. Dieses Plasmid enthält bereits den Sensor und eine, die Expression desselben verstärkende SV40polyA-Sequenz. Die zu dem in Abb. 28 II schematisch dargestellten Produkt führende Ligation war jedoch aus ungeklärten Gründen nicht möglich, so dass eine zweite Klonierungs-Strategie entwickelt wurde (Abb.31), die letztendlich erfolgreich war.



**Abb.30:** Für die Klonierung eines Plasmids, das für die Generierung glattmuskelspezifischer, für den Epac1-camps transgener Mäuse verwendet werden sollte, wurden zunächst durch PCR die zusätzlichen Schnittstellen NdeI und KpnI an die Sequenz des SM445 Promotors angefügt. Anschließend sollte das PCR-Produkt in den mit NdeI und KpnI geschnittenen Vektor pBMHC-leer ligiert werden, was jedoch nicht möglich war.



**Abb.31:** Für die zweite Strategie zur Klonierung eines Plasmids zur Generierung glattmuskelspezifischer, für den Epac1-camps transgener Mäuse wurde im ersten Schritt die bereits vorher erfolgreich verwendete SV40polyA-Sequenz aus dem Vektor pBMHC-leer geschnitten und anschließend in den Expressionsvektor pcDNA3 ligiert (I). Durch PCR wurde die Sequenz des SM445-Promotors aus dem Plasmid sm445pxpl amplifiziert. Dabei wurden gleichzeitig die zusätzlichen Schnittstellen NdeI und HindIII angefügt. Über diese Enzyme konnte die Sequenz des Promotors anschließend in den, bereits die SV40polyA-Sequenz enthaltenden, Vektor pcDNA3 eingefügt werden (II). Im letzten Schritt konnte dann der Epac1-camps über die Schnittstellen HindIII und EcoRV zwischen Promotor und SV40polyA-Sequenz in das Plasmid eingefügt werden (III).

Das fertig klonierte Plasmid wurde anschließend linearisiert, für die Pronukleusinjektion gereinigt und entsprechend verdünnt [68]. Nach der pronukleären Injektion in Oozyten wurden diese in Ammenweibchen eingesetzt [82]. Von den daraus entstammenden Tieren der F<sub>0</sub>-Generation trug eines das Transgen. Überprüft wurde dies mit Hilfe von PCR mit für das Transgen spezifischen Primern.

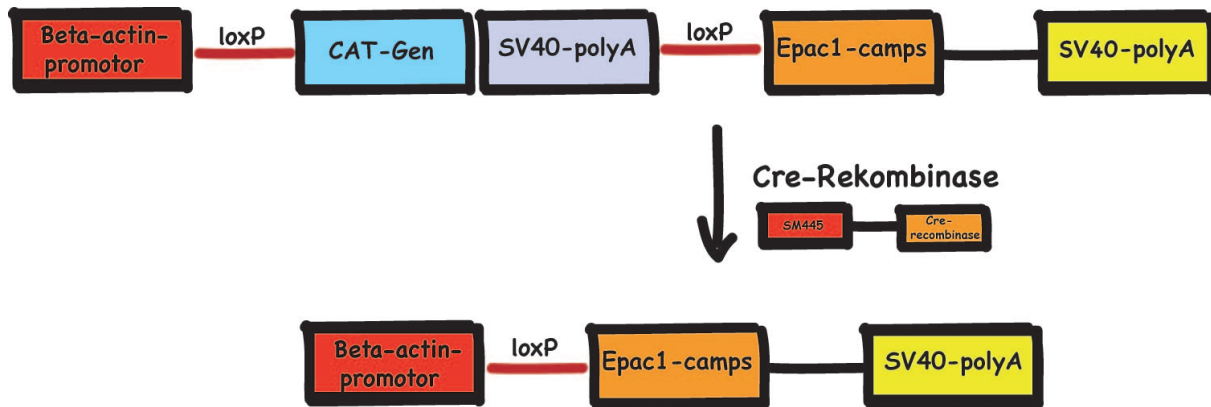
Das transgene Tier der F<sub>0</sub>-Generation, das sogenannten „Gründer-Tiere“, wurde verpaart. Es entstand so eine Linie transgener Tiere, die auf ausreichende Fluoreszenz in glatten Muskelzellen getestet wurde.

Dafür wurden aus Tieren der F<sub>1</sub>-Generation jeder Linie Aorten entnommen und daraus, wie beschrieben, glatte Muskelzellen isoliert. Diese wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch auf die Expression des Epac1-camps überprüft. Keines der Tiere zeigte jedoch eine detektierbare YFP-Fluoreszenz, so dass eine weitere, dritte Strategie nötig war, um transgene Tiere zu generieren, die den Sensor so stark exprimieren, dass er auch fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist.

### **5.2.2. Generierung glattmuskelspezifischer Epac1-camps transgener Mäuse mit Hilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems**

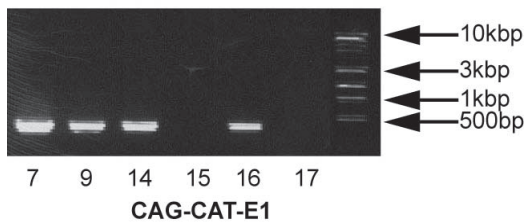
Auch für einen anderen CFP und YFP tragenden Sensor unter Kontrolle des SM445 Promotors war in keiner von drei Linien Fluoreszenz detektierbar. Dies legte die Vermutung nahe, dass der verwendete gewebsspezifische Promotor SM445 zu schwach für eine ausreichende Expression des Sensors ist, und dass ein stärkerer Promotor zu einer stärkeren Expression des Sensors beitragen könnte. Da kein stärkerer, glattmuskelspezifischer Promotor bekannt ist, sollte das Cre-loxP-Rekombinationssystem Verwendung finden. Mit dessen Hilfe ist es, wie bereits unter 3.3.3. in der Einleitung beschrieben, möglich, gewebsspezifisch ein Transgen zu exprimieren, dass aber unter der Kontrolle eines starken, ubiquitär exprimierten Promotors steht [62]. Die eigentliche Gewebsspezifität wird in diesem System dadurch erreicht, dass der Promotor erst durch das Ausschneiden einer, von zwei loxP-Sites flankierten, „Platzhalter-Sequenz“ unmittelbar vor die Sequenz des zu exprimierenden Transgens rückt. Dieses „Ausschneiden“ kann nur mit Hilfe des Enzyms Cre-Rekombinase erfolgen [63]. Verkreuzt man nun für das loxP-Konstrukt transgene Tiere mit Tieren, die gewebsspezifisch Cre-Rekombinase synthetisieren, so exprimiert ein Teil der Nachkommen dieser Tiere gewebsspezifisch das gewünschte Transgen (Abb.32).





**Abb.32:** Schema zur glattmuskelspezifischen Expression des Epac1-camps mit Hilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems. Die durch die beiden loxP-Sites flankierte Sequenz zwischen dem Promotor und dem Sensor kann, durch verpaaren eines Tieres, das dieses Transgen trägt mit einem Tier, das glattmuskelspezifisch (unter Kontrolle des SM22-Promotors) Cre-Rekombinase exprimiert, durch dieses Enzym herausgeschnitten werden. Der ubiquitäre beta-actin Promotor rückt so nur in glatten Muskelzellen vor den Epac1-camps, was zu einer gewebsspezifischen Expression des Sensors führt.

Für die Klonierung des in Abbildung 32 beschriebenen Konstrukts wurden jeweils die EGFP-Sequenz und die vorhandene beta-globin-polyA-Sequenz des Plasmids pBSII-SK(+)-CAG-CAT-EGFP [62] gegen die Sequenz des Epac1-camps und gegen eine



**Abb.33:** Mit Hilfe von PCR und spezifisch an das Transgen bindenden Primern wurde die Genotypisierung der Tiere, die den Sensor mit Hilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems exprimieren sollten, durchgeführt. Die Abbildung zeigt, dass zunächst 4 Gründertiere vorhanden waren.

bereits früher verwendete und bewährte beta-globin-polyA-Sequenz ausgetauscht.

Das so entstandene Konstrukt wird im Folgenden als CAG-CAT-E1 bezeichnet.

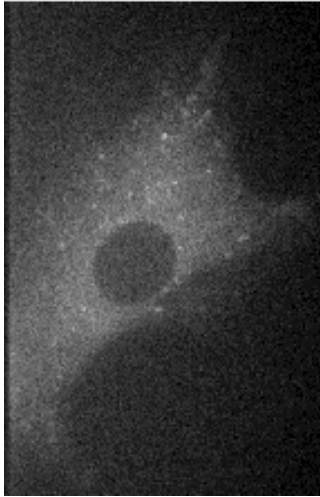
Nach Pronukleusinjektion dieses Konstruktes konnten zunächst vier Gründer-Tiere durch PCR erkannt werden (Abb.33).

Auch aus diesen vier, für CAG-CAT-E1 transgenen Linien wurden die glatten

Muskelzellen von jeweils ein bis zwei Tieren fluoreszenzmikroskopisch auf die Expression des Epac1-camps überprüft. Da dies vor dem Verkreuzen der Tiere mit den gewebsspezifischen Cre-Mäusen durchgeführt wurde, wurden die isolierten VSMCs durch Elektroporation mit einem für Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid transient transfiziert. Es zeigte sich, dass die so behandelten Zellen der Tiere der Linie 9 den Sensor in so hoher Konzentration synthetisieren, dass die Fluoreszenz des Sensors sichtbar war.

### 5.2.3. FRET-Messungen in glattmuskelspezifischen Epac1-camps-transgenen Mäusen

Die Tiere dieser Linie wurden anschließend mit homozygoten, glattmuskelspezifischen Cre-Mäusen verpaart. Erneut wurden aus den Nachkommen dieser Tiere, die transgen für CAG-CAT-E1 waren, glatte Muskelzellen isoliert und



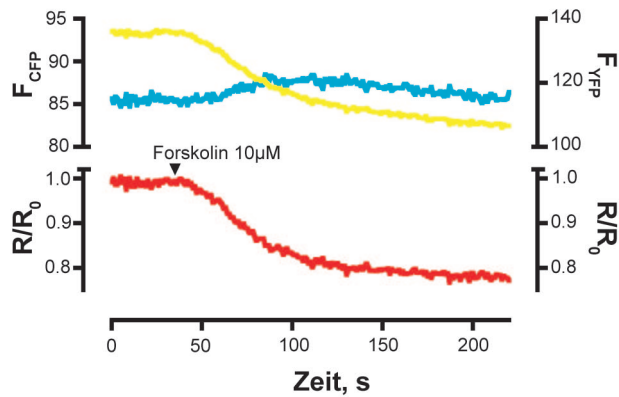
**Abb. 34:** Gezeigt wird die glatte Muskelzelle eines Tieres, das durch Verkreuzen der CAG-CAT-E1-transgenen Linie 9 mit einer glattmuskelspezifischen Cre-Maus entstand. Die Fluoreszenz dieser isolierten Zelle ist mit Hilfe des bildgebenden Systems gut darstellbar. Für Messungen im intakten Gewebsverband ist die Expression des Sensors allerdings nicht ausreichend.

fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich eine ebenso sichtbare Fluoreszenz der Zellen, wie im Vorversuch (Abb.34). Die sichtbare Fluoreszenz der Zellen war jedoch nicht stark genug, um diese auch in lebenden Geweben detektieren zu können. Daraufhin wurden noch zusätzliche Pronukleusinjektionen durchgeführt, um weitere Gründertiere, mit

eventueller stärkerer Expression des Sensors zu generieren. Unter den dadurch erhaltenen weiteren acht für CAG-CAT-E1 transgenen Mauslinien war jedoch keine, die den Sensor in größerem Maß exprimierte als die bereits Gezeigte.

### 5.2.4. Funktionalität des von den transgenen Tieren exprimierten Epac1-camps

Die Fluoreszenz der Zellen der Tiere von Linie 9 war hoch genug, um zu überprüfen, ob der von den Zellen synthetisierte Epac1-camps funktional ist. Dafür wurden mit



**Abb.35:** In glattmuskelspezifischen, für CAG-CAT-E1-transgenen Mäusen wurden cAMP-Messungen durchgeführt. Gezeigt sind im oberen Teil des Diagramms die Emissionen von CFP (blau, linke Y-Achse), YFP (gelb, rechte Y-Achse) und im unteren Teil das aus beiden berechnete, auf das Anfangs-Ratio normalisierte FRET-Ratio ( $\Delta R/R_0$ ) (rot). Nach Zupippetieren von  $10 \mu\text{M}$  Forskolin, zum angegebenen Zeitpunkt, fällt das FRET-Ratio deutlich ab, was einen Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle bedeutet.

aus den gewebspezifischen, CAG-CAT-E1-transgenen Mäusen gewonnenen VSMCs FRET-Messungen durchgeführt. Um die cAMP-Synthese in den Zellen direkt zu stimulieren wurden die Zellen mit Forskolin behan-

delt. Wie Abbildung 35 zeigt, stieg das CFP-Signal nach Forskolingabe deutlich an, das YFP-Signal und das FRET-Ratio fielen ab. So konnte gezeigt werden, dass

der in den glatten Muskelzellen der transgenen Tiere exprimierte Sensor auf eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle anspricht und somit funktional ist.

## 6. Diskussion

### 6.1. Die Wechselwirkung von $\text{Ca}^{2+}$ und cAMP in isolierten VSMCs

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen in der Zelle auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration in isolierten, intakten VSMCs zu untersuchen. Um dies mit einer möglichst hohen zeitlichen Auflösung machen zu können, wurde der FRET-basierte cAMP-Sensor Epac1-camps verwendet [59]. Dieser Sensor erlaubte die Berechnung absoluter cAMP-Konzentrationen und -Änderungen in intakten lebenden Zellen.

Durch die zeitlich hoch aufgelöste Beobachtung von cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen konnte gezeigt werden, dass schnelle Anstiege des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , hervorgerufen durch purinerge Stimulation mit UDP, zu einem stabilen Rückgang der cAMP-Konzentrationen in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs führen. Belege für die Verantwortlichkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs für den Rückgang der cAMP-Konzentration in VSMCs sind das Auslösen des gleichen Effektes durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 und den purinergen Agonisten ATP, sowie die deutliche Hemmung des cAMP-Rückgangs nach UDP-Gabe in Anwesenheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA-AM. Zusätzlich durchgeführte Cyclase-Aktivitäts-Assays untermauern ebenfalls diese Annahme, da die Gesamtcyclase-Aktivität durch den Zusatz von 2 und 5  $\mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  signifikant verringert werden konnte.

Als Ursache für den durch UDP ausgelösten cAMP-Rückgang in mit Isoproterenol vorstimulierten Zellen konnte durch weitere Untersuchungen folgender Signalweg festgestellt werden: Der durch UDP ausgelöste Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zur Hemmung von AC5 und 6. In Folge dessen stagniert die cAMP-Synthese und der intrazelluläre cAMP-Spiegel fällt ab. Neben der signifikanten Minderung des cAMP-Rückgangs nach Blockade der endogenen AC5 und 6 durch siRNA lässt sich dies weiter daraus schließen, dass durch Überexpression der  $\text{Ca}^{2+}$ -

unabhängigen AC4 praktisch kein durch UDP hervorgerufener Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs mehr zu beobachten war. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung von Phosphodiesterasen hingegen ist wahrscheinlich nicht die primäre Ursache für den beschriebenen Effekt, da die Hemmung der einzigen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren PDE1 mit dem dafür spezifischen Inhibitor 8-MM-IBMX keinerlei Einfluss auf den durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs hatte.

### **6.1.1. Der Epac1-camps erlaubt die Berechnung absoluter cAMP-Konzentrationen in lebenden Zellen**

Abgesehen davon, dass mit Hilfe des Epac1-camps cAMP-Änderungen mit sehr hoher zeitlicher Auflösung beobachtet werden können, bietet der Sensor prinzipiell die Möglichkeit der Umrechnung von Änderungen der FRET-Ratien in absolute cAMP-Konzentrationen. Allerdings steht dies unter dem Vorbehalt der Richtigkeit von zwei Annahmen: Zum einen ist die Festlegung eines durch den Sensor detektierbaren cAMP-Maximalwertes in intakten VSMCs nötig. Auf Grund der in den Zellen beobachteten maximalen FRET-Änderung von 50 % durch 100  $\mu\text{M}$  Isoproterenol (Abb. 9 rechts) und der *in vivo* für Isoproterenol erstellten Konzentrationswirkungskurve (Abb. 2 rechts und Abb. 9 links) sind wir davon ausgegangen, dass die durch 100  $\mu\text{M}$  Isoproterenol hervorgerufene Stimulation vollständig und gesättigt ist. Die dadurch in den Zellen erreichte cAMP-Konzentration kann also als „obere Grenze“ zur Berechnung der absoluten cAMP-Konzentrationen *in vivo* herangezogen werden. Änderungen in höheren Konzentrationsbereichen können vom Sensor nicht erfasst werden, da er durch mehr als 2  $\mu\text{M}$  cAMP gesättigt wird. Eine Verfälschung der Berechnung ist dadurch grundsätzlich denkbar. Umgangen wurde dies in unserem Fall jedoch dadurch, dass die Stimulation durch Isoproterenol immer im submaximalen Bereich lag. Berechnungen von cAMP-Konzentrationen erfolgten deshalb immer nur im nahezu „linearen“ Bereich der Kalibrierungskurve (Abb.9 rechts). Verfälschungen der Ergebnisse durch Berechnungen im gesättigten Bereich des Sensors wurden so weitgehend vermieden.

Zum anderen muss die Annahme gelten, dass die Zellen im nicht stimulierten Zustand eine cAMP-Konzentration besitzen, die unterhalb der Detektionsgrenze des Sensors und somit unter 200 nM liegt.

Insgesamt kann die Festlegung beider Grenzen bei der Berechnung der absoluten cAMP-Konzentration zu einer geringen Unschärfe führen. Dennoch stellen die bestimmten Konzentrationsverhältnisse und die angegebenen Änderungen der cAMP-Konzentration einen guten Anhaltspunkt für die Verhältnisse in intakten lebenden Zellen dar. Dies ist als ein erheblicher Fortschritt gegenüber der Situation zellfreier Assays zu werten, durch die absolute cAMP-Konzentrationen im Cytosol praktisch nicht gemessen werden können, insbesondere nicht mit hoher zeitlicher Auflösung.

### **6.1.2. UDP verursacht nur in vorstimulierten VSMCs physiologisch relevante Änderungen der cAMP-Konzentration**

Um den Einfluss einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in VSMCs zu beobachten, wurden die Zellen mit dem purinergen Agonisten UDP behandelt. UDP aktiviert in VSMCs selektiv  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren [83], die durch anschließende Aktivierung  $\text{G}_q$ -gekoppelter Rezeptoren eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern bewirken [84]. Wurden Zellen nun ausschließlich mit UDP behandelt, so zeigte sich keine Änderung der gemessenen FRET-Ratios (Abb.3). Der Epac1-camps ist, wie bereits erwähnt, sensibel für cAMP-Änderungen in einem Bereich von 0,1 bis 20  $\mu\text{M}$  (Abb. 9 links, [59]). cAMP-Änderungen, die kleiner als 100  $\mu\text{M}$  sind, sind deshalb mit diesem Sensor nicht detektierbar. Die  $K_D$ -Werte für cAMP-Effektproteine, wie beispielsweise PKA, liegen bei 50-200 nM [85]. Durch den Sensor ist also der größte Teil des physiologisch relevanten Bereichs von cAMP-Änderungen abgedeckt. Daraus lässt sich nun wiederum schließen, dass die Behandlung der Zellen mit UDP alleine zumindest keinen physiologisch relevanten Einfluss auf die basalen cAMP-Konzentrationen in VSMCs hat. Die Ergebnisse der Cyclase-Aktivitätssays, in denen in VSMC-Membranen unter basalen, nichtstimulierten Bedingungen keine Veränderung der Gesamtcyclase-Aktivität durch eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten war, deuten sogar darauf hin, dass unter basalen Bedingungen überhaupt keine  $\text{Ca}^{2+}$ -verursachten Änderungen der cAMP-Konzentration auftreten.

Die Konsequenz daraus war die Untersuchung der Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  auf bereits erhöhte cAMP-Spiegel in VSMCs. Um die cAMP-Synthese in den Zellen zu aktivieren wurden die Zellen, bevor sie zusätzlich mit UDP behandelt wurden, mit dem den  $G_s$ -Signalweg stimulierenden Agonisten Isoproterenol vorstimuliert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in nicht vorstimulierten Zellen gewonnen wurden, konnten wir in VSMCs, deren cAMP-Konzentrationen bereits durch Vorstimulation mit Isoproterenol erhöht war, nach zusätzlicher UDP-Gabe einen deutlichen Anstieg des FRET-Ratios beobachten (Abb. 4), was mit einem Rückgang der cAMP-Konzentration nach purinergem Stimulation in diesen Zellen gleichzusetzen ist (Abb. 10, rechts).

### **6.1.3. $\text{Ca}^{2+}$ ist Mediator des durch UDP ausgelösten Effekts**

Der durch UDP ausgelöste Effekt könnte, außer durch purinerg intrazellulär freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$ , auch durch andere Faktoren, wie beispielsweise die Desensibilisierung des Systems nach länger andauernder Stimulation einer Zelle [86-89] oder durch zusätzliche Aktivierung von  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren [90] durch UDP, trotz dessen bekannter Selektivität für  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren [83, 91], verursacht werden.

Eine Desensibilisierung des Sensors kann ausgeschlossen werden, weil die über mehrere Minuten erfolgte Stimulation mit submaximalen Konzentrationen von Isoproterenol alleine zu einem über den gesamten beobachteten Zeitraum konstant bleibenden Abfall des FRET-Ratios führte (Abb.8).

Gegen die Beteiligung des  $G_i$ -Signalwegs spricht zunächst die schon erwähnte Selektivität von UDP für  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren, die ausschließlich  $G_q$ -gekoppelt sind. Allerdings konnte durch Hemmung des  $G_i$ -Signalwegs mit PTX eine signifikante Verkleinerung des durch UDP verursachten Rückgangs der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs festgestellt werden. Da die mit PTX behandelten Zellen sich aber sowohl morphologisch als auch die Verteilung des Sensors betreffend stark von den Kontrollzellen unterschieden (Abb. 7), kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Daten aus den mit PTX behandelten Zellen mit denen aus den Kontrollzellen verglichen werden können. Der im Durchschnitt in den PTX-Zellen geringere Abfall der cAMP-Konzentration (Abb. 6) kann deshalb auch nicht als Hinweis auf eine Beteiligung von  $G_i$ -gekoppelten purinergen Rezeptoren gesehen werden. Es ist also davon auszugehen, dass der durch UDP

verursachte Abfall der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs wirklich auf den purinergen Agonisten zurückzuführen ist und nicht durch einen anderen, unspezifischen Mechanismus ausgelöst wird.

Spezifische Hinweise für die Verantwortlichkeit des durch purinerge Aktivierung intrazellulär freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  sind die Hemmung des durch UDP ausgelösten Effekts durch BAPTA-AM, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Hemmung der Gesamt-Adenylylcyclaseaktivität in radioenzymatischen Adenylylcyclase-Aktivitätsversuchen sowie die Möglichkeit der Nachahmung des Effekts durch den auch  $G_q$ -aktivierenden Agonisten ATP (Abb.13) und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A 23187 (Abb.14).

Bei den Simultanmessungen von cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Änderungen (Abb.13) fällt auf, dass ein gewisser zeitlicher Unterschied zwischen dem zunächst sehr schnellen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen und dem vergleichsweise relativ langsam folgenden Rückgang der cAMP-Konzentration besteht. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass unabhängig davon, durch welches Enzym der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Rückgang der cAMP-Konzentration verursacht ist, immer die endogen vorhandenen Phosphodiesterasen dafür sorgen müssen, dass das vorhandene cAMP abgebaut wird [49, 92, 93]. Dies geschieht immer im gleichen zeitlichen Rahmen [94] und ist nahezu unabhängig von der Kinetik des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals und des dadurch verursachten Effekts.

Der durch UDP verursachte Rückgang der cAMP-Konzentration konnte durch Komplexierung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  mit BAPTA deutlich reduziert werden (Abb. 12). Dies stellt ein weiteres starkes Argument für die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  an dem UDP induzierten Rückgang der cAMP-Konzentration hin.

Ein dritter Beleg für  $\text{Ca}^{2+}$  als den Verursacher des durch UDP hervorgerufenen Rückgangs der cAMP-Konzentration in vorstimulierten VSMCs sind die Ergebnisse der radioenzymatischen Adenylylcyclase-Aktivitätsversuche unter stimulierten Bedingungen. Hier war ebenfalls eine durch beide verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen signifikant reduzierte Adenylylcyclaseaktivität (Abb. 27) zu beobachten.



#### **6.1.4. Phosphodiesterasen sind nicht primär für den durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs verantwortlich**

Es gibt nur eine Phosphodiesterase, von der bekannt ist, dass sie durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden kann: PDE1. Dass diese nicht für den durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs verantwortlich ist, konnte gezeigt werden, indem VSMCs zusätzlich, während der Vorstimulation mit Isoproterenol und der anschließenden gleichzeitigen Behandlung mit UDP, mit dem selektiven PDE 1-Inhibitor 8-MM-IBMX superfundiert wurden. Im Vergleich zu Zellen, die nicht mit 8-MM-IBMX behandelt waren, zeigte sich kein Unterschied des durch UDP verursachten Anstiegs des FRET-Ratios (Abb. 16, links) und somit kein Unterschied in den durch UDP verursachten Änderungen der cAMP-Konzentration (Abb. 16, rechts). Weiter spricht für die Nichtbeteiligung von PDE1 an dem durch  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelösten Rückgang der cAMP-Konzentration die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Verringerung der Adenylatcyclase-Aktivität in VSMC Membranen, die in Anwesenheit des unspezifischen PDE Inhibitors RO 201724 bestimmt wurde (Abb. 27).

#### **6.1.5. Adenylatcyclase 5 und 6 werden durch den Anstieg von intrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ gehemmt und führen so zum Rückgang der cAMP-Konzentration**

Durch Ausschluss von Phosphodiesterasen als primäre Verursacher des durch UDP hervorgerufenen Rückgangs der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs kann davon ausgegangen werden, dass der beschriebene Effekt durch die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Hemmung von Adenylatcyclasen verursacht wird. In Frage kommen, wie bereits erwähnt, ausschließlich AC5 und 6, da diese die einzigen durch  $\text{Ca}^{2+}$  hemmbaren ACs sind [25, 95, 96].

Die Überexpression von AC6 in VSMCs führte allerdings nicht zu einer messbaren Verstärkung des durch UDP verursachten Rückgangs der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs. Dies kann einerseits dadurch begründet sein, dass die endogen exprimierten ACs bereits einen maximalen Effekt hervorrufen, der durch zusätzliche Expression der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen AC6 nicht weiter verstärkt werden kann. Zum anderen gibt es einige Hinweise dafür, dass alle endogen vorhandenen,  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen ACs in sog. lipid rafts lokalisiert sind [22, 23, 97]. In diesen

Regionen der Zellmembran befinden sich ACs demnach beispielsweise zusammen mit den Proteinen der Kanäle, die für den SOCE verantwortlich sind. Im Zuge dieser Arbeit wurde nicht geklärt, ob der durch  $\text{Ca}^{2+}$  verursachte Rückgang der in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs durch das aus intrazellulären Speichern freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  oder durch einen  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg des durch die Speicherleerung ausgelösten SOCE ausgelöst wird. In einigen Publikationen wird aber der CCE für die Hemmung von AC5 und 6 verantwortlich gemacht [98, 99]. Deshalb ist es durchaus möglich, dass exogen exprimierte AC6 Proteine, die sich wahrscheinlich nicht in diesen lipid rafts befinden [97], wegen der fehlenden Nähe zu den Kanälen des SOCE nicht durch diesen beeinflusst werden können. Wäre diese Annahme richtig, so könnte zusätzlich exprimierte AC6 den durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs überhaupt nicht verstärken.

Anders als die Überexpression von AC6 konnte durch die Hemmung der Expression von AC5 und 6 durch siRNAs ein signifikanter Rückgang des beobachteten Effekts bewirkt werden. Dass der Effekt, obwohl die Ergebnisse der RT-qPCR eine deutliche Reduktion der Expression der mRNA für AC5 und 6 zeigen, nicht deutlicher ausgeprägt ist, kann wie folgt begründet sein.

Eine deutliche aber eben nicht vollständige Reduktion auf mRNA-Ebene, wie sie nach den RT-qPCR Versuchen zu sehen war, verhindert nicht automatisch in gleich starkem Maße die Synthese des dadurch kodierten Proteins. Die Zelle ist also in diesem Fall, wenn auch vermindert, weiterhin dazu im Stande AC5 und 6 aus der übrigen mRNA zu synthetisieren. Es ist demnach immer noch ein Teil dieser Enzyme in der Zelle verfügbar, so dass der dadurch verursachte Effekt weiterhin zumindest leicht präsent bleibt. Zur Überprüfung der Expression von AC5 und 6 auf Proteinebene wäre die Mengenbestimmung durch Western-Blot-Analyse sicherlich hilfreich gewesen. Allerdings war uns die Detektion der ACs durch spezifische Antikörper auf Grund der extrem schlechten Spezifität der selben nicht möglich.

Ein weiteres Argument, für die Beteiligung von AC5 und 6 an dem beschriebenen Effekt ist die Tatsache, dass die Überexpression der  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängigen AC4 [25] den durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs nahezu verschwinden lässt (Abb. 19, 20). Da während der Versuche, die in mit AC4 transient transfizierten Zellen durchgeführt wurden, darauf

geachtet wurde, dass die Vorstimulation mit Isoproterenol weiterhin innerhalb des gleichen, submaximalen Bereichs wie bei allen anderen Experimenten lag, kann eine eventuelle Sättigung von PDEs und ein damit verbundenes Verschwinden des Effekts ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit den Rückgang der cAMP Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten und anschließend zusätzlich mit UDP behandelten VSMCs durch die Überexpression der  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängigen AC4 zu antagonisieren deutet deutlich darauf hin, dass der Effekt durch  $\text{Ca}^{2+}$  inhibierbare ACs verursacht ist.

### **6.1.6. Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen: Unterschiede und ähnliche Ergebnisse**

Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits ähnliche Beobachtungen in anderen Zelltypen bzw. Zelllinien machen. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass das ebenfalls den  $\text{G}_q$ -Signalweg aktivierende Thrombin AC6 hemmt. Auch hier wurde das durch  $\text{G}_q$ -Aktivierung freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  als Inhibitor der in HUVECs exprimierten AC6 identifiziert [100]. Dies ist außer dieser Arbeit, die einzige, in der cAMP-Änderungen und deren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigkeit, ebenfalls mit Hilfe des Epac1-camps, in Echtzeit untersucht wurden.

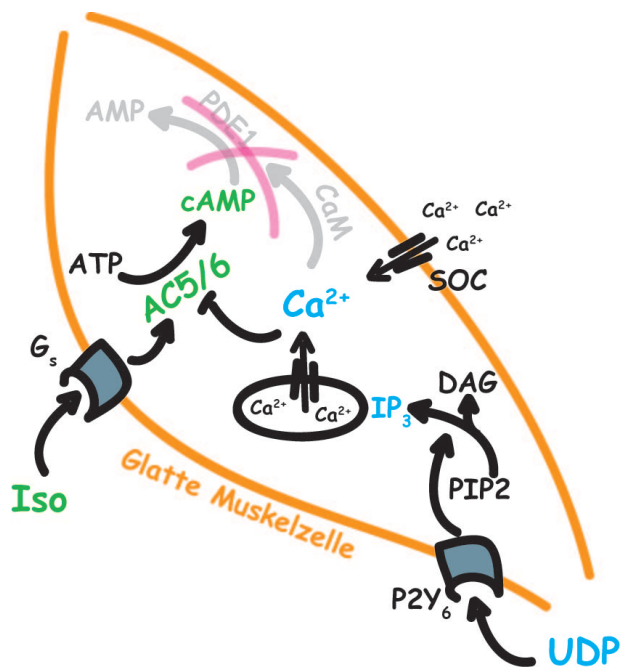
In gastrointestinalen glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass die, wie vorher schon gezeigt wurde, dort exprimierten AC5 und 6 durch verschiedene puringerge Agonisten inhibierbar sind [101]. Die Autoren machen hier allerdings zwei unterschiedliche Signalwege aus, die beide zur Hemmung der Cyclasen beitragen. Der vorherrschende Mechanismus ist demnach die Hemmung der ACs durch die Aktivierung  $\text{G}_i$ -gekoppelter Rezeptoren. Ist der  $\text{G}_i$ -vermittelte Signalweg durch Behandlung der Zellen mit PTX blockiert, so übernimmt ein zweiter Mechanismus die Hemmung der Cyclasen. In diesem Fall werden AC5 und 6 durch nach Aktivierung des  $\text{G}_q$ -Signalwegs intrazellulär freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  gehemmt. Die Autoren stellen also fest, dass der von uns beschriebene Mechanismus erst relevant wird, wenn die  $\text{G}_i$ -Komponente nicht mehr verfügbar ist.

Im Unterschied zu unseren Untersuchungen wurden hier, abgesehen davon, dass die Versuche nicht in vaskulären, sondern in gastrointestinalen glatten Muskelzellen gemacht wurden, nur purinerge Agonisten verwendet, die sowohl  $\text{G}_q$  als auch  $\text{G}_i$  aktivieren. Um zu überprüfen, welchen Effekt eine reine  $\text{G}_q$ -Aktivierung hat, wurde

CCK-8 benutzt. Der von uns benutzte selektive Agonist UDP wurde von den Autoren nicht getestet. CCK-8 zeigte aber, ganz anders als das UDP in unseren Versuchen, keinerlei Effekte, was die Autoren unter anderem zur Schlussfolgerung bewegte, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Effekt nur von untergeordneter Rolle ist. Dies kann aber auf Grund unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden. In den von uns untersuchten VSMCs ist die  $\text{G}_q$ -abhängige, intrazelluläre Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  ein wichtiger und dominanter Mechanismus um AC5 und 6 und damit die cAMP-Synthese zu hemmen.

Eine andere Arbeit beschäftigt sich mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Hemmung der cAMP-Synthese in der Glattmuskel-Zelllinie A7r5 [50]. Die Aktivierung der  $\text{G}_q$ -vermittelten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung erfolgte in diesem Fall durch AVP. Im Unterschied zum durch UDP verursachten Rückgang der cAMP-Konzentration in mit Isoproterenol vorstimulierten VSMCs, wie wir ihn beobachten konnten, ist die Hemmung der cAMP-Produktion hier sehr viel länger anhaltend. Dies ist ein Grund dafür, dass die Autoren hier die Hemmung von AC5 und 6 ausschließen. Ein weiterer ist der, dass AC5 und 6 vornehmlich durch den CCE gehemmt werden, der aber durch AVP nicht ausgelöst wird. Dem widerspricht allerdings eine andere Veröffentlichung der Arbeitsgruppe, in der beschrieben wird, dass AVP durchaus CCE aktivieren kann; allerdings erst nach Wegnahme des Agonisten [102]. Es ist also durchaus möglich, dass auch der von Dyer *et al.* beobachtete Effekt in A7r5-Zellen durch AC5 und 6 vermittelt wird. Andererseits handelt es sich wieder um eine andere, nicht primäre Zelllinie.

Zusammenfassend konnten wir in diesem Teil der Arbeit zeigen, dass die beiden, für die Regulation des vaskulären Tonus wichtigen Mediatoren  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP in primären, intakten VSMCs deutlich Einfluss auf einander nehmen können. Anstiege der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen durch Hemmung der ACs 5 und 6 zu einer verminderten Produktion von cAMP und somit zu einer Absenkung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen. (Abb.37)



**Abb.37:** Isoproterenol aktiviert über  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren die Synthese von cAMP in vaskulären glatten Muskelzellen. Durch anschließende, zusätzliche Behandlung der Zellen mit UDP wird über  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren intrazelluläres  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und anschließend der „store operated  $Ca^{2+}$  current“ (SOC) aktiviert. Die dadurch erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in der Zelle hemmen die Aktivität von AC5 und 6. Dadurch sinken die cAMP-Spiegel in der Zelle. Die  $Ca^{2+}$ /CaM-abhängige Aktivierung der PDE1 scheint keine primäre Rolle bei diesem Effekt zu spielen.

Physiologisch gesehen kann das zur Kontraktion der Gefäße führende  $Ca^{2+}$  seine eigene Wirkung noch dadurch verstärken, dass es die relaxierende Wirkung von cAMP aufhebt, indem es über die Hemmung der ACs 5 und 6 die Absenkung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt. Die Aktivierung  $G_q$ -gekoppelter Rezeptoren und der dadurch ausgelöste Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$  sind also in der Lage, eine durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren verursachte Relaxation der Gefäße aufzuheben.

### 6.1.7. Ausblick

Das übergeordnete Ziel zu dem diese Arbeit den Weg bereiten sollte, war, letztendlich cAMP- und  $Ca^{2+}$ - Messungen in ganzen intakten Gefäßen zu machen, um die in isolierten Gefäßen gefundenen Ergebnisse unter noch natürlicheren Bedingungen überprüfen zu können. Ein erster Schritt in Richtung intakter Gefäße wäre die Beobachtung von VSMCs in Kokultur mit Endothelzellen. Im natürlichen Gewebe liegt der glatte Muskelzellschicht in Gefäßen zum Gefäßlumen hin eine einzellige Schicht aus Endothelzellen auf. Diese Endothelzellen sind durch Abgabe verschiedener, u.a. auch purinerge Botenstoffe wie ATP an die glatten Muskelzellen stark an der Regulation von Kontraktion und Relaxation der VSMCs beteiligt. Aktiviert wird die Freisetzung dieser Botenstoffe aus den Endothelzellen durch mechanische Belastung dieser Zellen, wie sie beispielsweise unter hypotonen Bedingungen [5] oder durch erhöhte Scherkräfte [4] auftreten, oder durch Nukleotide, die von

Thrombozyten, anderen Endothelzellen, Neuronen oder beschädigten Zellen abgegeben werden [103].

Interessant wäre es nun mit Hilfe des Epac1-camps zu beobachten, wie sich die cAMP-Spiegel in VSMCs verhalten, die mit Endothelzellen kokultiviert werden, die zur Synthese und Abgabe von ATP angeregt werden. Es gibt bereits einige Hinweise dafür, dass das von Endothelzellen an glatte Muskelzellen abgegebene ATP zur Relaxation der VSMCs führen kann: Einerseits kann das von den Endothelzellen abgegebene ATP schnell zu Adenosin abgebaut werden [4, 5], das, wie bereits in Abb. 1 gezeigt werden konnte, in VSMCs zu einem Anstieg des cAMP führt und somit eine Relaxation der glatten Muskelzellen bewirken kann. Zum anderen ist auch bekannt, dass Endothelzellen das abgegebene ATP zur ihrer autokrinen Selbstregulation nutzen können [5]. So kann ATP aus Endothelzellen in den selben oder in benachbarten Endothelzellen die Synthese von Prostacyclin aktivieren [103], das anschließend von den Endothelzellen an die glatten Muskelzellen abgegeben wird und dort über  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren zu einer Aktivierung der cAMP-Synthese und damit zur Relaxation der glatten Muskelzellschicht führt [104]. Für die den Endothelzellen sehr ähnlichen Epithelzellen des Respirationstraktes ist zudem bekannt, dass ATP eine Freisetzung von  $PGE_2$  bewirken kann, das durch die Bindung an die ebenfalls  $G_s$ -gekoppelten  $EP_2$ -Rezeptoren [104] die glatte Muskelzellschicht relaxiert (Abb. 38).

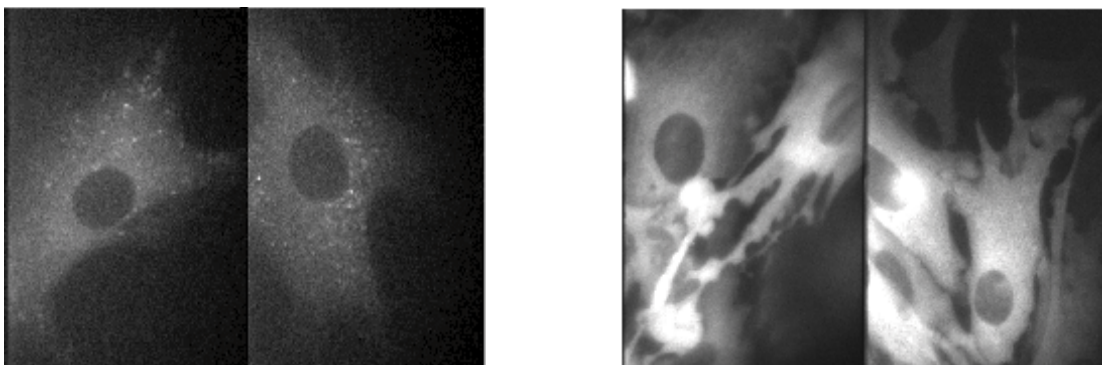
## **6.2. Gewebsspezifische Expression des Epac1-camps in einer transgenen Mauslinie**

Um, wie bereits erwähnt, dem letztendlichen Ziel Messungen in intakten Gefäßen näher zu kommen, sollte ein transgenes Mausmodell generiert werden, das glattmuskelspezifisch den Epac1-camps trägt. Mit einer solchen, gewebsspezifisch transgenen Mauslinie hätte man vielleicht sogar die Möglichkeit in lebenden Tieren cAMP-Änderungen fluoreszenzmikroskopisch beobachten zu können.

Die nicht sichtbare Fluoreszenz der transgenen Mauslinie, die den Sensor unter der Kontrolle des glattmuskelspezifischen Promotors SM445 exprimiert, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass dieser Promotor zu schwach ist, um eine für die Messung von FRET-Signalen ausreichende Synthese des Sensor-Proteins in

diesen Tieren zu gewährleisten. Grund für diese Annahme waren auch drei weitere Mauslinien, die transgen für einen cGMP-Sensor [105] waren, der genau wie der Epac1-camps YFP und CFP enthält. In keiner dieser Linien konnte eine für die Messung von FRET-Signalen ausreichende Synthese des Sensor-Proteins detektiert werden.

Die Verwendung des stärkeren, ubiquitär vorkommenden  $\beta$ -Actin-Promoters [62] konnte das Problem der zu schwachen Expression lösen. Durch das Cre-loxP-Rekombinationssystem [63] gelang es eine für den Epac1-camps glattmuskelspezifisch transgene Mauslinie zu generieren, deren Expression ausreichend war, um zumindest FRET-Messungen in aus diesen Tieren isolierten VSMCs durchzuführen. Im Vergleich zu einer Mauslinie, die den Sensor unter der Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promoters ubiquitär exprimiert [106], war die Fluoreszenz der gewebsspezifischen Tiere jedoch sehr schwach (Abb.39).



**Abb. 39:** Aus der Aorta von glattmuskelspezifisch transgenen CAG-CAT-E1 Mäusen isolierte VSMCs zeigen eine deutlich sichtbare Fluoreszenz. Im Vergleich zu ebenfalls aus der Aorta isolierten VSMCs von Mäusen, die den Epac1-camps unter Kontrolle des gleichen Promotors ubiquitär exprimieren [106] ist diese Fluoreszenz jedoch sehr schwach.

Das Ziel war anfänglich glattmuskelspezifisch den Epac1-camps tragende Tiere zu generieren, um FRET-Messungen in lebenden Geweben durchzuführen und so cAMP-Änderungen in glatten Muskelzellen in einer möglichst natürlichen Umgebung beobachten zu können. Durch Anwendung der Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie ist es möglich, FRET-Messungen in viel tiefer liegenden Gewebsschichten durchzuführen. Erstmals wurde sie durch Rubart *et al.* [107] im Jahr 2003 angewandt. Im Unterschied zur herkömmlichen Laser-Scanning-Mikroskopie wird ein Molekül des Fluorophors nicht von einem Photon der

erforderlichen Wellenlänge, sondern, von zwei Photonen mit etwa der doppelten Wellenlänge (für CFP 822 nm), die in sehr kurzen Abstand nacheinander ( $<10^{-18}$  s) auf das Molekül auftreffen müssen, auf das höher liegende Energieniveau angehoben.

Blaue Fluoreszenz kann also mit Hilfe von Strahlung im nahen Infrarotbereich angeregt werden. Die Streuung am Gewebe ist dabei viel geringer als die von Photonen mit kürzerer Wellenlänge. Deshalb können die Photonen des Infrarotbereichs 200 bis manchmal sogar 1000  $\mu\text{m}$  tief ins Gewebe eindringen. Ein weiterer Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie ist die geringere Phototoxizität und das viel geringere Ausbleichen des Gewebes. Eine genügend hohe Elektronendichte wird bei dieser Methode nämlich nur im Fokuspunkt erreicht, sodass darüber und darunter liegende Schichten „geschont“ werden, was v.a. bei *in vivo* Messungen von Bedeutung sein kann.

Trotz dieser neuen fluoreszenzmikroskopischen Methode stellt sich aber in ganzen lebenden Gewebsverbänden das Problem der Autofluoreszenz bestimmter Gewebsarten unter den Bedingungen für die Anregung und Detektion von CFP und YFP. Bei der für CFP erforderlichen Anregungswellenlänge zeigen v.a. Bindegewebe und elastische Fasern starke Autofluoreszenz. Um diese von der Fluoreszenz des Epac1-camps unterscheiden zu können ist deshalb eine weitaus stärkere Expression des Sensors nötig, als für die Messung von FRET-Signalen in isolierten Zellen. Da diese ausreichend starke Fluoreszenz aber in den von uns generierten, gewebsspezifischen Tieren nicht zu erreichen war, waren auch Messungen in isolierten lebenden Geweben bis jetzt nicht möglich.

Die herkömmlichen, in isolierten glatten Muskelzellen der transgenen Tiere durchgeführten Messungen konnten jedoch deutlich machen, dass der durch das Cre-loxP-Rekombinationssystem gewebsspezifisch exprimierte cAMP-Sensor Epac1-camps funktional ist und dass FRET-Messungen in Zellen aus für den Sensor transgenen Mäusen, die nach diesem Prinzip generiert wurden, durchaus möglich sind.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Mutschler, E., et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. ed. 2001: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
2. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 5 ed. 1999: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
3. Schmidt, R.F., G. Thews, and F. Lang, *Physiologie des Menschen*. 28 ed. 2000: Springer.
4. Burnstock, G., *Purinergic regulation of vascular tone and remodelling*. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2009. **29**(3): p. 63-72.
5. Schwiebert, L.M., et al., *Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(2): p. C289-301.
6. Berridge, M.J., *Smooth muscle cell calcium activation mechanisms*. *J Physiol*, 2008. **586**(Pt 21): p. 5047-61.
7. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie & Pathobiochemie*. 7 ed. 2003: Springer.
8. Stull, J.T., et al., *Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation*. *Hypertension*, 1991. **17**(6 Pt 1): p. 723-32.
9. Adelstein, R.S., et al., *Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(23): p. 8347-50.
10. Stull, J.T., et al., *Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(27): p. 16683-90.
11. Xiong, Z. and N. Sperelakis, *Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. **27**(1): p. 75-91.
12. Pfitzer, G., et al., *Regulation of the crossbridge cycle in vascular smooth muscle by cAMP signalling*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2006. **27**(5-7): p. 445-54.
13. Abdel-Latif, A.A., *Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. **226**(3): p. 153-63.
14. Bai, Y. and M.J. Sanderson, *Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP<sub>3</sub> receptor*. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 34.
15. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 60-71.
16. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. 2002: Garland Science.
17. Cabrera-Vera, T.M., et al., *Insights into G protein structure, function, and regulation*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(6): p. 765-81.
18. Bunemann, M., M. Frank, and M.J. Lohse, *Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 16077-82.
19. Frank, M., et al., *G Protein activation without subunit dissociation depends on a G $\alpha$ (i)-specific region*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(26): p. 24584-90.
20. Linder, J.U., *Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(15): p. 1736-51.

21. Streb, H., et al., *Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate*. *Nature*, 1983. **306**(5938): p. 67-9.
22. Willoughby, D. and D.M. Cooper, *Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(3): p. 965-1010.
23. Cooper, D.M., *Compartmentalization of adenylyl cyclase and cAMP signalling*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 6): p. 1319-22.
24. Cooper, D.M. and A.J. Crossthwaite, *Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. **27**(8): p. 426-31.
25. Cooper, D.M., *Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 3): p. 517-29.
26. Cooper, D.M., *Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylyl cyclases by calcium*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 5): p. 912-5.
27. Dessauer, C.W., et al., *The interactions of adenylyl cyclases with P-site inhibitors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. **20**(5): p. 205-10.
28. Mou, T.C., et al., *Structural basis for inhibition of mammalian adenylyl cyclase by calcium*. *Biochemistry*, 2009. **48**(15): p. 3387-97.
29. Omori, K. and J. Kotera, *Overview of PDEs and their regulation*. *Circ Res*, 2007. **100**(3): p. 309-27.
30. Conti, M. and J. Beavo, *Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 481-511.
31. Bos, J.L., *Epac proteins: multi-purpose cAMP targets*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(12): p. 680-6.
32. Roscioni, S.S., C.R. Elzinga, and M. Schmidt, *Epac: effectors and biological functions*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008. **377**(4-6): p. 345-57.
33. Cullere, X., et al., *Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase*. *Blood*, 2005. **105**(5): p. 1950-5.
34. Kang, G., et al., *cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells*. *J Physiol*, 2006. **573**(Pt 3): p. 595-609.
35. Kashima, Y., et al., *Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46046-53.
36. Ozaki, N., et al., *cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(11): p. 805-11.
37. Mei, F.C. and X. Cheng, *Interplay between exchange protein directly activated by cAMP (Epac) and microtubule cytoskeleton*. *Mol Biosyst*, 2005. **1**(4): p. 325-31.
38. Magiera, M.M., et al., *Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) interacts with the light chain (LC) 2 of MAP1A*. *Biochem J*, 2004. **382**(Pt 3): p. 803-10.
39. Purves, G.I., et al., *Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 14): p. 3639-50.
40. Yokoyama, U., et al., *Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(4): p. H1547-55.
41. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 11-21.
42. Foskett, J.K., et al., *Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(2): p. 593-658.

43. Taylor, C.W. and A.J. Laude, *IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca<sup>2+</sup>*. *Cell Calcium*, 2002. **32**(5-6): p. 321-34.
44. Mikoshiba, K., *IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts*. *J Neurochem*, 2007. **102**(5): p. 1426-46.
45. Lewis, R.S., *The molecular choreography of a store-operated calcium channel*. *Nature*, 2007. **446**(7133): p. 284-7.
46. Salido, G.M., S.O. Sage, and J.A. Rosado, *Biochemical and functional properties of the store-operated Ca<sup>2+</sup> channels*. *Cell Signal*, 2009. **21**(4): p. 457-61.
47. Landa, L.R., Jr., et al., *Interplay of Ca<sup>2+</sup> and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(35): p. 31294-302.
48. Kim, J.W., et al., *Imaging cyclic AMP changes in pancreatic islets of transgenic reporter mice*. *PLoS One*, 2008. **3**(5): p. e2127.
49. Willoughby, D. and D.M. Cooper, *Ca<sup>2+</sup> stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 5): p. 828-36.
50. Dyer, J.L., et al., *Long lasting inhibition of adenylyl cyclase selectively mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium release*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(10): p. 8936-44.
51. Straub, S.V., et al., *Modulation of cytosolic calcium signaling by protein kinase A-mediated phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*. *Biol Res*, 2004. **37**(4): p. 593-602.
52. Warriar, S., et al., *cAMP microdomains and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in guinea-pig ventricular myocytes*. *J Physiol*, 2007. **580**(Pt.3): p. 765-76.
53. Liu, M., W.A. Large, and A.P. Albert, *Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits store-operated channel currents via a cAMP-dependent protein kinase mechanism in rabbit portal vein myocytes*. *J Physiol*, 2005. **562**(Pt 2): p. 395-406.
54. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
55. Hallett, M.B., et al., *Techniques for measuring and manipulating free Ca<sup>2+</sup> in the cytosol and organelles of neutrophils*. *J Immunol Methods*, 1999. **232**(1-2): p. 77-88.
56. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
57. Heim, R. and R.Y. Tsien, *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. *Curr Biol*, 1996. **6**(2): p. 178-82.
58. Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(11): p. 448-55.
59. Nikolaev, V.O., et al., *Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(36): p. 37215-8.
60. Chamley-Campbell, J., G.R. Campbell, and R. Ross, *The smooth muscle cell in culture*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(1): p. 1-61.
61. Albinsson, S. and P. Hellstrand, *Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(2): p. C772-82.
62. Kawamoto, S., et al., *A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination*. *FEBS Lett*, 2000. **470**(3): p. 263-8.

63. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
64. Kuhbandner, S., et al., *Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle*. Genesis, 2000. **28**(1): p. 15-22.
65. Hein, P., et al., *Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33345-51.
66. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
67. Hoffmann, C., et al., *Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. **369**(2): p. 151-9.
68. Buitrago, M., et al., *The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2005. **11**(8): p. 837-44.
69. Bar, I., et al., *Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(3): p. 777-84.
70. Kamishima, T. and J.M. Quayle, *P2 receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> transients in rat cerebral artery smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(2): p. H535-44.
71. Fricks, I.P., et al., *Gi-dependent cell signaling responses of the human P2Y14 receptor in model cell systems*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **330**(1): p. 162-8.
72. Soeder, K.J., et al., *The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12017-22.
73. Polson, J.B. and S.J. Strada, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 403-27.
74. Sharma, R.K., et al., *Regulation of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1): review*. Int J Mol Med, 2006. **18**(1): p. 95-105.
75. Beazely, M.A. and V.J. Watts, *Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report*. Eur J Pharmacol, 2006. **535**(1-3): p. 1-12.
76. Chabardes, D., M. Imbert-Teboul, and J.M. Elalouf, *Functional properties of Ca<sup>2+</sup>-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca<sup>2+</sup> increase in the inhibition of intracellular cAMP content*. Cell Signal, 1999. **11**(9): p. 651-63.
77. Yoshimura, M. and D.M. Cooper, *Cloning and expression of a Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6716-20.
78. Lees-Miller, J.P., et al., *Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 2988-93.
79. Solway, J., et al., *Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13460-9.
80. Li, L., et al., *Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells*. J Cell Biol, 1996. **132**(5): p. 849-59.
81. Moessler, H., et al., *The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice*. Development, 1996. **122**(8): p. 2415-25.

82. Engelhardt, S., et al., *Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 7059-64.
83. von Kugelgen, I. and A. Wetter, *Molecular pharmacology of P2Y-receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 310-23.
84. Alexander, R.W., et al., *Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle*. Hypertension, 1985. **7**(3 Pt 1): p. 447-51.
85. Tasken, K. and E.M. Aandahl, *Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 137-67.
86. Lefkowitz, R.J., J.M. Stadel, and M.G. Caron, *Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 159-86.
87. Stadel, J.M., et al., *Phosphorylation of the beta-adrenergic receptor accompanies catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase*. Trans Assoc Am Physicians, 1983. **96**: p. 137-45.
88. Sibley, D.R., et al., *Phosphorylation of the beta-adrenergic receptor in intact cells: relationship to heterologous and homologous mechanisms of adenylate cyclase desensitization*. Arch Biochem Biophys, 1987. **258**(1): p. 24-32.
89. Lohse, M.J., et al., *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
90. Katada, T., et al., *The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and the inhibition of adenylate cyclase in S49 lymphoma cyc- and wild type membranes*. J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3586-95.
91. Communi, D., M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **222**(2): p. 303-8.
92. Leroy, J., et al., *Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases*. Circ Res, 2008. **102**(9): p. 1091-100.
93. Murthy, K.S., H. Zhou, and G.M. Makhlof, *PKA-dependent activation of PDE3A and PDE4 and inhibition of adenylyl cyclase V/VI in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(3): p. C508-17.
94. Nikolaev, V.O., et al., *Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 1716-9.
95. Guillou, J.L., H. Nakata, and D.M. Cooper, *Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35539-45.
96. Hanoune, J. and N. Defer, *Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 145-74.
97. Ostrom, R.S., et al., *Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(5): p. 983-92.
98. Cooper, D.M., et al., *Capacitative Ca<sup>2+</sup> entry regulates Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases*. Biochem J, 1994. **297** ( Pt 3): p. 437-40.
99. Chiono, M., et al., *Capacitative Ca<sup>2+</sup> entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells. Evidence that physiologically evoked Ca<sup>2+</sup> entry regulates Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase in non-excitabile cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1149-55.

100. Werthmann, R.C., et al., *Real-time monitoring of cAMP levels in living endothelial cells: thrombin transiently inhibits adenylyl cyclase 6*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 16): p. 4091-104.
101. Murthy, K.S. and G.M. Makhoul, *Regulation of adenylyl cyclase type V/VI in smooth muscle: interplay of inhibitory G protein and Ca<sup>2+</sup> influx*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 122-8.
102. Moneer, Z., et al., *Different phospholipase-C-coupled receptors differentially regulate capacitative and non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 cells*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 3): p. 821-9.
103. Kunapuli, S.P. and J.L. Daniel, *P2 receptor subtypes in the cardiovascular system*. Biochem J, 1998. **336 ( Pt 3)**: p. 513-23.
104. Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumiya, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 205-29.
105. Nikolaev, V.O., S. Gambaryan, and M.J. Lohse, *Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP*. Nat Methods, 2006. **3**(1): p. 23-5.
106. Calebiro, D., et al., *Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors*. PLoS Biol, 2009. **7**(8): p. e1000172.
107. Rubart, M., et al., *Two-photon molecular excitation imaging of Ca<sup>2+</sup> transients in Langendorff-perfused mouse hearts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(6): p. C1654-68.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich zunächst bei Prof. Dr. Moritz Bünemann für die persönliche Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit. Weiterhin bei Prof. Dr. Martin Lohse für die ideenreichen Diskussionen. Prof. Dr. Utz Fischer und Prof. Dr. Robert Feil danke ich für die zusätzliche Betreuung meiner Arbeit im Rahmen der Graduate School.

Ich bedanke mich bei Dr. Viacheslav Nikolaev für die große Hilfe beim Klonieren von Plasmiden und seine Unterstützung in vielen weiteren Belangen meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus der AG Bünemann für das tolle Arbeitsklima, die Unterstützung die ich von jedem einzelnen immer wieder bekommen habe und die sehr sehr schöne Zeit mit ihnen allen, in der wir auch viele nette private Stunden miteinander verbracht haben.

Vielen Dank an Ruth Werthmann, Peter Hein, Monika Frank, Kerstin Hadamek, Leif Hommers und Markus Milde.

Außerdem gilt mein Dank allen anderen Freunden und Kollegen am Institut für ihre Unterstützung und Geduld und ihre Fähigkeit mich immer wieder neu zu motivieren.

Vielen Dank insbesondere an Carina Gross, Alexander Zürn, Dr. Carsten Hoffmann, Birgit Thur, Susanne Reiner und Monika Meier Peuschel.

Ein besonderer Dank gilt meine Eltern, die es mir ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen und mich dabei immer in jeglicher Art und Weise unterstützt haben.

Außerdem meinem Mann, der mich auch in stressigen Zeiten immer geduldig ertragen und ermutigt hat.

## **Affidavit**

### ***(Eidstattliche Erklärung)***

I hereby declare that my thesis entitled

„Analysis of the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of cAMP in intact vascular smooth muscle cells“ /

„Untersuchungen zur Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Regulation von cAMP in intakten vaskulären Myocyten“

is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

München, 02.03.10