

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

**Funktion der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I bei der  
Regulation des BK-Kanals durch Stickstoffmonoxid**

**Viktor Peter Voigt**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Th. Kleppisch

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. St. Engelhardt

Die Dissertation wurde am 30.10.2009 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 24.03.2010 angenommen.

**meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>06</b>
1.1	Physiologie und Bedeutung der vaskulären Blutdruckregulation	06
1.2	Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur	07
1.3	Relaxation glatter Gefäßmuskulatur	10
1.3.1	<i>Stickstoffmonoxid (NO) als endothelial-derived relaxing factor (EDRF)</i>	10
1.3.2	cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)	15
1.3.2.1	Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK)	16
1.3.2.2	cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI)	18
1.3.2.3	cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII)	19
1.4	Muskelrelaxierendes System aus cGMP und cGKI	20
1.5	Kaliumkanäle in Gefäßmuskelzellen	23
1.5.1	Bedeutung von Kaliumkanälen für das Membranpotential	23
1.5.2	Klassifikation und Struktur von Kaliumkanälen	24
1.5.3	Kalziumaktivierter BK-Kanal	27
1.5.4	Regulation des BK-Kanals und STOCs	30
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Mäuse	33
3.2	Genotypisierung der gezüchteten Mäuse mittels PCR	33
3.3	Präparation von Myozyten der Mäuseaorta	34
3.4	Reagenzien	35

3.4.1	Präparationslösung	35
3.4.2	Verdaulösung	35
3.5	Elektrophysiologie	36
3.5.1	Patch-clamp-Technik	36
3.5.2	Patch-clamp-Messung	37
3.5.2.1	Inside-out-Konfiguration	37
3.5.2.2	Whole-cell-Konfiguration	37
3.5.3	Aufbau des patch-clamp-Messplatzes	40
3.6	Messvorbereitungen	40
3.7	Whole-cell-Experimente	41
3.8	Single-channel-Experimente	44
3.9	Messlösungen	45
3.10	DEA-NO	46
3.11	Statistische Bearbeitung und mathematische Auswertung	46
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
4.1	Einzelkanalmessungen	48
4.1.1	Ionenleitfähigkeit des BK-Kanals	48
4.1.2	Bestimmung der Kalziumabhängigkeit des BK-Kanals	49
4.2	Elektrophysiologische Charakterisierung des BK-Kanals in Gefäß- muskelzellen von Wildtyp- und cGKI <sup>-/-</sup> -Mäusen	50
4.2.1	NO vermittelte Aktivierung des BK-Kanals	51
4.2.1.1	DEA-NO-Wirkung an der Wildtyp-Maus	52
4.2.1.2	DEA-NO-Wirkung an der cGKI <sup>-/-</sup> -Maus	52
4.2.2	Hemmung des BK-Kanals mit Iberiotoxin	52
4.2.2.1	Wirkung von Iberiotoxin am BK-Kanal der Wildtyp-Maus	52

4.2.2.2 Wirkung von Iberiotoxin an der cGKI <sup>-/-</sup> -Maus	54
4.3 Regulation des BK-Kanals aus cGKI-Nullmutanten durch exogenes cGKI-Protein	55
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	58
<b>5 Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1 Mausmutanten mit cGKI-Defekt	59
5.2 Charakterisierung des BK-Kanals	60
5.2.1 Funktionsuntersuchungen am BK-Kanal der WT-Maus	60
5.2.2 Funktionsuntersuchungen am BK-Kanal der KO –Maus	61
5.2.3 Rekonstitution	62
5.2.4 Kreuzreaktivität zwischen cGMP und cAMP	63
5.3 cGKI-abhängige Regulation des Gefäßtonus	65
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>80</b>
8.1 Abbildungen und Tabellen	80
8.2 Abkürzungsverzeichnis	82
8.3 Publikationshinweis	85
<b>9 Danksagung</b>	<b>86</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologie und Bedeutung der vaskulären Blutdruckregulation

In den westlichen Industrienationen ist die häufigste Herz-Kreislaufkrankung der Hypertonus, von dem weltweit bis zu einer Milliarde Menschen betroffen sind.

Durch zunehmenden Wohlstand mit unausgewogener Lebensweise und Anstieg der Lebenserwartung wird sich in den kommenden Jahren die Zahl der Hypertoniepatienten weiter erhöhen (Vasan, Beiser et al. 2002). Zusammen mit dem Diabetes mellitus, der Adipositas und der Hyperlipidämie bildet der Hypertonus das metabolische Syndrom, das als Hauptursache für koronare Herzkrankheiten, Herz-Kreislaufversagen und den Schlaganfall gilt.

Die zwei wesentlichen Säulen in der Hypertonietherapie sind die Umstellung der fettreichen, bewegungsarmen Lebensweise und die Therapie mit Antihypertensiva.

Da Antihypertensiva nicht frei von Nebenwirkungen sind und die Zahl der Patienten mit essentieller Hypertonie weiter zunimmt, steigt das Interesse an neuen, wirksameren und nebenwirkungsärmeren Medikamenten.

Ziel neuer Medikamente ist ein reduziertes Nebenwirkungsprofil. Dies gelingt durch ihre selektive Wirkung an Gefäßproteinen, die zum einen an der Blutdruckregulation beteiligt sind und zum anderen spezifisch im Zielgewebe vorliegen.

Eine ganz entscheidende Struktur des Gefäßsystems zur Blutdruckregulation ist die glatte Muskulatur der Widerstandsgefäße.

## 1.2 Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur

Die Muskelkontraktion erfolgt durch Verschiebung der kontraktilen Elemente (Aktin und Myosin) und wird durch Kalzium gesteuert. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration unterliegt einer strengen Kontrolle und wird von unterschiedlichen Mechanismen gesteuert (Abbildung 1). Eine Erhöhung der Kalziumruhekonzentration von 100 nM auf Konzentrationen, wie sie bei der Muskelkontraktion vorliegen ( $> 500$  nM) geschieht aus intra- und extrazellulären Speichern. Die intrazellulären Speicher befinden sich im endoplasmatischen Retikulum, die extrazellulären sind das Interstitium. Kalziumionen des Extrazellularraums gelangen über Ionenkanäle in das Zellinnere. Deren wichtigster Vertreter ist der spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanal, der bei zunehmender Depolarisation der Muskelzelle aktiviert wird.

Vier freie Kalziumionen binden an das zytoplasmatische Protein Calmodulin und bilden mit diesem zusammen den Kalzium-Calmodulin-Komplex, der die myosin light-chain kinase (MLCK) über die Calmodulin-abhängige Myosinkinase II (CaMKII) aktiviert. Diese phosphoryliert Serin 19 der leichten Myosinkette ( $MLC_{20}$ ) mit dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP (Pfeifer, Ruth et al. 1999; Feil, Lohmann et al. 2003). Durch reversible Bindung von Myosin an Aktin wird der Querbrückenmechanismus ausgelöst und es kommt unter ATP-Verbrauch zur Kontraktion (Sweeney, Yang et al. 1994).

Neben dieser kalziumabhängigen Aktivierung existieren noch weitere Aktivierungswege. Vasoaktive Substanzen, wie z.B. das Noradrenalin, binden und aktivieren membranständige G-Proteine (Bootman, Collins et al. 2001). Durch die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) am aktivierten Liganden  $G_{q/11}$  kommt es zur Freisetzung seiner  $\alpha$ -Untereinheiten. Diese  $\alpha$ -Untereinheiten stimulieren die membranständige Phospholipase C (PLC), die durch ihre hydrolytische Aktivität das Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) spaltet (Abbildung 1). Die Bindung von  $IP_3$  an den  $IP_3$ -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER) führt zur Kanalaktivierung mit Freisetzung von freiem Kalzium aus den Speichern des ER mit Erhöhung des zytosolischen Kalziums (Berridge 1993). Das ebenfalls freigesetzte DAG führt über die Aktivierung der Proteinkinase C selbst zu einer Muskelkontraktion (Rasmussen, Takuwa et al. 1987).

Die zweite Möglichkeit die Muskelkontraktion zu beeinflussen wird als Kalzium-Sensitivierung bezeichnet.

Die myosin light-chain phosphatase (MLCP), welche ab einer freien Kalziumkonzentration von unter 100 nM spontan aktiviert wird (Di Salvo, Gifford et al. 1983) dephosphoryliert die leichten Ketten (MLC<sub>20</sub>) und führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur.

Durch Hemmung der MLCP ist die Dephosphorylierung der aktivierten MLC-P unterbunden und es kommt bei konstanter Kalziumkonzentration durch vermutlich permanente Phosphorylierung der MLC zur Muskelkontraktion (Pfitzer 2001). Hierbei wird die Sensitivität der Signalwege auf eine bestehende Kalziumkonzentration verstärkt. Schlüsselenzym bei diesem Aktivierungsweg ist die zytosolische Rho-Kinase. Über Hormonbindung an die membranständigen und G<sub>12/13</sub>- (z.B. Thromboxan A2) und G<sub>q/11</sub>-gekoppelten (z.B. Vasopressin) Rezeptoren (Somlyo and Somlyo 2003) kommt es zur Aktivierung der Rho-guanine nucleotide exchange factors (Rho-GEFs), die über einen GDP–GTP-Tausch am RhoA/RhoGDI-Komplex die Rho-Kinase aktivieren. Diese aktivierte Rho-Kinase trägt durch Stimulation der MLCK zu einer verstärkten Vasokonstriktion bei (Fukata, Amano et al. 2001).

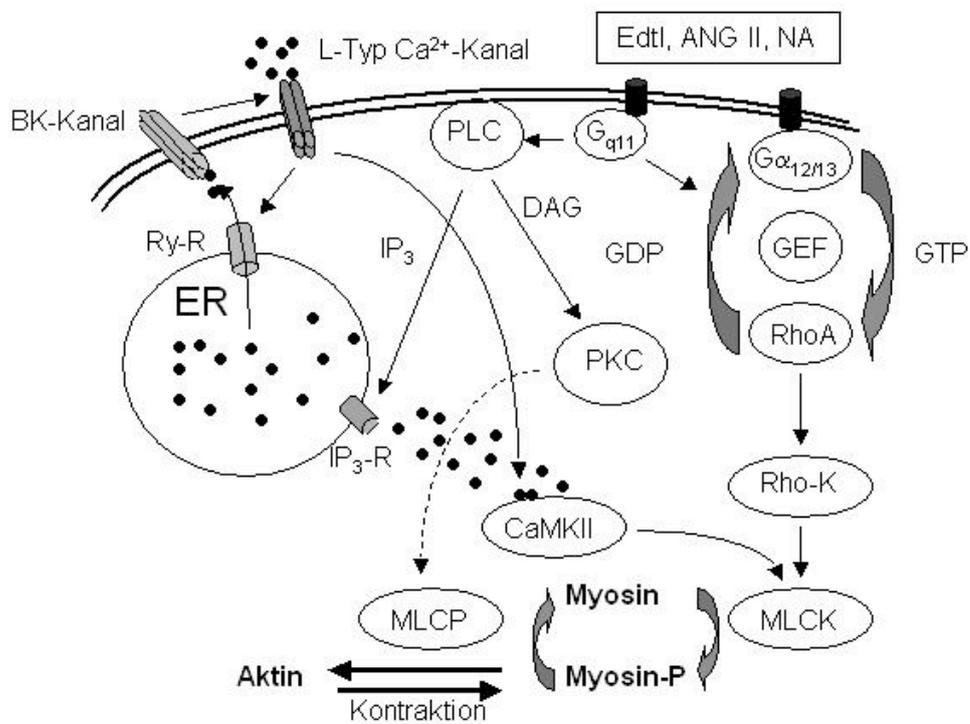
Eine Verstärkung der Muskelkontraktion wird also nicht alleinig durch die Aktivierung der MLCK bewirkt, sondern kann auch durch die Inaktivierung der MLCP hervorgerufen werden.

Es sind zwei Inaktivierungswege der MLCP bekannt, durch Rho-assoziierte Kinasen und durch die Proteinkinase C (PKC).

Bei den Rho-assoziierten Kinasen führt die rezeptorvermittelte Aktivierung von G-Proteinen mit nachfolgender Aktivierung der monomeren GTPase „Rho“ zu einer Freischaltung der Rho-Kinase. Diese Rho-Kinase hemmt die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der MLCP (Deng, Van Lierop et al. 2001; Pfitzer 2001).

Bei dem zweiten Inaktivierungsweg der MLCP durch PKC erfolgt über die Agonistenbindung an einem G-Protein gekoppelten Rezeptor die Aktivierung der Phospholipase C, welche für die Spaltung von PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG verantwortlich ist. DAG selbst aktiviert die Proteinkinase C (Itoh, Shimomura et al. 1993), die durch Phosphorylierung des Proteins CPI-17 am Threonin 38 zu dessen Aktivierung führt (Kitazawa, Eto et al. 2000). Aktiviertes Protein CPI-17 ist in der Lage durch Bindung an die regulatorische Einheit der MLCP diese zu hemmen und ebenso zu einer

Muskelkontraktion zu führen. Die Aktivierung der CPI-17 ist vermutlich neben der PKC auch durch weitere Kinasen möglich (Somlyo, Phelps et al. 2003).



**Abbildung 1: Darstellung der Signalkaskade zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei der Kontraktion glatter Muskelzellen.**

Kalziumionen sind durch kleine schwarze Punkte dargestellt ; Membranbilayer: Doppellinie; AngII : Angiotensin II; CaMKII : Calmodulin-abhängige Kinase II; Edtl : Endothelin; ER, endoplasmatisches Retikulum; DAG : Diacylglycerin; GEF : G-protein exchange factor; GDP/ GTP : Guanosindi-/triphosphat; IP<sub>3</sub> : Inositoltriphosphat; IP<sub>3</sub>-R : Inositoltriphosphat-Rezeptor; MLCK : myosin light-chain kinase; MLCP : myosin light-chain phosphatase; NA : Noradrenalin; PKC : Proteinkinase C; PLC : Phospholipase C; RhoA : G-Protein vom Typ A; Rho-K : Rhokinase;

### **1.3 Relaxation glatter Gefäßmuskulatur**

Der Muskeltonus in glatten Gefäßmuskelzellen wird unter anderem durch Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. NO vermindert über einen bisher nur unzureichend beschriebenen Signalmechanismus die intrazelluläre Kalziumkonzentration, was letztlich zu einer Gefäßrelaxation führt.

#### **1.3.1 Stickstoffmonoxid (NO) als endothelial-derived relaxing factor (EDRF)**

Im Jahre 1980 gelang Furchgott und Zawadzki der Nachweis, dass für die Vasodilatation nach Gabe von ATP, Acetylcholin oder Bradykinin noch eine weitere, vom Endothel selbst synthetisierte Substanz notwendig ist. Diese bezeichneten sie selbstbeschreibend als „endothelium-derived relaxing factor (EDRF)“ (Furchgott and Zawadzki 1980). Ferner wiesen Murad und Ignarro die vasodilatierende Eigenschaft von NO nach (Murad, Mittal et al. 1978; Ignarro, Wood et al. 1982).

Der endgültige Nachweis über die Äquivalenz von EDRF und NO wurde von der Arbeitsgruppe Palmer et al. 1987 erbracht (Palmer, Ferrige et al. 1987; Palmer, Ashton et al. 1988).

Das Gefäßendothel synthetisiert neben einer basalen NO-Konzentration auch NO als Antwort auf bestimmte physiologische Reize wie Serotonin, ADP, Thrombin, Scherkräfte und Veränderungen in der Sauerstoffspannung (Vanhoutte and Shimokawa 1989). Scherkräfte scheinen hierbei der stärkste Stimulus für die endotheliale NO-Produktion zu sein (Rubanyi, Romero et al. 1986).

Neben seiner gefäßrelaxierenden Wirkung vermindert NO die Thrombozytenaggregation (Azuma, Sekizaki et al. 1986), reduziert die Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel und hat einen negativen Einfluss auf die Proliferationsrate der Gefäßmuskulatur (Garg and Hassid 1989; Calderone, Thaik et al. 1998). Ferner hat NO Wirkung auf die Zelldifferenzierung (Morbidelli, Chang et al. 1996) und auf die Apoptose (Albina and Reichner 1995).

Im parasympatischen Anteil des Gastrointestinaltrakts ist NO als nicht-adrenerger, nicht-cholinerger Neurotransmitter für die reflektorische Erweiterung und Entleerung

des Magens bei Nahrungsaufnahme verantwortlich (Burnstock, Gannon et al. 1970; Bult, Boeckstaens et al. 1990).

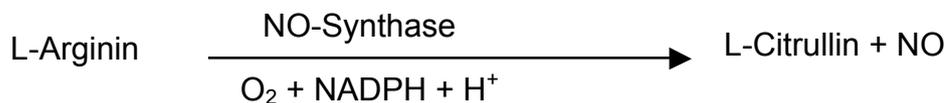
Seine Wirkung entfaltet NO auch im ZNS, wo es bei der langfristigen Modulation synaptischer Reize an komplexen Lern- und Gedächtnisleistungen (LTP und LTD) beteiligt ist (Yamada 1998).

In hohen Konzentrationen wirkt NO zytotoxisch.

Aufgrund seiner geringen Größe und seines lipophilen Charakters ist NO in der Lage frei durch Membranen zu diffundieren und dem Organismus zur endo- und parakrinen Autoregulation des Blutdrucks zu dienen. Seine vasodilatierende Wirkung entfaltet das NO sowohl in großen Arterien als auch im Bereich der Widerstandgefäße der Mikrozirkulation.

Die Bildung von NO geschieht im Körper durch die Gruppe der NO-Synthasen (NOS). Diese NOS kommen in drei Isoformen vor, der endothelialen NOS (eNOS), der neuronalen NOS (nNOS) und der induzierbaren NOS (iNOS) (Tabelle 1).

Durch Oxidation des Guanidinstickstoffs des L-Arginins wandelt die NOS diesen in Citrullin und in NO um (Ignarro, Wood et al. 1982; Loscalzo and Welch 1995).



Der Aufbau aller drei Isoformen der NOS mit einem Molekulargewicht zwischen 130 - 160 kDa ist ähnlich. Alle weisen am C-terminalen Ende eine Reduktaseaktivität und am N-terminalen Ende eine Oxygenaseaktivität auf (Liu and Gross 1996). Am C-terminalen Ende befinden sich Bindungsstellen für FAD, FMN und für NADPH. Im Gegensatz zur iNOS besitzen die eNOS und die nNOS eine hemmende FMN-bindende Sequenz (Salerno, Harris et al. 1997). Am N-terminus findet die Bindung von L-Arginin und von Tetrahydrobiopterin (THB) (White and Marletta 1992) statt. Verbunden sind die C- und N-terminalen Domänen über ein Calmodulin-bindendes Protein mit regulativen Eigenschaften für das Enzym. Bei Anstieg des intrazellulären Kalziums bildet sich der Kalzium-Calmodulin-Komplex aus, der an der NOS zu einer

Konformationsänderung führt. Das inhibitorische FMN wird verdrängt, die reduzierende C-terminale Domäne der NOS nähert sich der oxidierenden N-terminalen Domäne einer zweiten NOS an und es kommt zu einem Elektronenaustausch, der zur Bildung von NO und Citrullin führt (Lane and Gross 2000).

Die eNOS wird in endothelialen Gefäßzellen und Thrombozyten gebildet und ist sowohl für die basale als auch für die stimulierte NO-Synthese verantwortlich (Umans and Levi 1995). Das eNOS-Substrat Arginin wird in einer fünf Elektronen-Oxidation zusammen mit molekularem Sauerstoff an einer der beiden terminalen Guanidino-Stickstoff-Gruppen unter anderem in NO umgewandelt. NADPH fungiert hierbei als Kosubstrat, FAD, FMN, Häm, Calmodulin und THB als Kofaktoren. Dieses endotheliale Enzym bindet Calmodulin kalziumabhängig.

In niedriger Konzentration ist Kalzium für die basale NO-Synthese mitverantwortlich und kann in erhöhter intrazellulärer Konzentration die NO-Synthese steigern (Loeb, Izzo et al. 1988).

Die nNOS wird in hohen Konzentrationen besonders in neuronalen Zellen sowohl des zentralen als auch des peripheren Nervensystems gefunden (Bredt and Snyder 1992; Garthwaite and Boulton 1995). Die Aktivierung der nNOS über Calmodulin erfolgt in Gegenwart von Kalzium.

Im Gegensatz zur eNOs und zur nNOS kann die iNOS durch das Fehlen einer inhibitorischen Einheit nicht durch Kalzium aktiviert werden, sondern wird direkt nach der Synthese aktiv (Nathan and Xie 1994). Die Menge an produziertem NO ist daher nicht abhängig von Kofaktoren, sondern von der zur Verfügung stehenden Menge an mRNA.

Deshalb besteht eine zweite Einteilung der NOS in die Gruppe der induzierbaren NO-Synthasen (NOS II / iNOS), die als Antwort auf pathologische Stimuli exprimiert werden, und in die Gruppe der konstitutiven NO-Synthasen (NOS I+III / nNOS+eNOS), die unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden (Tabelle 2).

Die Induktion der iNOS-Synthese erfolgt durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und/oder durch bestimmte Zytokine (IL-1, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ), die LPS abhängig synthetisiert werden (Nathan and Xie 1994; Alderton, Cooper et al. 2001).

Gehemmt wird die iNOS-Synthese durch Glukokortikoide und durch bestimmte Zytokine (IL-4 und IL-10) und ist im Vergleich zu den kalziumabhängigen NOS-Formen von untergeordneter Bedeutung innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade (Radomski, Palmer et al. 1990).

Bisher wurden drei Regulationsmechanismen des Blutdrucks postuliert, an denen NO beteiligt ist. Die ADP-Ribosylierung von Proteinen, die Bildung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen und die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC), welche für die Konzentrationserhöhung des intrazellulären second messenger cGMP verantwortlich ist. Die cGMP-Konzentration hat durch ihre aktivierende Wirkung auf cyclic-nucleotide-gated cation channels (CNGs) im olfaktorischen und im optischen Sinnessystem eine große Bedeutung bei der Signalübertragung. Zellabhängig moduliert das cGMP durch seine Wirkung auf die cAMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE) die cAMP-Konzentration und aktiviert die cGK (Lohmann, Vaandrager et al. 1997; Pfeifer, Ruth et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit liegt das Augenmerk auf der Charakterisierung der NO vermittelten Aktivierung des BK-Kanals über das cGMP/cGK-System.

**Tabelle 1: Gegenüberstellung der NOS-Isoenzyme mit dem jeweiligen Regulierungsweg und seinem Vorkommen (Tonner and Scholz 1999)**

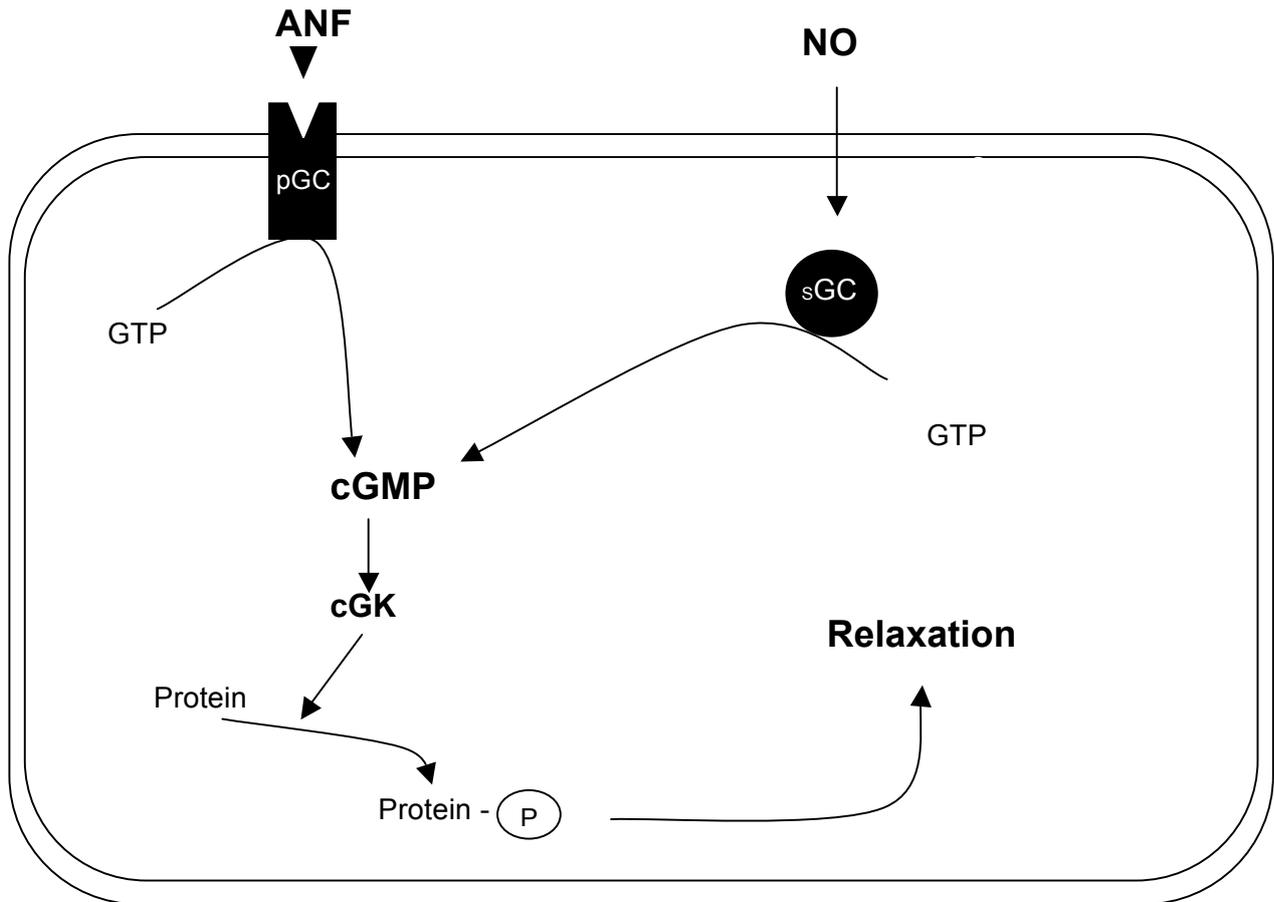
<b>Isoenzym</b>	<b>Andere Bezeichnung</b>	<b>Regulierung</b>	<b>Vorkommen</b>
NOS I	bNOS, nNOS	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin	Gehirn, periph. Neurone, Pankreas
NOS II	iNOS	Zytokin und Endotoxin induz. Expression	Makrophagen, Hepatozyten
NOS III	eNOS	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin	Endothelien, Niere, epitheliale Zellen

**Tabelle 2: Gegenüberstellung der konstitutiven und der induzierbaren NOS (Moncada, Palmer et al. 1991)**

<b>konstitutive NOS</b>	<b>induzierbare NOS</b>
Zytosol	Zytosol
NADPH-abhängig	NADPH-abhängig
Dioxygenase	Dioxygenase
Hemmung durch L-Arginin - Analoga	Hemmung durch L-Arginin – Analoga
Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin abhängig	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin unabhängig
Freisetzung von Picomol NO	Freisetzung von Nanomol NO
Kurzandauernde NO-Freisetzung	Langandauernde NO-Freisetzung
Glucocortikoid unabhängig	Hemmung der Induktion durch Glucocortikoide

### 1.3.2 cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

NO aktiviert die lösliche zytosolische Form der Guanylatcyclase (sGC) im Gefäßmuskel, welche die Umwandlung des inaktiven GTP in seine aktive und signalgebende Form, dem cyclischen GMP (cGMP), katalysiert (Murad, Mittal et al. 1978). Diese sGC besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten mit einer prosthetischen Häm-Gruppe, die für die Stimulation durch NO verantwortlich ist (Ignarro, Wood et al. 1982). Aktiviert wandelt die sGC etwa 200-fach schneller GTP in cGMP um als in ihrer inaktiven Form (Gerzer, Bohme et al. 1981) (Abbildung 2). Von der sGC sind vier Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) bekannt, wobei auf Proteinebene nur die Heterodimere  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  identifiziert wurden (Russwurm, Behrends et al. 1998). Neben der sGC existiert noch die membrangebundene partikuläre Guanylatcyclase (pGC). Von dieser sind drei Untereinheiten bekannt (pGC-A, pGC-B und pGC-C). Aktiviert wird die pGC nicht durch NO, sondern durch natriuretische Peptide (NP), die an die extrazelluläre Domäne der Cyclase binden (Chinkers and Garbers 1989). Durch atriale Volumenbelastung freigesetztes ANP stimuliert die renale GC-A mit konsekutiver Natriurese und Blutdruckregulation. Intestinale GC-C fördert nach Stimulation mit Guanylin die Flüssigkeitssekretion in den Dünndarm (Friebe and Koesling 2003; Kuhn 2003).



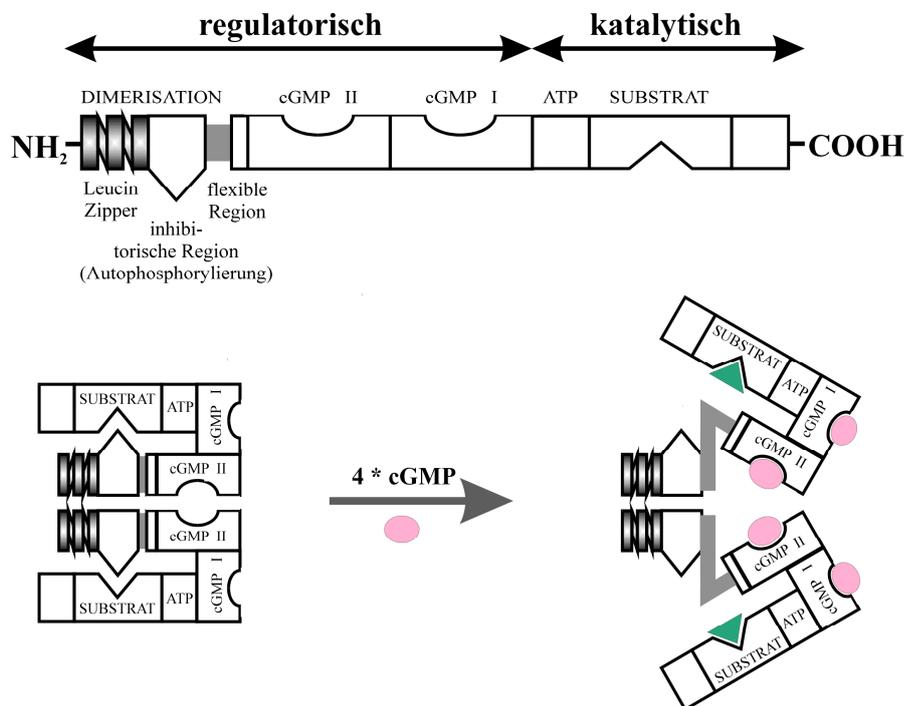
**Abbildung 2: schematische Darstellung der sGC vermittelten Muskelrelaxation;** Durch Erhöhung der zytosolischen Konzentration von cGMP erfolgt die Relaxation glatter Muskelzellen. ANF: natriuretischer Faktor; NO: Stickstoffmonoxid; sGC/ pGC: lösliche/ partikuläre Guanylatzyklase

### 1.3.2.1 Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK)

Man unterscheidet zwei Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), die zytosolische cGMP Kinase I (cGKI) und die membranständige cGMP Kinase II (cGKII) (Wernet, Flockerzi et al. 1989), welche durch N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert ist (Pfeifer, Ruth et al. 1999).

Die cGK ist ein Homodimer, dessen Untereinheiten ein Molekulargewicht von circa 78 kDa (cGK I) bzw. von circa 86 kDa (cGK II) aufweisen (Sandberg, Natarajan et al. 1989; Wernet, Flockerzi et al. 1989).

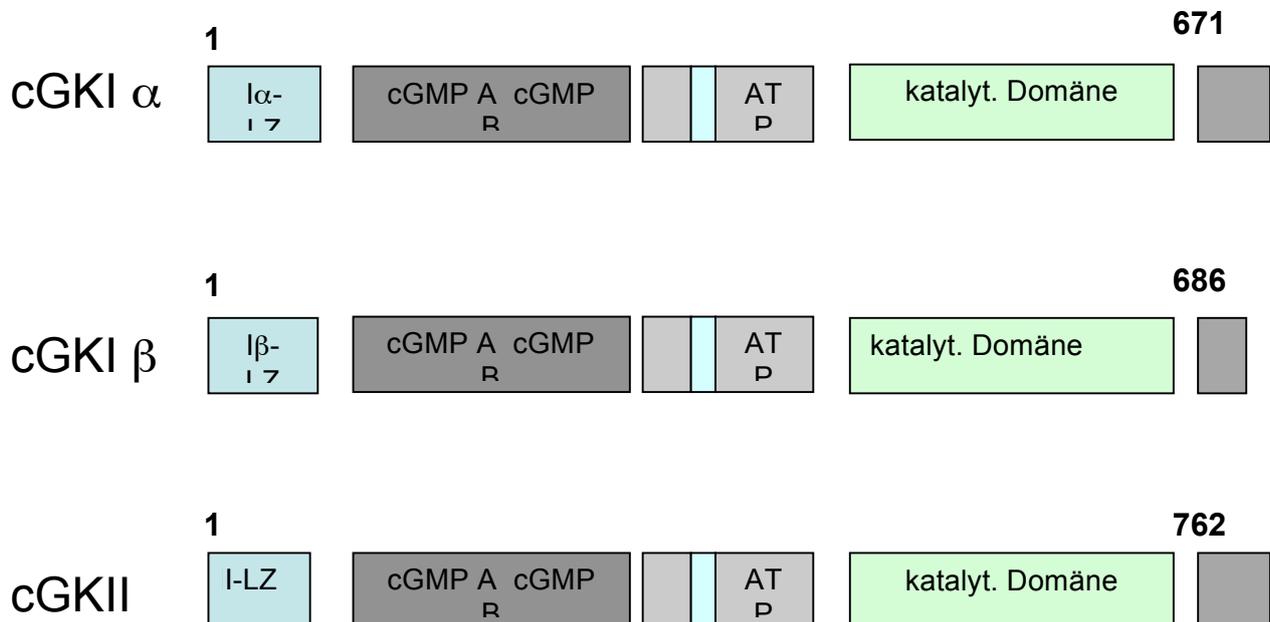
Die cGK gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und bestehen aus drei funktionellen Einheiten. Einer N-terminalen, einer regulatorischen und einer katalytischen Einheit (Pfeifer, Ruth et al. 1999). Die N-terminale Einheit ist für die Dimerisation, Aktivierung, Hemmung und Bindungsspezifität verantwortlich. In der regulatorischen Einheit befinden sich zwei cGMP-Bindungsstellen, Mitglieder der catabolite activator protein (CAP) – Familie, die durch cGMP-Anlagerung zur cGK-Aktivierung führen (Kuhn 2003). In Abwesenheit von cGMP wird die katalytische Einheit der cGKI durch eine autoinhibitorische Domäne, die zwischen der Dimerisierungsdomäne und den cGMP-Bindungsstellen liegt, blockiert. Durch Bindung von 2 cGMP an die cGMP-Bindungstaschen kommt es zu einer Autophosphorylierung des Thr59 (cGKI $\alpha$ ) bzw. des Ser64 und Ser80 (cGKI $\beta$ ) mit Konformationsänderung der cGKI (Abbildung 3). Die Autoinhibition ist damit aufgehoben und das Substrat kann mit der katalytischen Einheit interagieren und phosphoryliert werden (Pfeifer, Ruth et al. 1999; Hofmann 2005).



**Abbildung 3: Dreiteiliger Aufbau der cGKI:** Amino-Terminus, regulatorische und katalytische Einheit. Die cGKI liegt als Homodimer vor. Durch Bindung von 2 cGMP kommt es zur Konformationsänderung, wodurch die Autoinhibition aufgehoben und die Phosphorylierung eines Substrates (Dreieck) ermöglicht wird.

### 1.3.2.2 cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI)

Es wurden zwei unterschiedliche Gene identifiziert, welche die cGKI und die cGKII kodieren (Abbildung 4). Der Genlocus für die cGKI liegt auf dem Chromosom 10 in der p11.2-q11.2-Region und ist 100 kB lang. Zwei alternative splice Exons kodieren die beiden Isoformen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ , die sich nur in ihren ersten 89-104 N-terminalen Aminosäuren unterscheiden (Wernet, Flockerzi et al. 1989). Die cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  sind lösliche Enzyme, deren funktionelle Einheit jeweils im N-Terminus liegt (Lohmann, Vaandrager et al. 1997). Die Homologie dieses N-Terminus beträgt nur etwa 36% und ist für Dimerisierung, Aktivierung/Hemmung und Bindungsspezifität entscheidend (Francis and Corbin 1994). Die beide Untereinheiten sind über Leucin/Isoleucin-Zipper im N-Terminus miteinander verbunden (Landgraf, Hofmann et al. 1990; Ammendola, Geiselhoringer et al. 2001).



**Abbildung 4: schematische Darstellung der cGKI-Isoformen: cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und cGKII.**  
Zahlenangaben entsprechen den Aminosäuren, LZ: Leucin-Zipper

Konzentrationen der cGKI von  $>10\mu\text{M}$  kommen in glatten Muskelzellen, Kleinhirn, Hippocampus, Rückenmark, Ganglien, neuromuskulären Endplatten, Blutplättchen und Nierengefäßen vor. Niedrigere cGKI-Konzentrationen ließen sich im Gefäßendothel, Granulozyten, Chondrozyten und Osteoklasten nachweisen. In Lunge, Herz, Blutplättchen und Kleinhirn findet sich in hohen Konzentrationen hauptsächlich die cGKI $\alpha$ . In glatten Muskelzellen, einschließlich der Uterusmuskulatur, Gefäßen, dem Gastrointestinaltrakt und der Trachea finden sich beide Isoenzyme der cGKI (Keilbach, Ruth et al. 1992). Die Funktion der cGKI umfasst bei Thrombozyten die Aggregationshemmung (Horstrup, Jablonka et al. 1994; Massberg, Sausbier et al. 1999) und unterdrückt in glatten Muskelzellen die Dedifferenzierung und die Migration (Komalavilas, Shah et al. 1999).

Eine sehr wichtige Funktion scheint die cGKI bei der Blutdruckregulation einzunehmen, da cGKI defiziente Mäuse neben einer verkürzten Lebensdauer einen erhöhten Blutdruck aufwiesen (Pfeifer, Ruth et al. 1999).

### **1.3.2.3 cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII)**

Das Gen für die cGKII liegt auf dem Chromosom 4 in der Region q13.1-q21.1 (Orstavik, Solberg et al. 1996). Das Enzym ist, wie auch die cGKI, ein Homodimer (Gamm, Francis et al. 1995). Im Gegensatz zur cGKI ist die cGKII durch Myristoylation des N-terminalen Gly2-Restes (Lohmann, Vaandrager et al. 1997) membranständig. In hohen Konzentrationen findet sich die cGKII in der Lunge, bestimmten Hirnnervenkernen (z.B. Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus), Chondrozyten und der intestinalen Mukosa (Markert, Vaandrager et al. 1995; Lohmann, Vaandrager et al. 1997; Schlossmann and Hofmann 2005). Nur die cGKII vermag den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) durch Phosphorylierung zu aktivieren und besitzt dadurch Bedeutung in der intestinalen Wasser- und Chloridsekretion (Lohmann, Vaandrager et al. 1997). Bei cGKII-defizienten Mäusen fiel ein vermindertes Knochenwachstum auf, was den Einfluss der cGKII auf die enchondrale Ossifikation nahe legt (Miyazawa, Ogawa et al. 2002; Chikuda, Kugimiya et al. 2004). Ein weiteres Vorkommen der cGKII ist in der Niere, wo es an der Reninfreisetzung beteiligt ist (Wagner, Pfeifer et al. 1998).

#### 1.4 Muskelrelaxierendes System aus cGMP und cGKI

Die Muskelspannung wird zum einen durch den Anstieg und Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration geregelt, aber auch durch die Veränderung der Kalziumempfindlichkeit (Desensibilisierung) kontraktile Elemente. (Lee, Li et al. 1997). Die Muskel-Desensibilisierung gelingt über eine Aktivierung der MLCP oder über eine Inaktivierung der MLCK.

Die Erschlaffung glatter Muskulatur setzt eine intrazelluläre Verminderung des freien Kalziums voraus. Dies wird durch eine Erhöhung des zytosolischen cGMP bewirkt. Durch die cGK erfolgt eine Aktivierung der MLCP und der BK-Kanäle. Die cGK wirkt darüber hinaus hemmend auf  $IP_3$ -Rezeptoren und die RhoA (Schlossmann and Hofmann 2005), was einer vasorelaxierenden Funktion entspricht (Zhou, Schlossmann et al. 1998; Carvajal, Germain et al. 2000).

Die  $cGKI\alpha$  phosphoryliert die regulatorische Einheit MYPT1 der MLCP. Dies verhindert die weitere Phosphorylierung der MLC über die MLCK und führt zum Abbruch des Querbrückenzyklus (Wooldridge, MacDonald et al. 2004; Schlossmann and Hofmann 2005).

Durch die Phosphorylierung der Phospholipase  $C\beta_3$  beeinflusst die cGKI außerdem direkt die Synthese von  $IP_3$  (Xia, Bao et al. 2001; Schlossmann and Hofmann 2005). Regulators of G-protein signalling (RGS) sind Proteine, welche die G-Proteinaktivität erhöhen und dadurch die Halbwertszeit des am G-Protein gebundenen GTP verringern (Hepler 2003). Durch Phosphorylierung des RGS-2 durch die cGKI bindet das RGS-2 an das Gq-Protein und erhöht damit die Aktivität der GTPase (Tang, Wang et al. 2003; Schlossmann and Hofmann 2005).

Ein Herabsetzen der Sensitivität für Kalzium im glatten Muskel gelingt der cGKI durch die Phosphorylierung des GTP-bindenden Proteins Rho. Der durch GTP-Bindung gestörte GDP/GTP-Austausch inaktiviert die Rho-Kinase und hält die MLCP aktiv, was zu einer Muskelrelaxation führt (Abbildung 5) (Pfitzer 2001; Somlyo, Phelps et al. 2003).

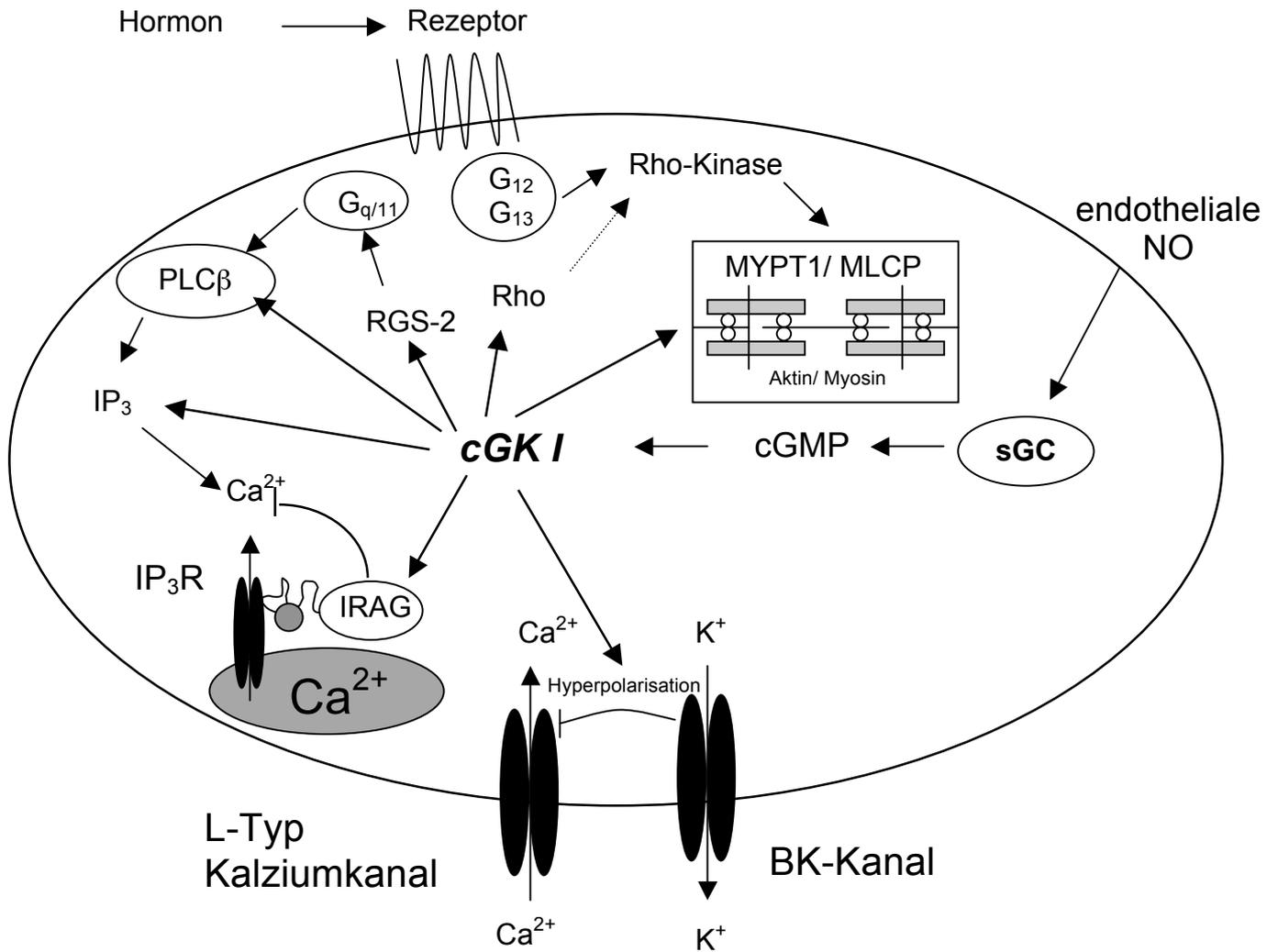
Einen weiteren Mechanismus zur Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration stellt die  $cGKI\beta$ -vermittelte Phosphorylierung des  $IP_3$ -Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrats (IRAG) dar.

Nach Phosphorylierung von IRAG durch cGKI $\beta$  (Keilbach, Ruth et al. 1992) kommt es zu einer Trimerbildung aus IRAG, IP $_3$ -Rezeptor Typ I und cGKI $\beta$  am ER. Die IP $_3$  induzierte intrazelluläre Kalziumfreisetzung wird durch die cGKI $\beta$ -abhängige Phosphorylierung von IRAG gehemmt (Schlossmann, Ammendola et al. 2000). Dies legt den Schluss nahe, dass in der NO/cGMP vermittelten Verminderung des intrazellulären Kalziums IRAG eine Schlüsselrolle spielt (Geiselhoring, Gaisa et al. 2004).

IRAG besteht aus den zwei Isoformen a und b und ist mit seinem C-terminalen Ende in der Membran des ER verankert.

Die 33 Aminosäuren lange N-terminale Bindungsstelle für die cGKI $\beta$  interagiert ausschließlich mit der Leucinezipper-Region der cGKI $\beta$ , nicht aber mit cGKI $\alpha$  oder cGKI $\gamma$ . Die Interaktionsstelle mit IP $_3$ -Rezeptor Typ I besteht aus einer zentral liegenden coiled-coiled Domäne (Ammendola, Geiselhoring et al. 2001). IRAG und cGKI $\beta$  kommen gemeinsam in glatten Muskelzellen der Aorta, der Blase, des Uterus und des Gastrointestinaltrakts, aber auch in nicht-muskulärem Gewebe wie Thrombozyten oder Thalamus vor (Geiselhoring, Gaisa et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Muskelrelaxation besteht in der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP. Ausgelöst wird die cAMP-Bildung durch Aktivierung der G $_s$ -gekoppelten Rezeptoren, die in ihrer aktivierten Form ihre  $\alpha$ -Untereinheiten freigeben. Diese  $\alpha$ -Untereinheiten regen nachfolgend die Adenylatzyklase zur cAMP-Bildung an. Die PKA aktiviert die Kalziumpumpe SERCA, eine energieabhängige membrangebundene Kalzium-ATPase (Juhaszova, Ambesi et al. 1994) am ER zur Kalziumaufnahme und inhibiert zugleich den negativen Regulator Phospholamban. Dies führt in der Zelle zu einem Absinken der Kalziumkonzentration. Liegt die intrazelluläre Konzentration an freiem Kalzium unter 1 $\mu$ M, so führt dies zur spontanen Dissoziation des Kalzium-Calmodulin-MLCK-Holoenzym und zur Inaktivierung der MLCK. Durch den Konzentrationsabfall von MLCK gegenüber der MLCP überwiegt die Dephosphorylierung der MLCK, so dass es zu einer Muskelrelaxation kommt.



**Abbildung 5: schematische Darstellung der cGKI vermittelten Muskelrelaxation; für Details siehe Text.**

## 1.5 Kaliumkanäle in Gefäßmuskelzellen

### 1.5.1 Bedeutung von Kaliumkanälen für das Membranpotential

Entscheidend für den Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum in glatte Muskelzellen der Widerstandsgefäße ist das Membranpotential. Durch eine Membrandepolarisation (z.B. durch alpha-adrenerge Agonisten oder Erhöhung des intravasalen Drucks) kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Somlyo, Phelps et al. 2003).

Das Membranpotential wird von den intra- und extrazellulären Konzentrationen aller anwesenden Ionen sowie der relativen Zellmembranpermeabilität bestimmt. Zur Berechnung dieses Membranpotentials wurde im Jahre 1949 von Goldmann, Hodgkin und Katz die gleichnamige Gleichung entwickelt.

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{(\sum P_A [A]_{\text{innen}} + \sum P_K [K]_{\text{außen}})}{(\sum P_A [A]_{\text{außen}} + \sum P_K [K]_{\text{innen}})}$$

**Abbildung 6: Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung zur Berechnung des Membranpotentials ( $E_m$ );  $R$ : allgemeine Gaskonstante;  $T$ : absolute Temperatur (Kelvin);  $F$ : Faradaysche Konstante; Konzentration der An-  $[A]$  und Kationen  $[K]$ ;  $P_A$ ,  $P_K$ : Permeabilität der An-/ Kationen**

Das Ruhemembranpotential wird im Wesentlichen durch die Verteilung von Kalium- und Chlorid-Ionen bestimmt, da die Membranpermeabilität für diese Ionen in Ruhe wesentlich höher ist als für andere Ionen. Aufgrund der physiologischen Kalium- und Chlorid-Ionenverteilung ( $[K^+]_i = 155\text{mM} > [K^+]_a = 4\text{mM}$ ;  $[Cl^-]_i = 4\text{mM} < [Cl^-]_a = 120\text{mM}$ ) in glatten Muskelzellen beträgt dort das Ruhemembranpotential etwa  $-60\text{mV}$ . Zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle ist eine Membrandepolarisation notwendig. Durch Erhöhung der Kaliumpermeabilität der Zellmembran kommt es zum

Kaliumausstrom mit einer Verschiebung des Membranpotentials in Richtung von etwa  $-90$  mV, dem Nernstpotential für Kalium. Als Antwort auf die Membrandepolarisation und um das Ruhemembranpotential wieder zu erlangen erfolgt die Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Diese spannungsabhängigen Kaliumkanäle stellen einen wichtigen Faktor zur Dämpfung der Zellerregung wie auch zum Erhalt des basalen myogenen Tonus dar (Jackson 2000).

### 1.5.2 Klassifikation und Struktur von Kaliumkanälen

In dieser Arbeit richtet sich das Hauptaugenmerk auf die Ionenkanalklasse der Kaliumkanäle, im Besonderen auf den BK-Kanal, einem kalziumabhängigen Kaliumkanal in glatten Gefäßmuskelzellen.

Kaliumkanäle können nach ihrem Aktivierungsmechanismus unterschieden werden in:

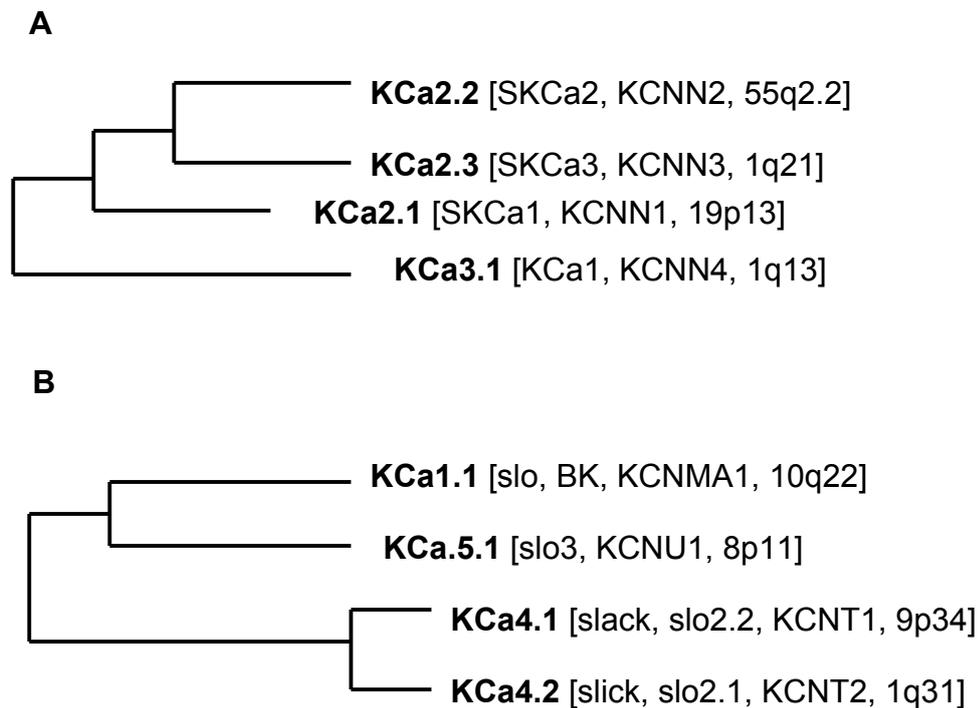
- spannungsabhängige Kaliumkanäle
- kalziumabhängige Kaliumkanäle
- G-Protein-aktivierte Kaliumkanäle
- mechanisch-aktivierte Kaliumkanäle
- ATP-sensitive Kaliumkanäle

Die Gruppe der kalziumabhängigen Kaliumkanäle ist sehr heterogen und wird, in Abhängigkeit von der Betrachtungsweise, unterschiedlich klassifiziert (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Klassifikation der kalziumabhängigen Kaliumkanäle nach IUPHAR, nach HGNC und weitere häufig benutzte Bezeichnungen; BK: big-conductance  $K^+$ -channel; SK: small-conductance  $K^+$ -channel; IK: intermediate-conductance  $K^+$ -channel.**

<b>IUPHAR</b>	<b>HGNC</b>	<b>sonstige Bezeichnungen</b>
K <sub>CA</sub> 1.1	KCNMA1	Slo, Slo1, BK
K <sub>CA</sub> 2.1	KCNN1	SK <sub>Ca</sub> 1
K <sub>CA</sub> 2.2	KCNN2	SK <sub>Ca</sub> 2
K <sub>CA</sub> 2.3	KCNN3	SK <sub>Ca</sub> 3
K <sub>CA</sub> 3.1	KCNN4	IK <sub>Ca</sub> 1
K <sub>CA</sub> 4.1	KCNT1	Slack, Slo2.2
K <sub>CA</sub> 4.2	KCNT2	Slick, Slo2.1
K <sub>CA</sub> 5.1	KCNU1	Slo3

Der Stammbaum (Abbildung 7) zeigt, dass die Gruppe der kalziumabhängigen Kaliumkanäle aus gut bekannten, aber nur entfernt verwandten Gruppen stammen.



**Abbildung 7: Phylogenesse kalziumabhängiger Kaliumkanäle: A:**  $K_{Ca}$  2/3-Gruppe, **B:**  $K_{Ca}$  1/4/5-Gruppe. Grundlage dieser Stammbäume ist sowohl die Analyse der jeweiligen Aminosäuresequenzen als auch die phylogenetische Analyse.

Im Stammbaum der in Abbildung 7A sind die drei „small conductance“ Kaliumkanäle enthalten wie auch der „intermediate-conductance“ Kaliumkanal 3.1. Diese Kanäle sind nicht spannungsabhängig und werden durch geringe intrazelluläre Konzentrationen an Kalzium ( $>1.0\mu\text{M}$ ) aktiviert. Im Gegensatz dazu ist der  $K_{Ca}$ 1.1-Kanal (KCNMA1, Slo1) sowohl spannungs- als auch kalziumabhängig.

Der in Abbildung 7B gezeigte Stammbaum zeigt das Verwandtschaftsverhältnis der zweiten Gruppe an kalziumabhängigen Kaliumkanälen auf, die aus dem  $K_{Ca}$ 1.1- (Slo oder Slo1 oder BK), dem  $K_{Ca}$ 4.1- (Slack oder Slo2.2), dem  $K_{Ca}$ 4.2- (Slick oder Slo2.1) und dem  $K_{Ca}$ 5.1-Kanal (Slo3) besteht.

$K_{Ca}$ 1.1 wurde ausführlich im Gehirn, der Cochlea und im Muskelgewebe untersucht. Anders als  $K_{Ca}$ 2- und  $K_{Ca}$ 3-Kanäle bindet bei dem  $K_{Ca}$ 1.1-Kanal das Kalzium unabhängig vom Calmodulin.

SK-Kanäle (geringe Kanalleitfähigkeit: 5 bis 10 pS) finden sich in erregbaren Neuronen und Skelettmuskelzellen und vermitteln ihre Kalziumsensitivität durch das ihnen assoziierte Calmodulin-Protein. Bisher sind drei Gene für SK-Kanäle identifiziert worden, die sich pharmakologisch durch ihre Sensitivität gegenüber dem Apamin unterscheiden lassen (Shah and Haylett 2000).

IK-Kanäle (intermediäre Kanalleitfähigkeit: 20 bis 40 pS) finden sich nur auf nicht-erregbaren Zellen wie Blutzellen, Epi- und Endothelzellen (Jensen, Strobaek et al. 2001), dienen der Volumenkontrolle und der Flüssigkeitssekretion und sind durch Charybdotoxin und Clotrimazol hemmbar.

BK-Kanäle besitzen von allen Kaliumkanälen die größte Leitfähigkeit (100 bis 250 pS) und werden als einzige Kaliumkanäle sowohl durch die Kalziumkonzentration als auch durch eine Depolarisation aktiviert. Sie kommen in nahezu allen erregbaren Zellen vor, ausgenommen dem Myokard. Ähnlich wie die SK-Kanäle werden sie durch Charybdotoxin gehemmt, spezifisch aber durch Iberiotoxin. Tetraethylammonium- (TEA) und Bariumionen hemmen die BK-Kanäle dagegen unspezifisch.

### 1.5.3 Kalziumaktivierter BK-Kanal

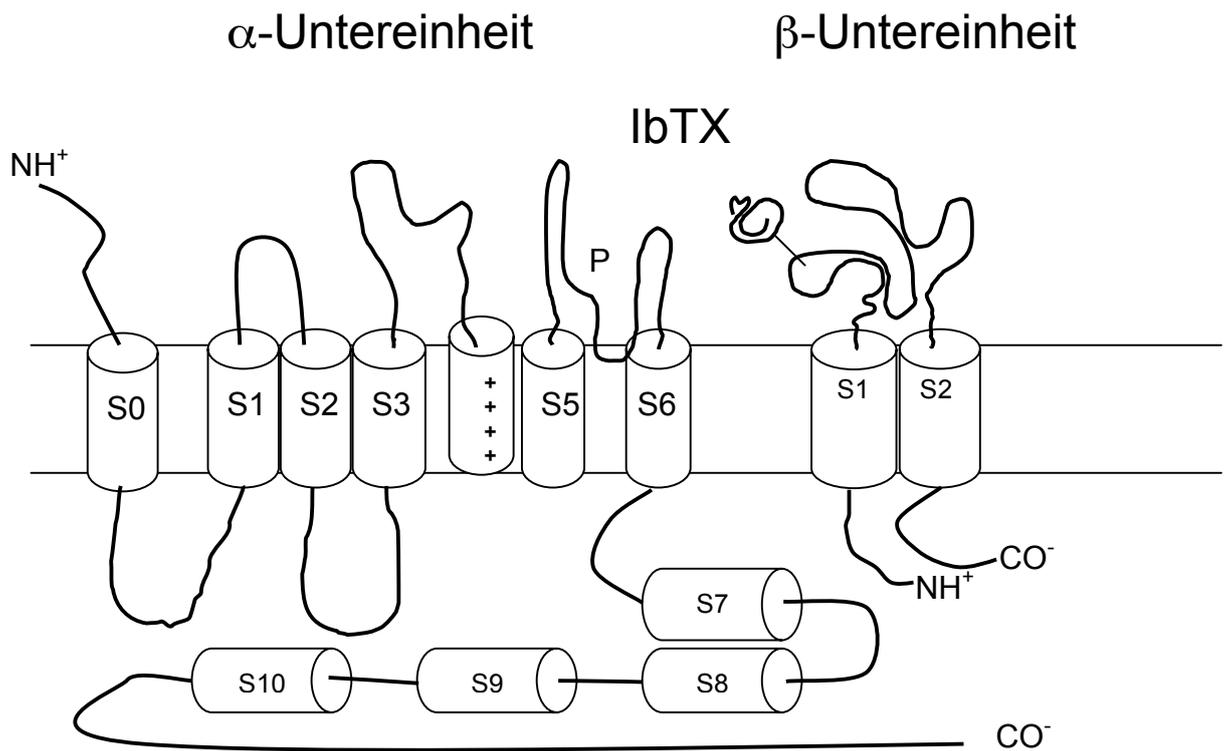
Der BK-Kanal ist ein Proteintetramer. Jedes seiner vier Monomere setzt sich aus einem  $\alpha$ -Protein und einem  $\beta$ -Protein zusammen, deren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten über das S0-Segment assoziiert sein können (Abbildung 8) (Shen, Lagrutta et al. 1994).

Das  $\alpha$ -Protein besteht aus 3582 bp, mit einem Molekulargewicht von 125 kDa und lässt sich in sieben Transmembrandomänen, S0–S6, gruppieren. Das C-terminale Ende des Proteinstranges liegt im Cytosol, das N-terminale Ende befindet sich extrazellulär. Dieser Proteinstrang durchzieht insgesamt die Zellmembran siebenmal. Acht negativ geladene Glutamatreste befinden sich am inneren Porenring des BK-Kanals. Sie können mit Kaliumionen in eine elektrostatische Wechselwirkung treten und verursachen so etwa eine Verdoppelung der Leitfähigkeit des BK-Kanals (Brelidze, Niu et al. 2003). Die Porenauskleidung besteht aus einer kaliumselektiven

Proteineinstülpung in die Membran, die zwischen den Domänen S5 und S6 liegt (Heginbotham, Lu et al. 1994). Als Spannungssensor wurde das S4-Segment mit seiner charakteristischen Transmembranstruktur, die an jeder dritten Stelle der Helix ein Arginin aufweist, identifiziert. Es wird vermutet, dass es bei Potentialänderungen zu einer Rotation des S4-Segmentes kommt und eine Porenöffnung verursacht (Jiang, Ruta et al. 2003). Die intrazellulär gelegenen Carboxylgruppe der Kanaluntereinheit umfasst etwa 60% des Kanalproteins und besteht aus einem membranahen Teil, der vier hydrophobe Domänen, S7 bis S10, umfasst und einem ungeordneten membranfernen Anteil. Als „calcium bowl“ bezeichnet man zwei hoch affine Kalziumbindungsstellen in den Domänen S9 und S10, die etwa die Hälfte des Kalziums binden, das mit dem Kanal interagiert (Schreiber, Yuan et al. 1999; Bian, Favre et al. 2001). Der membranahen Anteil des C-terminalen Endes bildet den Kanaleingang. In diesem Bereich befindet sich eine Struktur, die als regulators of  $K^+$  conductance (RCK-) Domäne bezeichnet wird und die jeweils zweimal pro  $\alpha$ -Untereinheit vorkommt (nicht abgebildet) (Jiang, Lee et al. 2002;). Diese RCK-Domäne kann jeweils ein Kalziumion binden. Nach Bindung von insgesamt acht Kalziumionen findet durch rotatorische Drehung des Kanals im unteren Teil eine Öffnung statt. Durch diese Öffnung wird die Energiebarriere für den Durchtritt von Kaliumionen durch den BK-Kanal erniedrigt (Orio, Rojas et al. 2002).

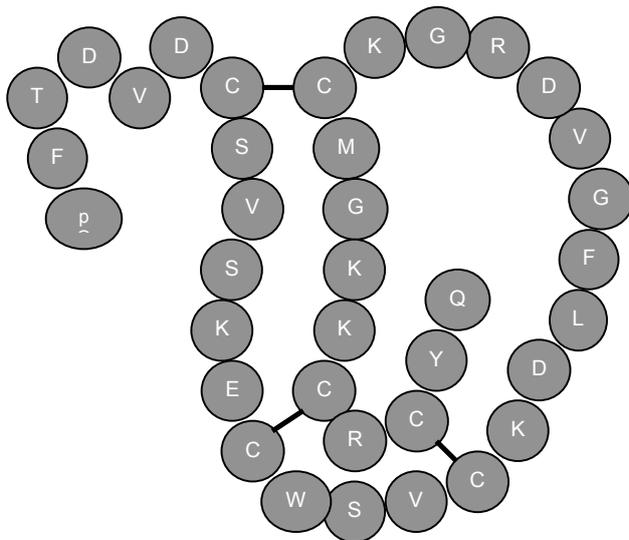
Weniger ist über die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit bekannt, die modulierend auf die  $\alpha$ -Untereinheit und somit auf den BK-Kanal wirkt. Mit ihren beiden Segmenten S1 und S2 durchzieht sie die Zellmembran, wobei sich ihr N- und C-Terminus jeweils intrazellulär befindet. Bisher wurden vier unterschiedliche  $\beta$ -Untereinheiten (1 bis 4) identifiziert (Brenner, Perez et al. 2000). In der glatten Gefäßmuskulatur kommt fast ausschließlich die  $\beta_1$ -Untereinheit vor. Über einen bisher unbekanntem Mechanismus hat sie sowohl positive als auch negative Wirkung auf die Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals, wobei die intrazelluläre Konzentration an Kalziumionen als Schlüssel für die Wirkung der  $\beta_1$ -Untereinheit am  $\alpha$ -Protein dient. (Alioua, Tanaka et al. 1998; Jiang, Wallner et al. 1999). Ebenfalls über die  $\beta_1$ -Untereinheit wirken die BK-Kanalblocker Iberiotoxin und Charybdotoxin (Giangiacomo, Fremont et al. 2000).

Die  $\beta_2$ -Untereinheit wurde in neuronalen und chromaffinen Zellen gefunden und bewirkt zusammen mit der  $\alpha$ -Untereinheit eine schnelle Inaktivierung des BK-Kanals (Xia, Ding et al. 1999), selbige Wirkung hat die  $\beta_3$ - und die  $\beta_4$ -Untereinheit auf den BK-Kanal (Brenner, Perez et al. 2000).



**Abbildung 8: schematischer Aufbau der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit des BK-Kanals.** Je eine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des BK-Kanals, die der Übersichtlichkeit wegen plan dargestellt wurden. Am S1-Segment der  $\beta$ -Untereinheit bindet der selektive BK-Kanalblocker Iberitoxin (IbTx) (Kaczorowski 1996)

Iberitoxin (IbTX) ist ein selektiver Blocker des BK Kanals und stammt aus dem Gift des Scorpions *Buthus tamulus*. IbTX ist ein Peptid aus 37 Aminosäuren mit einer hohen Anzahl an sauren Aminosäuren (Abbildung 9) (Galvez, Gimenez-Gallego et al. 1990). Besonders durch die Aminosäuren Arg<sub>25</sub>, Lys<sub>27</sub>, Arg<sub>34</sub> findet die Bindung des IbTX an der extrazellulären Matrix der  $\beta$ -Untereinheit des BK-Kanals statt. Das gebundene IbTX verlegt die Kaliumpore und verhindert dadurch den Durchtritt von Kaliumionen durch den Kanal (Abbildung 8) (Candia, Garcia et al. 1992).



**Abbildung 9: Struktur des selektiven BK-Kanalblockers Iberiotoxin (Kaczorowski, 1996)**

#### 1.5.4 Regulation des BK-Kanals und STOCs

Durch Aktivierung Ryanodin-sensitiver Kalzium-Kanäle (Ryr) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) kommt es zur Freisetzung von Kalzium in das Zytoplasma. Diese Ryr-Kanäle finden sich ausschließlich in dem SR, das sich direkt unter der Zellmembran glatter Muskelzellen befindet. Ihre Aktivierung führt zu einem spontanen und transienten Anstieg des intrazellulären Kalziums, den sog. Kalzium-Sparks und wird als calcium-induced calcium release (CICR) bezeichnet. Kalzium-Sparks aktivieren benachbarte BK-Kanäle und führen zur Bildung sog. STOCs, spontanen, transienten Kalium-Auswärtsströmen. Eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen ist die Folge (Nelson et al. 1995; Fay 1995).

Drei Isoformen des Ryanodinrezeptors (Ryr1-3) sind bekannt. Die Isoform Ryr1 findet sich im Skelettmuskel und die Isoform Ryr3 im Herzmuskel. Funktionell eng gekoppelt mit den BK-Kanälen in glatten Muskelzellen sind Ryr1 und Ryr2 (Herrera and Nelson 2002). Für die Kopplung von Ryr1 und Ryr2 an den BK-Kanal ist die muskelspezifische  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals verantwortlich (Brenner, Perez et

al. 2000). Der BK-Kanal spielt in der negativen, kalziuminduzierten Rückkopplung eine bedeutende Rolle und unterliegt den Regulationsmechanismen der PKA, cGK und PKC und den zentralen Signalkaskaden cGMP, cAMP und IP<sub>3</sub>.

Durch Erhöhung der Kalziumsensitivität des BK-Kanals gelingt es der PKA (Sadoshima, Akaike et al. 1988) und der cGK (Taniguchi, Furukawa et al. 1993) die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ohne Einfluss auf seine Leitfähigkeit und Potentialabhängigkeit zu bewirken (Brenner, Perez et al. 2000). Beiden Kinasen phosphorylieren hierbei die Serine am 3'-Ende der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals (Alioua, Tanaka et al. 1998). Im Gegensatz dazu inhibiert die PKC Kaliumströme durch den BK-Kanal (Minami, Fukuzawa et al. 1993), indem es Serine, die benachbart zu den Serinen am 3'-Ende der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals liegen, phosphoryliert und damit die Phosphorylierung durch PKA und cGK verhindert (Zhou, Arntz et al. 2001).

Ein weiterer Weg um die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu vermindern besteht in einer Aktivierung des BK-Kanals. (Fukao, Mason et al. 1999). Der Kaliumausstrom führt zu einer Hyperpolarisation, die für die Inaktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle in der Zellmembran verantwortlich ist und zu einem verringerten Kalziumeinstrom führt. Die Muskelrelaxation ist die Folge (Fukao, Mason et al. 1999; Pfeifer, Ruth et al. 1999).

Es ist bisher ungeklärt, ob der BK-Kanal direkt durch NO aktiviert werden kann oder ob zur Aktivierung des Kanals eine Phosphorylierung durch die cGKI erforderlich ist. Diese Frage soll anhand der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

## 2 Fragestellung

Damit hoch effiziente und hoch selektive Medikamente gegen den Hypertonus entwickelt werden können, ist ein genaues Verständnis der Regulationsmechanismen des Blutdrucks erforderlich. Der BK-Kanal steht durch seine in vivo und in vitro relaxierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen im Fokus für die Entwicklung neuer und innovativer antihypertensiver Therapien. Durch seine beiden Untereinheiten bietet er prinzipiell zwei mögliche Angriffspunkte für medikamentöse Interventionen. Besonders die gewebsspezifische und kanalaktivierende  $\beta_1$ -Untereinheit bietet eine vielversprechend Zielstruktur.

Als eines der am stärksten und am schnellsten wirkenden Vasorelaxantien ist das NO bekannt. Es ist außerdem gezeigt, dass NO den BK-Kanal aktivieren kann. Unbekannt ist, in welcher Weise dies geschieht. Kann NO den BK-Kanal direkt aktivieren (Bolotina, Najibi, et al. 1994) oder ist dazu das cGMP/cGKI-System als second messenger erforderlich? Diese Fragestellung sollte mit Hilfe eines Mausmodells geklärt werden, in dem das Gen inaktiviert wurde, das im glatten Muskel die cGKI exprimiert.

Mittels elektrophysiologischer Untersuchungsmethodik sollte eine komparative Analyse der Funktion und Regulation von BK-Kanälen in Wildtyp- und cGKI-defizienten Mäusen durchgeführt werden. Zunächst sollten dazu die BK-Kanalströme in Gefäßmuskelzellen vom Wildtyp und cGKI-Nullmutante elektrophysiologisch und pharmakologisch grundcharakterisiert werden. Danach sollte die Wirkung von NO auf die Aktivität von BK-Kanälen in Gefäßmuskelzellen beider Genotypen untersucht werden. Letztlich sollte geprüft werden, ob die Rekonstitution des cGMP/cGKI Signalwegs in Nullmutanten die Aktivität des Kanals beeinflusst.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Mäuse**

cGKI<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden von Alexander Pfeifer (Pfeifer, Klatt et al. 1998) generiert. Gezüchtet und gehalten wurden die Mäuse im Tierhaus des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München. Für die Untersuchungen wurden 3 bis 8 Wochen alte Wildtyp und cGKI<sup>-/-</sup>-Mäuse vor dem genetischen Hintergrund SV 129 verwendet. Diese Mäuse waren entweder Geschwister oder gleichaltrige Tiere aus verschiedenen Würfen.

Alle experimentellen Untersuchungen an den Tieren waren von der Tierschutzbehörde unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt.

### **3.2 Genotypisierung der gezüchteten Mäuse mittels PCR**

Der cGKI-Mutationsnachweis und der Nachweis des Wildtyp-Allels bei den Mäusen wurde anhand des von Dr. Pfeifer entwickelten PCR-Protokolls vorgenommen, das im Rahmen der Genotypisierung der verwendeten Mäuse routinemäßig angewendet wurde. Hierbei wurde als Material ein 2-3 mm langes Schwanzstück der Maus verwendet. Die Isolierung der Nukleinsäure aus dem Probenmaterial erfolgte mittels Gewebe-Lysepuffer (Boehringer Mannheim) in Gegenwart von Proteinkinase K (20 mg/ml, Boehringer Mannheim). Die Isolierung und Reinigung der Mäuse-DNA erfolgte ebenfalls mit einem Kit der Firma Boehringer Mannheim. Die Amplifikation der jeweiligen DNA wurde mittels PCR durchgeführt.

### 3.3 Präparation von Myozyten der Mäuseaorta

Mit Diethylether narkotisierten Mäusen wurde das Genick gebrochen und anschließend scharf Thorax und das Abdomen eröffnet. Makroskopisch wurde die Aorta von der linken Herzkammer abgetrennt und bis zur Aorta abdominalis präpariert. Die freigelegte Aorta wurde in eisgekühlter Präparationslösung (siehe 3.4.1) unter einem Stereomikroskop vom umgebenden Bindegewebe befreit und anschließend in circa 2–4 mm große Stücke fragmentiert. Die etwa 8 bis 12 Gewebestücke wurden aus der eisgekühlten Präparationslösung in 4 ml der auf 37°C vorgewärmte enzymatische Verdauungslösung A (siehe 3.4.2) überführt und für 25 Minuten darin belassen. Anschließend wurde das Gewebe aus Lösung A in 3 ml der auf 37°C vorgewärmten Verdauungslösung B (siehe 3.4.2) überführt und für 15 Minuten darin belassen. Nach 40 Minuten wurden zur Beendigung der enzymatischen Reaktion die Gewebestücke in 20 ml der eisgekühlten Präparationslösung überführt und mittels Pipette fragmentiert. Nach einer 30-minütigen Ruhephase in der eisgekühlten Präparationslösung wurde 1 ml der Zelllösung in die Messkammer überführt und erneut für weitere 30 Minuten belassen, damit die einzelnen aus dem Zellverband ausgelösten glatten Muskelzellen auf dem Boden der Messkammer adhärenz werden konnten. Im Anschluss wurde die Messkammer mit auf Raumtemperatur erwärmter kalziumfreier Präparationslösung gespült, so dass nur die adhärenz glatten Muskelzellen in der Kammer verblieben.

### 3.4 Reagenzien

#### 3.4.1 Präparationslösung

Präparationslösung		Konz. in mmol/L
	Glukose	1,0
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,0
	CaCl <sub>2</sub>	1,8
	KCl	5,6
	NaCl	140
	HEPES	10

#### 3.4.2 Verdaulösung

		Konz. in mg/ml Aqua bidest.
<b>Lösung A (4ml)</b>	Albumin	1,0
	DTT	1,0
	Papain	0,7
<b>Lösung B (3ml)</b>	Albumin	0,7
	CaCl <sub>2</sub>	0,1 mmol/L
	Kollagen H	0,45
	Kollagen F	1,05

### **3.5 Elektrophysiologie**

Die Zellmembran ist eine für Ionen impermeable Lipiddoppelschicht, in der Ionenkanäle enthalten sind. Diese Kanäle ermöglichen es den Ionen, sich passiv entsprechend ihrer jeweiligen intra- und extrazellulären Konzentration und ihres elektrischen Gradienten zu verteilen. Beim Ruhepotential fließt keine Nettoladung durch die Zellmembran, da sich die Ladungen aller Ionen gegenseitig aufheben.

Die Öffnung eines Ionenkanals erfolgt mit kanalspezifischer Leitfähigkeit nach dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip, die Offenwahrscheinlichkeit entspricht einer Boltzmannverteilung.

#### **3.5.1 Patch-clamp-Technik**

Mittels der von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten patch-clamp-Technik (Neher and Sakmann 1976) ist es möglich, Ionenströme im Nano- und Picoamperebereich über Zellmembranen und sogar durch einzelne Ionenkanäle hindurch bestimmen zu können.

Voraussetzung für solche Messungen ist ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Dies wird dadurch erreicht, dass mit Salzlösung gefüllte Glaspipetten mit der Zellmembran einen hochohmigen Kontakt (Gigaseal) bilden. Eine fein ausgezogene und hitzepolierte Glas-Mikropipette (Innendurchmesser circa 1 Mikrometer) wird unter mikroskopischer Kontrolle auf der Zelloberfläche aufgesetzt und „verschmilzt“ mit der Zellmembran.

### **3.5.2 Patch-clamp-Messung**

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die inside-out Konfiguration zur Registrierung von Einzelkanälen sowie die whole-cell Konfiguration zur Ganzzellstrommessung angewandt.

#### **3.5.2.1 Inside-out-Konfiguration**

Nach Bildung eines Seals auf der adhärennten Muskelzelle in der Messkammer wird die Pipette mitsamt des Membranflecks aus der Zelle herausgerissen. Bei dieser Konfiguration befindet sich der ursprünglich intrazelluläre Membrananteil in der Badlösung und enthält neben integralen Proteinen ebenso Strukturen, die an der Membraninnenseite anhaften, wie Signaltransduktionsproteine, Zytoskelettstrukturen und Organellen.

Voraussetzung für das Herausreißen des Patches ist das gute Anhaften der Zelle am Boden. Ist die Adhäsion der Zelle nicht ausreichend, so können Poly-L-Lysin-beschichtete Böden diese verbessern.

Durch das Herausreißen des Patches waschen sich alle nicht mit der Membran verankerten Bestandteile des Zytoplasmas wie sGC, ATP, IP<sub>3</sub> aus, was unabhängig vom Aktivierungsgrad des Ionenkanals zu einem run-down-Effekt führt und die gemessenen Ströme während der Messung immer kleiner werden lässt.

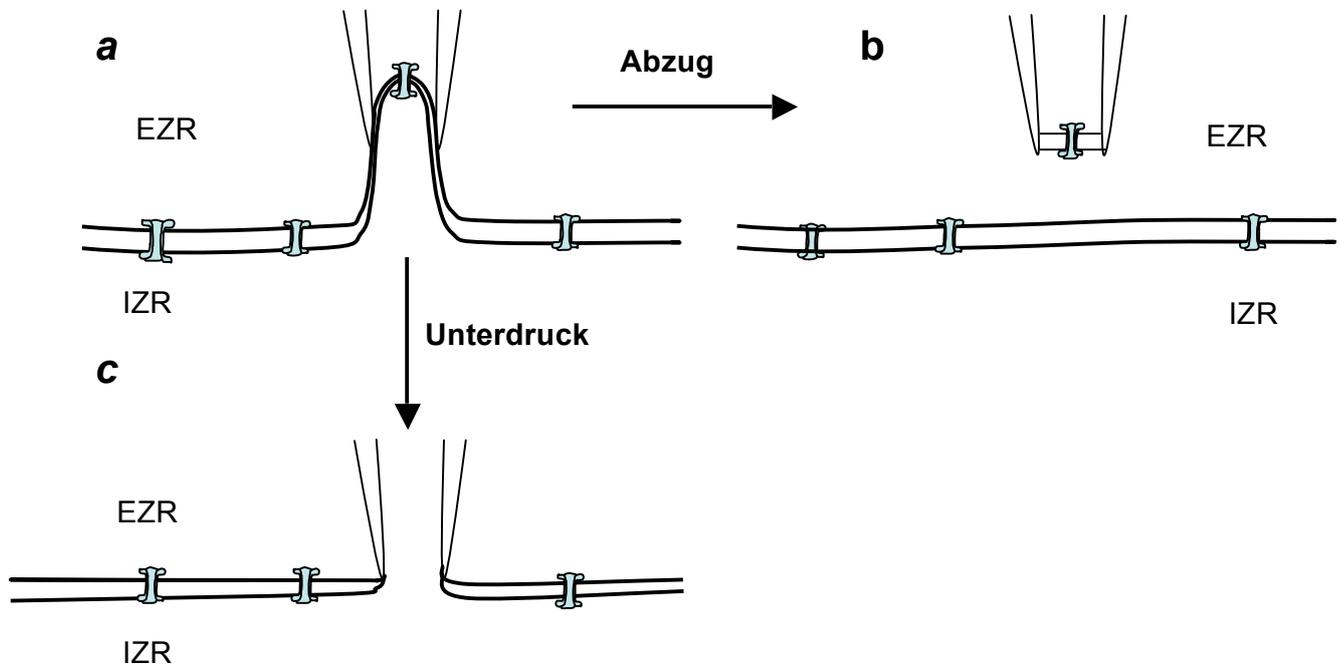
#### **3.5.2.2 Whole-cell-Konfiguration**

Nach Bildung eines Gigaseals erfolgt die Anlage leichter Unterdruckpulse in der Pipette. Dieser Unterdruck öffnet die Membran und es entsteht eine Verbindung zwischen Zellplasma und Pipetteninhalt. In dieser Messanordnung wird die gemittelte simultane Aktivität der Ionenkanäle der Zelle gemessen. Nach einer kurzen Äquilibrierungszeit von einigen Sekunden bis Minuten hat sich der Pipetteninhalt mit

dem Zellinhalt vermischt. Da das Volumen der Pipette deutlich größer ist als das der Zelle, bleibt der Inhalt und die Konzentration in der Pipette nahezu unverändert, wohingegen sich der Zellinhalt dem der Pipette angleicht.

Ein großer Vorteil dieser Messanordnung liegt darin, dass die Komposition des intrazellulären Milieus kontrolliert werden kann, d.h. sogar bestimmte Stoffe in die Zelle eingebracht werden können. Dies impliziert aber gleichzeitig, dass durch die Eröffnung der Zelle eine Verdünnung und ein Austausch ihrer natürlichen Inhaltsstoffe wie sekundäre Messenger (z.B. cAMP und  $IP_3$ ) oder Signalproteine mit geringem Molekulargewicht möglich ist.

In der Praxis wird nach Erreichen der cell-attached-Konfiguration ein negatives Haltepotential (= Ruhepotential der Zelle), angelegt, ehe mittels Unterdruck die Zellmembran aufgebrochen wird.



**Abbildung 10: schematische Darstellung von patch-clamp-Konfigurationen.**

**a:** Seal-Bildung: Ausgangsposition für weitere Messkonfigurationen ist das Verschmelzen der Messpipette mit der Zellmembran.

**b:** inside-out-Konfiguration: durch Herausreißen des patches aus der Zellmembran gelangt der isolierte Membranfleck mit seiner zyttoplasmatischen Seite mit der Badlösung in Kontakt.

**c:** whole-cell-Konfiguration: ausgehend von der cell-attached-Konfiguration wird ein leichter Unterdruck innerhalb der Pipette derart angelegt, dass der patch aufgebrochen wird. Es entsteht ein direkter Kontakt zwischen Intrazellulärraum und Pipetteninhalt.

### 3.5.3 Aufbau des patch-clamp-Messplatzes

Das gesamte Setup mit Mikroskop, Messkammer und Vorverstärker befindet sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der innerhalb eines Faraday-Käfigs steht.

In der Mitte des Messplatzes steht das Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) mit Objektiven von 10- bis 40-facher Vergrößerung und einer 0,6- bis 12,5-fachen Okularvergrößerung. In der Mitte des Mikroskoptisches befindet sich eine muldenförmige Vertiefung für die Verankerung der Messkammer. Weiterhin befindet sich jeweils seitlich an der Messkammer ein Zu- und ein Ablauf sowie eine Badelektrode. Aus alternativ wählbaren Behältern ist ein Fluten der Messkammer mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von etwa 12,5 ml/min möglich. Das Absaugen der Messkammer geschieht über ein zentrales Unterdrucksystem. Die Messpipette befindet sich seitlich der Messkammer an einem Mikromanipulator. Über den Pipettenhalter lässt sich in der Pipette ein Unter- bzw. Überdruck anlegen. Eine Ag/AgCl-Elektrode in der Messpipette stellt die elektrische Verbindung zwischen Pipette und dem Vorverstärker her. Das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen führt zu einem Stromfluss und einem damit verbundenen Spannungsabfall am hochohmigen invertierten Eingang. Messdaten, die den Verstärker verlassen, können direkt auf dem Monitor betrachtet und gespeichert werden (Software: HEKA Pulse and Pulsefit).

### 3.6 Messvorbereitungen

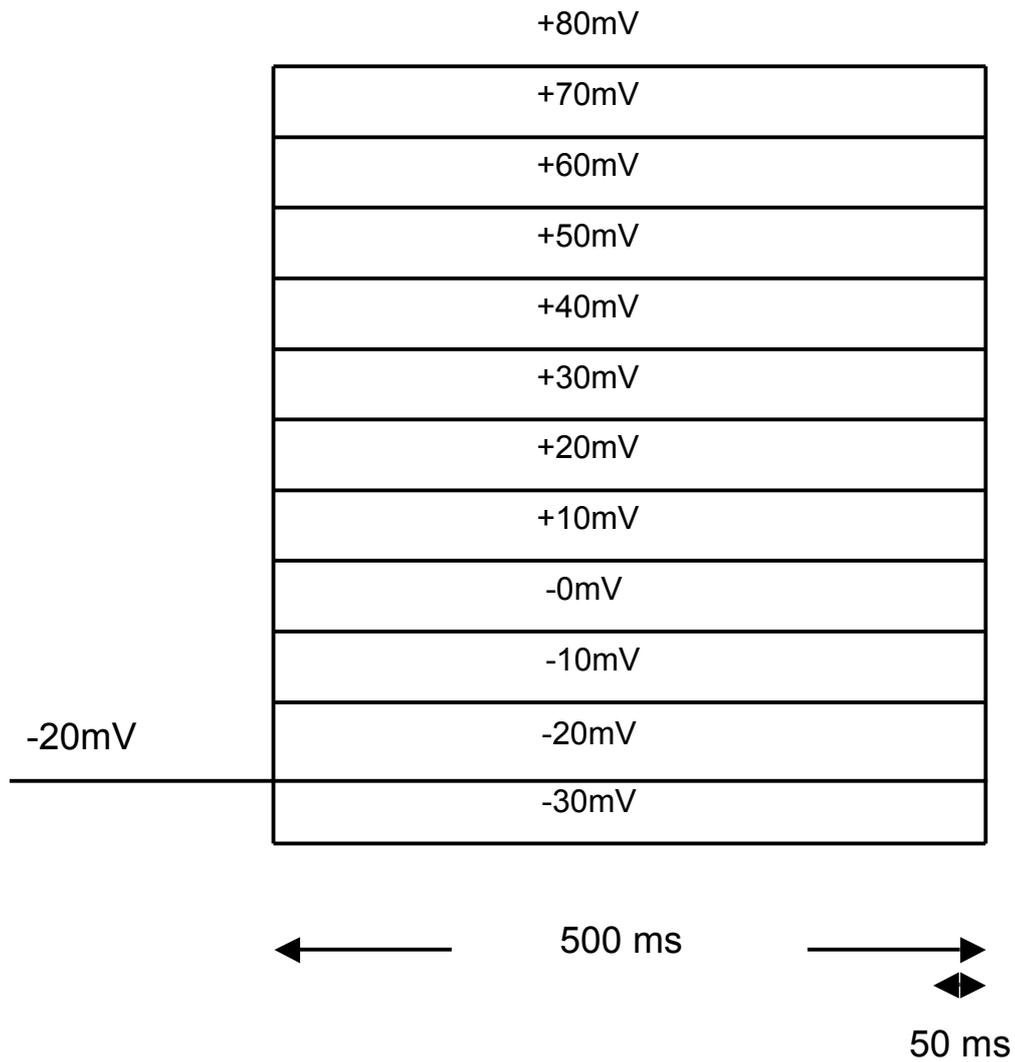
Die Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Hilgenberg/ Maisfeld) wurden mittels Puller (Zeitz Instrumente GmbH; München) gezogen und anschließend hitzepoliert, so dass Pipetten mit einem Widerstand von 1,5 bis 3,5 M $\Omega$  entstanden.

In dieser Messkammer (Volumen: 10 ml) wurde die Zellsuspension ausgebracht. Während der folgenden 30 Minuten erfolgte die Zellsedimentierung und Anheftung vitaler glatter Muskelzellen am Glasboden. Zur Entfernung avitaler Zellen erfolgte anschließend die Mehrfachspülung der Messkammer.

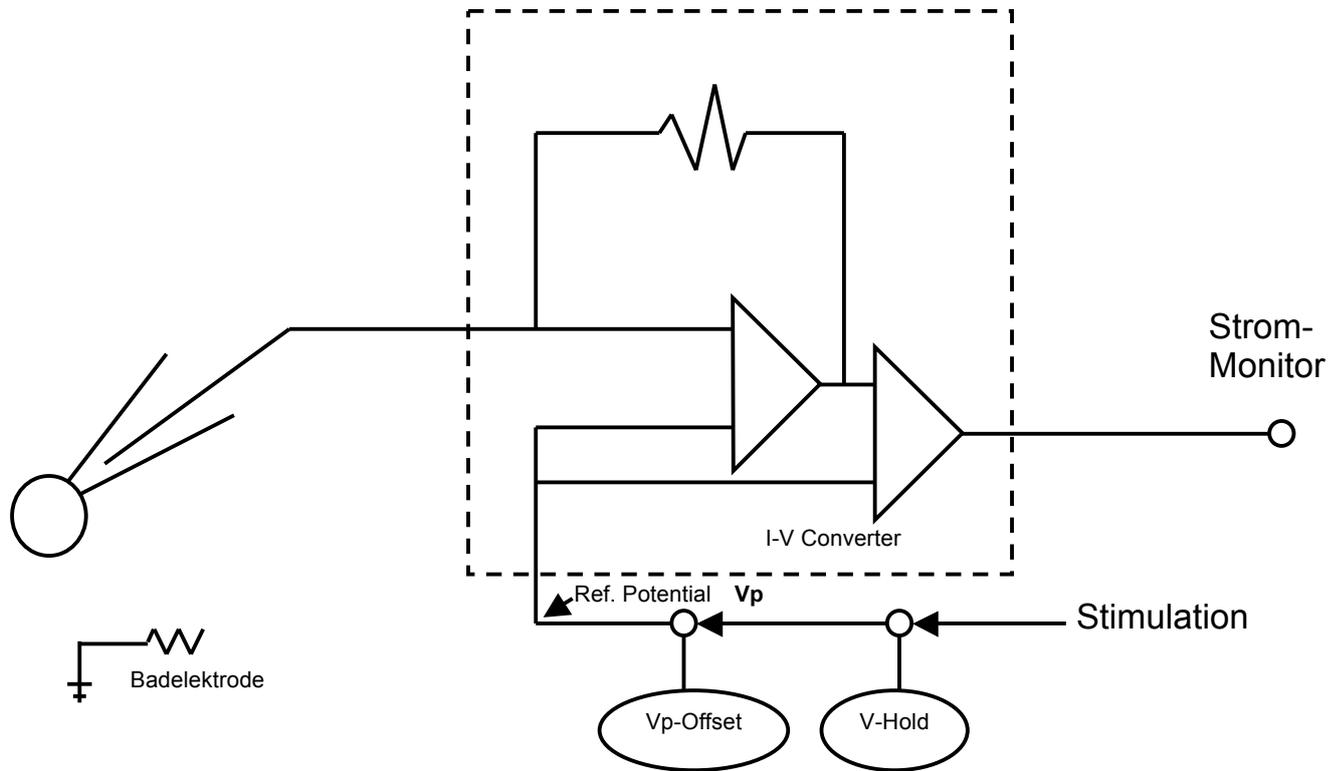
### 3.7 Whole-cell-Experimente

Die Ganzzellströme wurden unter Standardbedingungen mit Spannungsklemmschritten von einem Haltepotential von -20 mV und einer Dauer von 500 ms aufgezeichnet. Die Testpotentiale wurden zwischen -30 bis +80 mV gewählt. Die Amplituden der letzten 50 ms der depolarisierenden Testpulse wurden aus 3 bis 5 aufeinander folgenden Versuchen gemittelt (Abbildung 11).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentens t-Test, die Öffnungswahrscheinlichkeit wurde als  $P_o$  angegeben.



**Abbildung 11: schematische Darstellung des Pulsprotokolls.** Ausgehend von  $-20\text{mV}$  Haltepotential erfolgt in  $+10\text{ mV}$ -Schritten von  $-30\text{ mV}$  bis  $+80\text{ mV}$  eine Depolarisation für jeweils  $500\text{ ms}$ . Lediglich die letzten  $50\text{ ms}$  der Depolarisation gehen in die Auswertung ein.



**Abbildung 12: Messanordnung zur Bestimmung von whole-cell Strömen.**

### 3.8 Single-channel-Experimente

Zur Einzelkanalmessung wurden die adhärenen Zellen in der Messkammer auf dem Mikroskoptisch platziert. Nach Einlage der Ag/AgCl-Referenzelektrode in die Badlösung erfolgte die Positionierung der hitzepolierten Glaspipette auf der Zelle mit Bildung des Gigaseals und der inside-out Konfiguration. Die Kaliumströme wurden durch eine jeweils 3 Minuten andauernde Spannung von  $-30$  mV bis  $+80$  mV aktiviert bei jeweils unterschiedlicher Konzentration an freien Kalziumionen in der Badlösung (Stimulusfrequenz  $0.1$  Hz).

Alle Einzelkanalmessungen wurden mittels LABMASTER Interface und des DAT-Rekorders aufgezeichnet. Anschließend wurden die Daten *off-line* mittels pClamp 5.5 Software (Axon Instrumentes Inc., Forster City, USA) digitalisiert (Samplingrate  $3 - 5$  Hz, achtpoliger *low-pass* Besselfilter mit *cut-off* Frequenz von  $1 - 2$  Hz). Berücksichtigt wurden alle Patches mit eindeutig zu identifizierenden Kaliumströmen. Die Verteilung der Öffnungszeiten wurde in entsprechenden Histogrammen dargestellt und mit exponentiellen Funktionen gefittet.

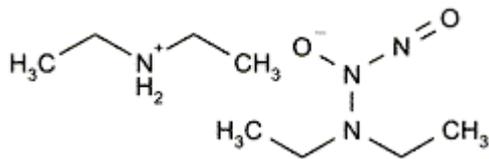
### 3.9 Messlösungen

Pipettenlösung		Konz. in mmol/L
	NaCl	140
	KCl	5,6
	CaCl <sub>2</sub>	1,8
	MgCl <sub>2</sub>	1
	Glukose	10
	HEPES	10

Badlösung		Konz. in mmol/L
	NaCl	10
	KCl	40
	K-Aspartat	100
	Mg-ATP	3
	Glukose	10
	HEPES	10
	Ca <sup>2+</sup> <sub>[free]</sub>	0,10/ 0,30/ 1,00

### 3.10 DEA-NO

Um eine kontrollierte Freisetzung von NO in wässriger Lösung zu erzielen, wurde die Komplexverbindung DEA-NO aus Diethylamin und Stickstoffmonoxid verwendet. Im neutralen Milieu (pH 7.4) beträgt die Halbwertszeit von DEA-NO bei 37°C 2,1 Minuten und zerfällt dabei in DEA und NO. Im alkalischen Bereich ist die Verbindung stabil und wurde deshalb in 1mM NaOH angesetzt. Aufgrund der Licht- und Temperaturempfindlichkeit der DEA-NO-Lösung erfolgte die dunkle und eisgekühlte Verwahrung.



**Abbildung 13: Strukturformel der Komplexverbindung DEA-NO**

### 3.11 Statistische Bearbeitung und mathematische Auswertung

Im Text, den Tabellen und Abbildungen sind Mittelwerte und deren Standardfehler ( $X \pm SEM$ ) angegeben. Statistische Signifikanz der Parameterveränderung wurde mittels *Studenten t-Test* ermittelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten wird mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet, wobei ein  $p > 0.05$  als statistisch signifikant gilt. Die Anzahl der in der Auswertung eingeflossenen Untersuchungen wird mit  $n$  bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

Bei einem Haltepotential von -20 mV und Testpotentialen zwischen -30 mV bis +80 mV mit Spannungssprüngen von jeweils +10 mV entstehen die Ströme über der Zellmembran glatter Muskelzellen hauptsächlich aus aktivierten BK-Kanälen, die durch 100 nM Iberiotoxin zu über 90% gehemmt werden. Bei den Einzelkanalmessungen (inside-out Konfiguration) wurde die physiologische Lösung als Pipettenlösung (extrazellulärer Angriffsort) und die kalziumhaltige Lösung ( $[Ca^{2+}]_{free}=100$  nM, 300 nM und 1000 nM) als Badlösung (intrazellulärer Angriffsort) verwendet. Sämtliche Ströme wurden low-pass gefiltert (cut-off Frequenz 2 kHz) und mit einer Samplingfrequenz von 4 - 5 kHz digitalisiert.

Die Versuche im whole-cell Modus wurden nur dann in die Auswertung mit einbezogen, falls der Leakage während des Experiments vernachlässigbar klein war. Aus den Mittelwerten von etwa 3 bis 5 aufeinanderfolgenden Messungen mit einer Dauer von 500 ms wurden die Amplituden während der entsprechenden depolarisierenden Testpulse ermittelt.

Die Einzelkanalamplituden wurden, bestehend aus den Amplitudenhistogrammen der offenen und geschlossenen Kanäle, mittels Einbeschreibung in die Gaußkurve bestimmt. Die durchschnittliche Kanalaktivität ( $NP_o$ ) wurde aus den Datensätzen mit einer Messdauer von 3 bis 5 Minuten wie folgt errechnet:

$$NP_o = \left( \sum_{j=1}^N t_j \right) / T$$

**Abbildung 14: Formel zur Ermittlung der  $P_{open}$  eines Ionenkanals:**  $P_o$ : Offenwahrscheinlichkeit des Kanals;  $T$ : Dauer der Aufzeichnung;  $t_j$ : Zeit während  $j= 1, 2, \dots N$  Kanäle offen sind;  $N$ : Anzahl der beobachteten Kanäle, die während der Messung maximal aktiviert waren;  $t_j$ : reflektiert Fläche der korrespondierenden Gausskurve;

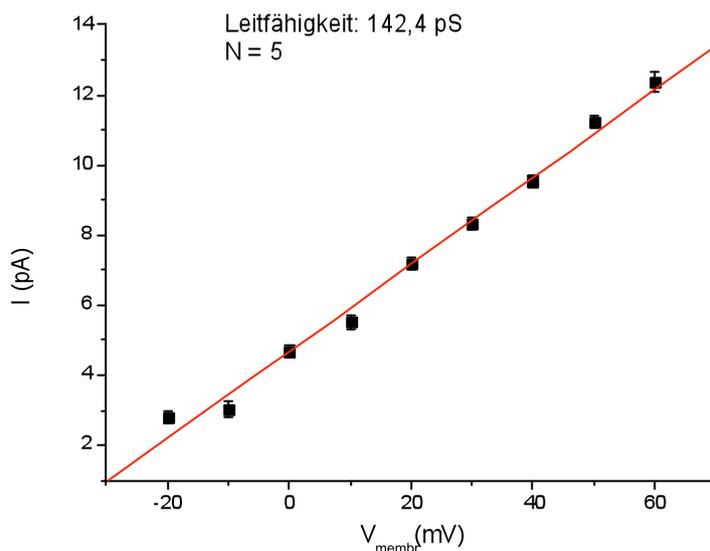
Die Datensätze wurden aus den Messungen von 20 Zellen von 9 Mäusen erhoben. Aufgrund der nicht vorhandenen Literatur bzgl. Kalzium- und Spannungsabhängigkeit von BK-Kanälen in glatten Muskelzellen der Aorta bei der SV 127 Maus war es durch

Vorversuche erforderlich geeignete Dosis- und Spannungs-Wirkungskurven zu erstellen. Hierzu erfolgten die Messungen im single-channel Modus.

## 4.1 Einzelkanalmessungen

### 4.1.1 Ionenleitfähigkeit des BK-Kanals

Es ließ sich bei einem Haltepotential von -20 mV und Messschritten von jeweils +10mV von -20 mV bis +60 mV und einer freien Kalziumkonzentration von 300 nM für den BK-Kanal eine Leitfähigkeit von 142,2 pS ermitteln (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Bestimmung der Ionenleitfähigkeit des BK-Kanals:** Haltepotential -20 mV, Messschritte jeweils +10 mV von -20 mV bis +60 mV; Leitfähigkeit der BK-Kanäle bei  $[Ca^{2+}_{\text{free}}]=300$  nM;

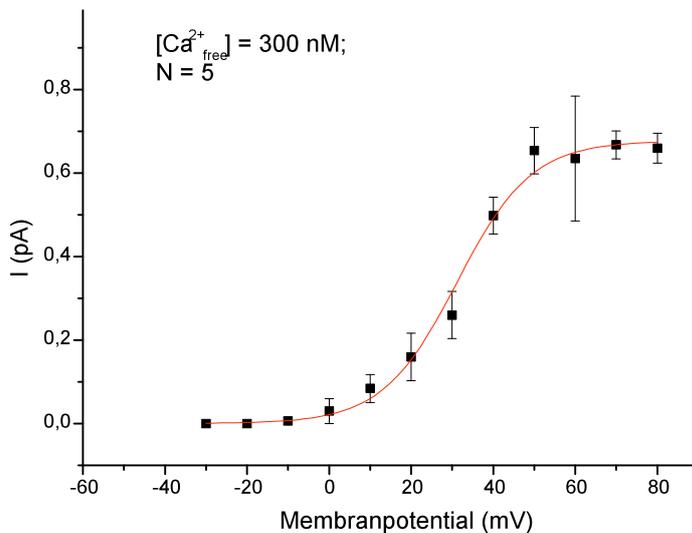
#### 4.1.2 Bestimmung der Kalziumabhängigkeit des BK-Kanals

Ziel der folgenden Experimente war der Nachweis der Kalziumabhängigkeit des BK-Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen und die Bestimmung der Konzentration an freiem Kalzium, die den BK-Kanal optimal stimuliert. Die direkte Bindung von freiem Kalzium an die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals führt zu einer Erhöhung seiner Offenwahrscheinlichkeit und zu einer Linksverschiebung der Strom-Spannungskurve (Dworetzky, Boissard et al. 1996). Um definierte Konzentrationen an freiem Kalzium an der zytosolischen Seite des BK-Kanals zu erhalten, erfolgten die Einzelkanalmessungen im inside-out Modus.

Die Badlösung enthielt freies Kalzium in Konzentrationen von 100 nM, 300 nM oder 1000 nM, die Messpipette war mit physiologischer Lösung gefüllt. Die resultierenden Auswärtsströme wurden in Abhängigkeit von der Kommandospannung miteinander verglichen. Der sigmoide Kurvenverlauf des Strom-Spannungs- (IV-) Verhältnisses zeigt einen hohen Hill-Koeffizienten (0,72) mit hoher Kooperativität (*Abbildung 16*). Der maximale Strom von 69 pA wurde bei 300 nM an freiem Kalzium mit +67 mV erhalten, *der halbmaximale bei +31 mV*.

Im Gegensatz dazu ist bei einer Konzentration an freiem Kalzium von 100 nM die IV-Relation zu positiveren Werten, bei Konzentration an freiem Kalzium von 1000 nM zu negativeren Werten hin verschoben (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt).

Eine Konzentration an freiem Kalzium von etwa 100 nM – 300 nM entspricht in etwa der physiologischen Konzentration, die intrazellulär vorliegt, wenn keine signalaktiven Prozesse unter Beteiligung des Kations stattfinden (Harnett and Biancani 2003). Unter diesen Bedingungen zeigt die IV-Relation ab etwa +20 mV einen linearen Verlauf, der bei etwa +60 mV in eine Sättigung übergeht ohne bereits das Plateau erreicht zu haben. Bei der Verwendung von 300 nM an freiem Kalzium wird der halbmaximale Auswärtsstrom bei etwa +31 mV erreicht.



**Abbildung 16: Strom-Spannungskurve des BK-Kanals.** Messung im inside-out Modus zum Erhalt der Stromamplituden; bei definiertem  $[Ca^{2+}]_{\text{freed}} = 300 \text{ nM}$  in der Badlösung ist das IV-Verhältnis dargestellt. Eine prozentuale Normalisierung der gemessenen Auswärtsströme wurde durch den Strom bei maximal möglicher Depolarisation errechnet und jeweils mit ihrem mittleren Fehler (+/- SEM) dargestellt.

#### 4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung des BK-Kanals in Gefäß-muskelzellen von Wildtyp- und cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen

In den folgenden Experimenten wurde die Spannungsabhängigkeit der BK-Kanäle bei konstanter Konzentration an freiem Kalzium untersucht. Die Messungen erfolgten im whole-cell Modus, wobei die Badlösung eine physiologische war und die intrazelluläre Lösung (=Pipettenlösung) eine Konzentration von 300 nM an freiem Kalzium aufwies. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-20 \text{ mV}$  erfolgte die Applikation von 500 ms Testpulsen bis zum maximalen Wert von  $+80 \text{ mV}$  in  $+10 \text{ mV}$ -Sprüngen (Abbildung 11).

Beim maximalen Testpotential von  $+80 \text{ mV}$  betragen die Auswärtsströme  $2,48 \pm 0,69 \text{ nA}$  ( $n=6$ ). Die Spannungsabhängigkeit und die Stromkinetik sind somit in Übereinstimmung mit den Vorgaben der Literatur für die BK-Kanäle (Lippiat, Standen

et al. 2003). Identische Ergebnisse bezüglich Spannungsabhängigkeit und Stromkinetik lieferten die Untersuchungen an glatten Muskelzellen von cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=5) (Abbildung 18). Dies legt den Schluss nahe, dass der BK-Kanal unabhängig vom cGK-System Kalzium bindet und aktiviert werden kann. Diese Ergebnisse belegen gleichzeitig, dass die BK-Kanaldichte im Myozyten aus Aorten vom Wildtyp und von cGKI Nullmutanten gleich ist.

#### **4.2.1 NO vermittelte Aktivierung des BK-Kanals**

NO ist in der Lage die Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals zu erhöhen. Eine intrazelluläre Applikation ist hierbei nicht erforderlich, da NO selbst durch Zellmembranen hindurch diffundiert (Furchgott and Zawadzki 1980; Bolotina, Najibi et al. 1994; Alioua, Huggins et al. 1995; Fukao, Mason et al. 1999; Tomioka, Hattori et al. 1999). Zur kontrollierten Freisetzung von NO in wässriger Lösung wurde die Komplexverbindung DEA-NO verwendet.

Ziel der folgenden Experimente war die Darstellung der NO-Wirkung auf den BK-Kanal bei der WT- und der KO-Maus. Unter Verwendung von 0,250 und 5  $\mu$ M DEA-NO wurde in der whole-cell-Applikation die Erhöhung der Stromamplitude gemessen (Abbildung 20).

#### **4.2.1.1 DEA-NO-Wirkung an der Wildtyp-Maus**

In oben genannter Messanordnung wurde im whole-cell Modus bei einer Konzentration an freiem Kalzium von 300 nM in der Pipette und physiologischer Badlösung Spannungsrampen (Amplitudensteigerung jeweils +10 mV) zwischen -30 mV und +80 mV mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 500 ms durchgeführt. Bei stabilen Messbedingungen erfolgte nach einem kompletten Durchlauf der Spannungsrampen die Zugabe von DEA-NO. Anschließend wurde nach einer Wartezeit von etwa 30 Sekunden erneut eine Spannungsrampe im bisher verwendeten Protokoll durchgeführt. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, führte die Zugabe von 5 $\mu$ M DEA-NO zu etwa einer Verdopplung der Leitfähigkeit des BK-Kanals (7,16 nA +/- 0,65 nA; n=5) im Wildtyp.

#### **4.2.1.2 DEA-NO-Wirkung an der cGKI<sup>-/-</sup>-Maus**

In der selben Messanordnung erfolgten die Messungen an Gefäßmuskelzellen von cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen. Bei stabilen Messbedingungen und entsprechendem Testdurchlauf erfolgte die Zugabe von 5 $\mu$ M DEA-NO. Hierbei ergab sich keine signifikante Änderung der Kanalleitfähigkeit. Auch die anschließende Zugabe von 50  $\mu$ M DEA-NO hatte keinen Effekt auf den BK-Kanal (*Abbildung 18*).

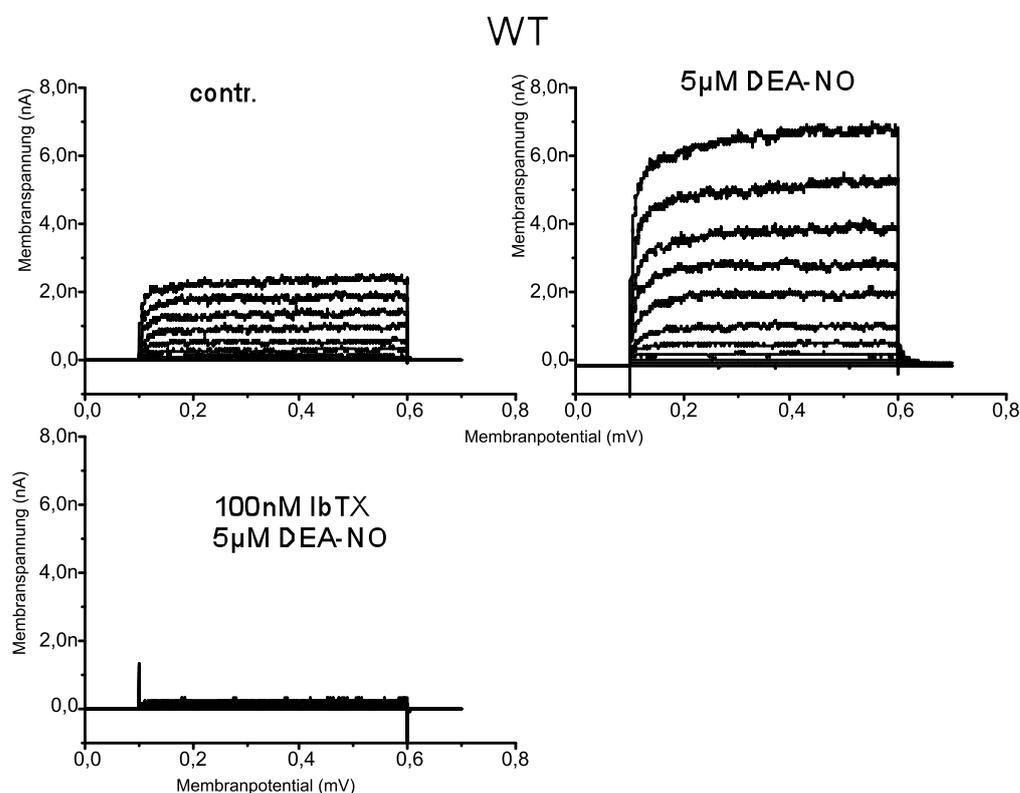
### **4.2.2 Hemmung des BK-Kanals mit Iberiotoxin**

#### **4.2.2.1 Wirkung von Iberiotoxin am BK-Kanal der Wildtyp-Maus**

Die BK-Kanalhemmung durch 100nM IbTx erfolgte jeweils im whole-cell-Modus nach Durchlaufen der oben beschriebenen Spannungsrampen. Hierbei wurde die Wirkung von 100 nM IbTx am BK-Kanal ohne und mit vorheriger Aktivierung durch DEA-NO

(0,250 und 5  $\mu\text{M}$ ) getestet. In beiden Fällen wurde der Stromfluss durch den BK-Kanal auf dasselbe Niveau herunterreguliert (Abbildung 17 und 20).

Dieser Effekt war irreversibel, da eine 3-minütige Perfusion der Messanordnung mit inhibitorfreier Messlösung und erneuter Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  DEA-NO keine Steigerung des Stromflusses zur Folge hatte. Dies kann als indirekter Beweis dafür gelten, dass die vorliegenden Ströme durch den BK-Kanal verursacht sind.

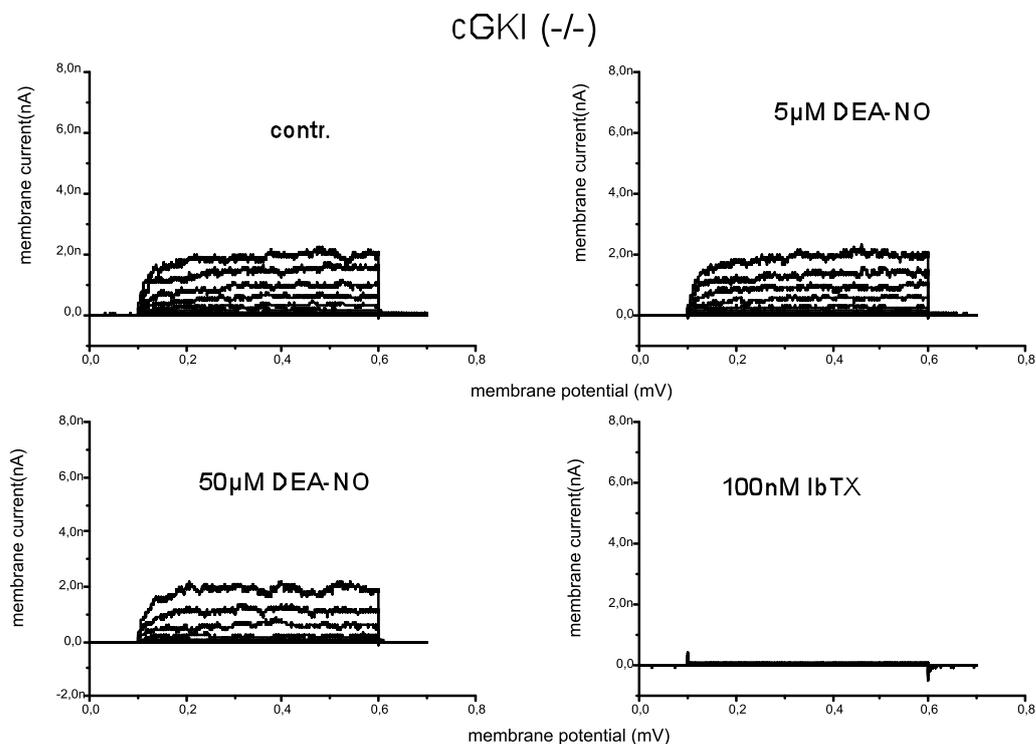


**Abbildung 17: Wirknachweis von NO und Iberiotoxin an der WT-Maus;**

Repräsentative Darstellung der BK-Kanal vermittelten Kaliumströme im whole-cell Experiment bei  $[\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] = 300 \text{ nM}$ . Ausgehend von einem Haltepotential von  $-20 \text{ mV}$  erfolgte schrittweise die Erhöhung der Depolarisation um  $+10 \text{ mV}$  bis zu einem Maximalwert von  $+80 \text{ mV}$ . Zu sehen ist die Erhöhung des Stromflusses unter Gabe von 5  $\mu\text{M}$  DEA-NO, die Hemmung des BK-Kanals nach Gabe von 100 nM Iberiotoxin und erneuter Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  DEA-NO.

#### 4.2.2.2 Wirkung von Iberiotoxin an der cGKI<sup>-/-</sup>-Maus

In identischer Messanordnung wie unter 4.2.2.1 erfolgte die Untersuchung der IbTx-Wirkung an glatten Muskelzellen der cGKI<sup>-/-</sup>-Maus. Nach Durchlaufen der o.g. Spannungsrampen erfolgte vor (nicht abgebildet) und nach Zugabe von 5 und von 50  $\mu$ M DEA-NO die Zugabe von 100 nM IbTx. Hierbei zeigte sich die nahezu komplette Hemmung des Stromflusses. Das anschließende dreiminütige Auswaschen der Messkammer mit physiologischer Lösung konnte in ebenfalls keinem der Experimente den Stromfluss wieder herstellen. Dies muss als Nachweis gelten, dass der Stromfluss KO-Mauszellen im Wesentlichen über den BK-Kanal vermittelt wird.



**Abbildung 18: Wirknachweis von DEA-NO und Iberiotoxin an der KO-Maus:**

Repräsentative Darstellung der BK-Kanal vermittelten Kaliumströmen im whole-cell Experiment bei  $[Ca^{2+}_{free}] = 300 \mu$ M. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-20$  mV erfolgte schrittweise eine Erhöhung der Depolarisation um  $+10$  mV bis zu einem Maximalwert von  $+80$  mV. Zu sehen ist die Erhöhung des Stromflusses nach Gabe von 5 und 50  $\mu$ M DEA-NO und die anschließende Hemmung des Stromflusses des BK-Kanals nach Gabe von 100 nM Iberiotoxin.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass BK-Kanäle in glatten Gefäßmuskelzellen sowohl von der WT als auch von der cGK<sup>-/-</sup>-Maus die selbe Kalzium- und Spannungsabhängigkeit aufweisen. Ferner ist der BK-Kanal unabhängig von dem cGKI-System durch IbTx hemmbar.

Die Erhöhung der Leitfähigkeit des BK-Kanals in WT-Zellen durch 5  $\mu$ M DEA-NO konnte ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden. In Muskelzellen der KO-Maus war nach Zugabe von 5 und 50  $\mu$ M DEA-NO keine weitere Aktivierung des BK-Kanals nachweisbar.

Dies zeigt, dass NO unabhängig vom cGMP/cGKI Signalweg keine Aktivierung des BK-Kanals bewirkt. Voraussetzung für die Aktivierung des BK-Kanals ist vielmehr das Vorhandensein eines intrazellulären, NO-abhängigen second messengers, der seinerseits eine aktivierende Wirkung auf den BK-Kanal aufweist.

#### **4.3 Regulation des BK-Kanals aus cGKI-Nullmutanten durch exogenes cGKI-Protein**

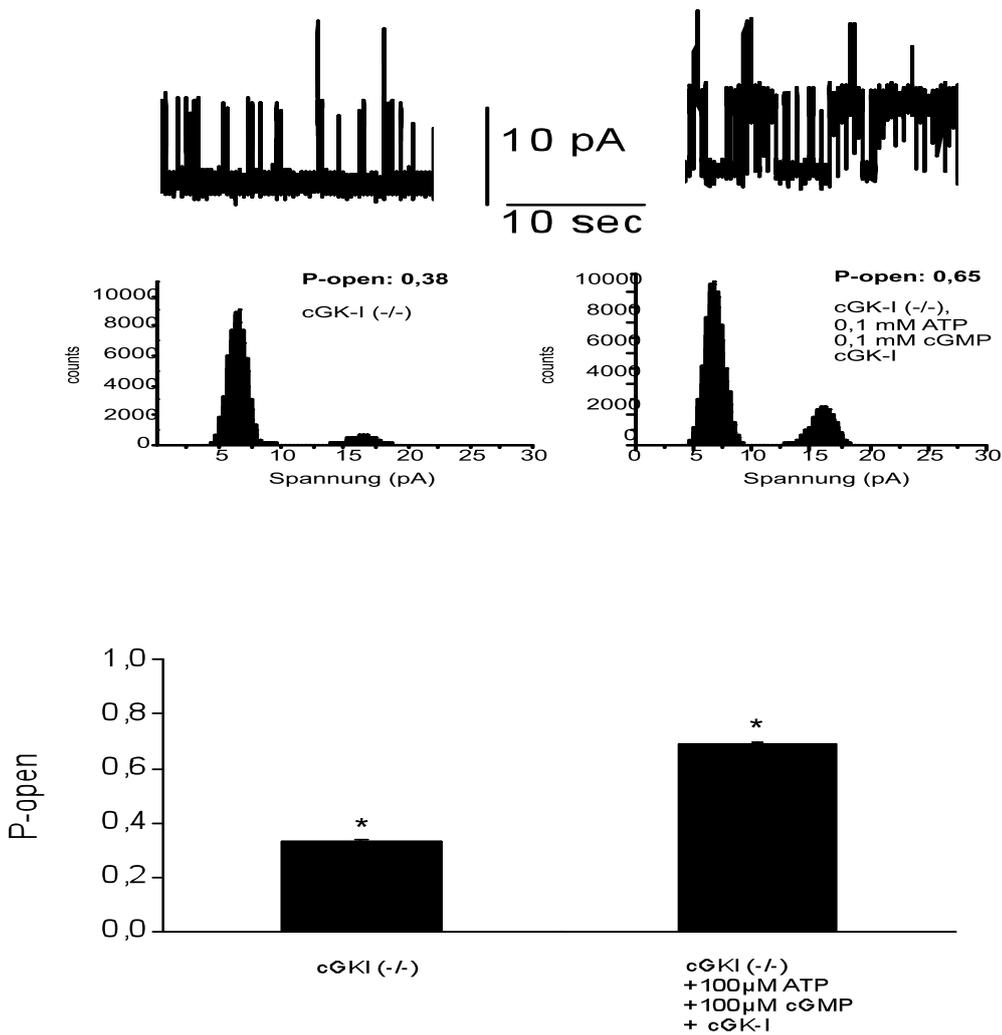
Die bisherigen Untersuchungen wurden im whole-cell Modus durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass der intrazelluläre second messenger in physiologischer Konzentration in der Zelle vorlag.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das cGMP-System, hier repräsentiert durch die cGKI, die Verbindung zwischen dem aktivierenden NO und dem BK-Kanal darstellt.

Um diese Vermutung zu bestätigen erfolgte die Rekonstitution des gereinigten cGKI-Proteins in inside-out Patches von Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von cGKI-Nullmutanten. Im single-channel Modus wurde die Offenwahrscheinlichkeit vor und nach Zugabe von cGMP, ATP und cGKI, teilweise Produkte der sGC, ermittelt.

Ausgehend von einem Haltepotential von  $-20$  mV und einem Testpotential von  $+30$  mV wurde über eine Messdauer von 3 Minuten im single-channel Modus an cGK I<sup>-/-</sup>-Zellen (n=8) die BK-Kanalaktivität bei einer Konzentration an freiem Kalzium von

300nM bestimmt (Abbildung 19). Die Einzelkanalströme betragen bei einem Testpotential von +30 mV 10 pA. Aus der Summe der Einzelkanalöffnungen über 3 Minuten wurde die  $P_o$  bestimmt. Im gleichen Versuchsaufbau, unter Zugabe von 0,1 mM ATP, 0,1 mM cGMP und cGKI, erfolgte erneut über 3 Minuten die Bestimmung der Einzelkanalaktivität bei einem Testpotential von +30 mV. Hierbei kam es nahezu zu einer Verdopplung der Kanalaktivität (Offenwahrscheinlichkeit ohne Rekonstitution:  $P_o=0,38$ , mit Rekonstitution:  $P_o=0,65$ ). Dies zeigt, dass der BK-Kanal in Gefäßmuskelzellen aus cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen durch cGKI aktiviert werden kann.

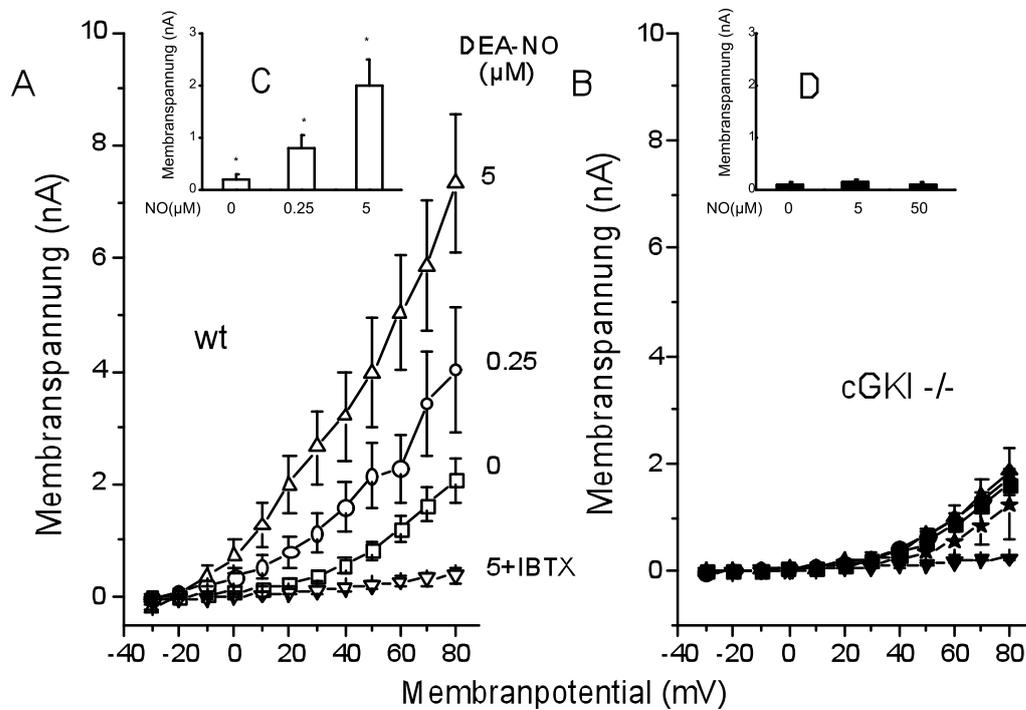


**Abbildung 19: Rekonstitutionsversuche;**  $P_o$  bei  $cGKI^{-/-}$ -Mauszellen ohne und mit Substitution von 0,1 mM ATP, 0,1 mM cGMP und cGKI, gemessen bei einem Haltepotential von +30 mV über 3 Minuten. Nach Rekonstitution der cGKI kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Kanalaktivität ( $P_o$  (ohne Rekonstitution): 0.38,  $P_o$  (mit Rekonstitution): 0.65).

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In glatten Gefäßmuskelzellen von Wildtypmäusen kommt es durch Zugabe von DEA-NO dosisabhängig zu einer signifikanten Erhöhung des Stromflusses. Diese DEA-NO aktivierten Ströme waren durch den selektiven BK-Kanal-Blocker Iberitoxin (100 nM) hemmbar (Abbildung 20).

Der BK-Strom wird in WT-Zellen durch NO vergrößert, nicht aber in der cGKI<sup>-/-</sup>-Zelle. Diese Stromerhöhung erfolgt durch eine Erhöhung der  $P_{open}$ . In Einzelkanalmessungen konnte der BK-Kanal aus cGKI<sup>-/-</sup>-Zellen durch Zugabe der gereinigten cGKI aktiviert werden.



**Abbildung 20: Strom-Spannungsbeziehung der BK-Ströme in glatten Muskelzellen aus der Aorta der Wildtyp-Maus (wt; offene Symbole) (A) und cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen (ausgefüllte Symbole) (B). Whole-cell Ströme wurden bei Testpotentialen von -30 mV bis +80mV unter kontrollierten Bedingungen gemessen (Balken), wie auch in Anwesenheit von angegebenen DEA-NO-Konzentrationen. Alle Werte wurden aus Messungen von 3 bis 10 Zellen berechnet. Die Balkendiagramme zeigen die Ströme bei einem Membranpotential von +20 mV. \*Signifikanz bei  $P < 0.01$ .**

## 5 Diskussion

Zur Entwicklung neuer und spezifischer Antihypertensiva ist die Kenntnis der Wirkung von NO im Gefäßmuskel, der Bedeutung des cGMP-Systems bei der Vasorelaxation und der Art der Aktivierung des BK-Kanals erforderlich.

Der Zusammenhang zwischen endotheliale NO und der Regulation von normalem und pathologischem Blutdruck wurde in zahlreichen klinischen Untersuchungen gezeigt (Benjamin and Vane 1996). Die hierbei essentielle Bedeutung der NO/cGMP-Kaskade wurde durch die Induktion eines Hypertonus mittels gezielter Inaktivierung des endothelialen NO-Synthase-Gens (eNOS), des atrialen natriuretischen Peptid-Gens (ANP) und des Guanylatzyklase A-Gens (GC-A) bei Mäusen unterstrichen (Huang, Huang et al. 1995; Lopez, Wong et al. 1995; Shesely, Maeda et al. 1996). Eine NO-vermittelte Erhöhung der cGMP-Konzentration führt über die Aktivierung von Phosphodiesterasen (Sonnenburg and Beavo 1994), von zyklonukleotid-aktivierten Kationenkanälen (Biel, Sautter et al. 1998) oder von BK-Kanälen, die als distales Target der cGKI fungieren, vasorelaxierend (Pfeifer, Ruth et al. 1999).

In einigen Untersuchungen wurde postuliert, dass die NO-vermittelte Blutdrucksenkung auch unabhängig von dem cGMP-System und der cGKI direkt über BK-Kanäle möglich ist (Bolotina, Najibi et al. 1994).

### 5.1 Mausmutanten mit cGKI-Defekt

Zur Identifizierung des NO-vermittelten Aktivierungsweges des BK-Kanals bei der Vasorelaxation wurden cGKI<sup>-/-</sup>-Mauszellen verwendet.

Diese KO-Mäuse sind in ihrer Entwicklung deutlich verlangsamt und weisen Zeichen einer Mangelernährung auf (Pfeifer, Klatt et al. 1998). Die Entwicklungsstörung zeigt sich auch in ihrer deutlich verkürzten Lebenserwartung von etwa 4-6 Wochen (Pfeifer, Klatt et al. 1998; Sausbier, Schubert et al. 2000). Aus dieser Beobachtung lässt sich bereits die zentrale Bedeutung des cGMP-Systems für physiologische Regulationsabläufe ermessen, ohne die einzelnen Funktionen im Detail zu kennen.

## 5.2 Charakterisierung des BK-Kanals

Zu Anfang der Untersuchungen stand die Identifikation des BK-Kanals im Testsystem „glatte Muskelzelle“ und die Charakterisierung seines Aktivierungsverhaltens.

Die in der Arbeit gefundenen Werte für Stromkinetik und Spannungsaktivität des BK-Kanals entsprechen den in der Literatur beschriebenen Werten (Lippiat, Standen et al. 2003).

Die direkte Bindung von freiem Kalzium an die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals führt zu einer Erhöhung seiner Offenwahrscheinlichkeit. (Dworetzky, Boissard et al. 1996). Die Bestimmung der BK-Kanalaktivität in Abhängigkeit von der freien Kalziumkonzentration erfolgte im inside-out Modus. Hierbei wurden intrazelluläre Konzentrationen an freiem Kalzium von 100 nM, 300 nM und 1000 nM getestet. Konzentrationsabhängig kam es zur einer Linksverschiebung der Strom-Spannungskurve, die sich mit anderen experimentellen Systemen deckt (Dworetzky, Boissard et al. 1996). Es zeigte sich, dass eine freie Kalziumkonzentration von 300 nM für die weiteren Untersuchungen am besten geeignet war, da u.a. das Testsystem bei diesen Bedingungen die höchste Stabilität aufwies. Diese intrazelluläre Konzentration an freiem Kalzium von 300 nM entspricht in etwa auch der physiologischen Konzentration (100 nM – 300 nM), die intrazellulär vorliegt, wenn keine signalaktiven Prozesse unter Beteiligung des Kations stattfinden (Harnett and Biancani 2003).

### 5.2.1 Funktionsuntersuchungen am BK-Kanal der WT-Maus

Nach der Grobcharakterisierung (Spannungs- und Kalziumabhängigkeit) des BK-Kanals stand ein stabiles Testsystem zur Verfügung, um die Wirkung von NO am Kanal zu testen.

Bereits seit langer Zeit ist bekannt, dass NO in der Lage ist, die Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals zu erhöhen. Eine intrazelluläre Applikation ist hierbei nicht erforderlich, da NO selbst durch Zellmembranen hindurch diffundiert

(Furchgott and Zawadzki 1980; Bolotina, Najibi et al. 1994; Alioua, Huggins et al. 1995; Fukao, Mason et al. 1999; Tomioka, Hattori et al. 1999).

Im whole-cell Modus kam es nach Zugabe von 250 nM und 5  $\mu$ M DEA-NO in die Badlösung zu einer signifikanten Erhöhung des Stromflusses.

Durch die anschließende Zugabe von 100 nM IbTx, dem selektiven BK-Kanalblocker, der extrazellulär an der  $\beta$ -Untereinheit des BK-Kanals angreift (Candia, Garcia et al. 1992), wurde der Stromfluss signifikant reduziert (*Abbildung 17 und 20*).

Durch dieses Experiment konnte eindeutig gezeigt werden, dass NO in glatten Gefäßmuskelzellen selektiv die Aktivität des BK-Kanals erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NO-induzierte Kaliumströme durch den selektiven BK-Kanalblocker IbTx nahezu komplett inhibiert werden können. Diese Ergebnisse waren die Basis für die folgenden Untersuchungen an der KO-Maus.

## **5.2.2 Funktionsuntersuchungen am BK-Kanal der KO-Maus**

Die experimentelle Untersuchung der KO-Mauszellen erfolgte im unter 5.2.1 verwendeten set-up. Die bisherigen Versuche konnten nachweisen, dass der BK-Kanal der KO-Maus hinsichtlich des Spannungs- und Kalziumabhängigkeit keine relevanten Unterschiede zur WT-Maus aufweist.

Im whole-cell-Modus wurde der Stromfluss bei 300 nM an freiem Kalzium und bei einem Haltepotential von +30 mV abgeleitet. Bei stabilem Messsystem erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ M DEA-NO. In keinem der Experimente konnte eine signifikante Erhöhung des Stromflusses durch NO registriert werden. Die Zugabe von DEA-NO in einer Konzentration von 50 $\mu$ M hatte ebenso keine Wirkung auf die Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals. Um zu zeigen, dass der BK-Kanal noch nativ ist, erfolgte die Zugabe von 100 nM IbTx. In sämtlichen Experimenten konnte der Stromfluss auf das Niveau gesenkt werden, das nach Zugabe von 100 nM IbTx mit und ohne Zugabe von DEA-NO bei der WT-Maus erreicht wurde. Hieraus lässt sich ebenfalls ableiten, dass zur NO-vermittelten Aktivierung des BK-Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen die cGKI erforderlich ist.

### 5.2.3 Rekonstitution

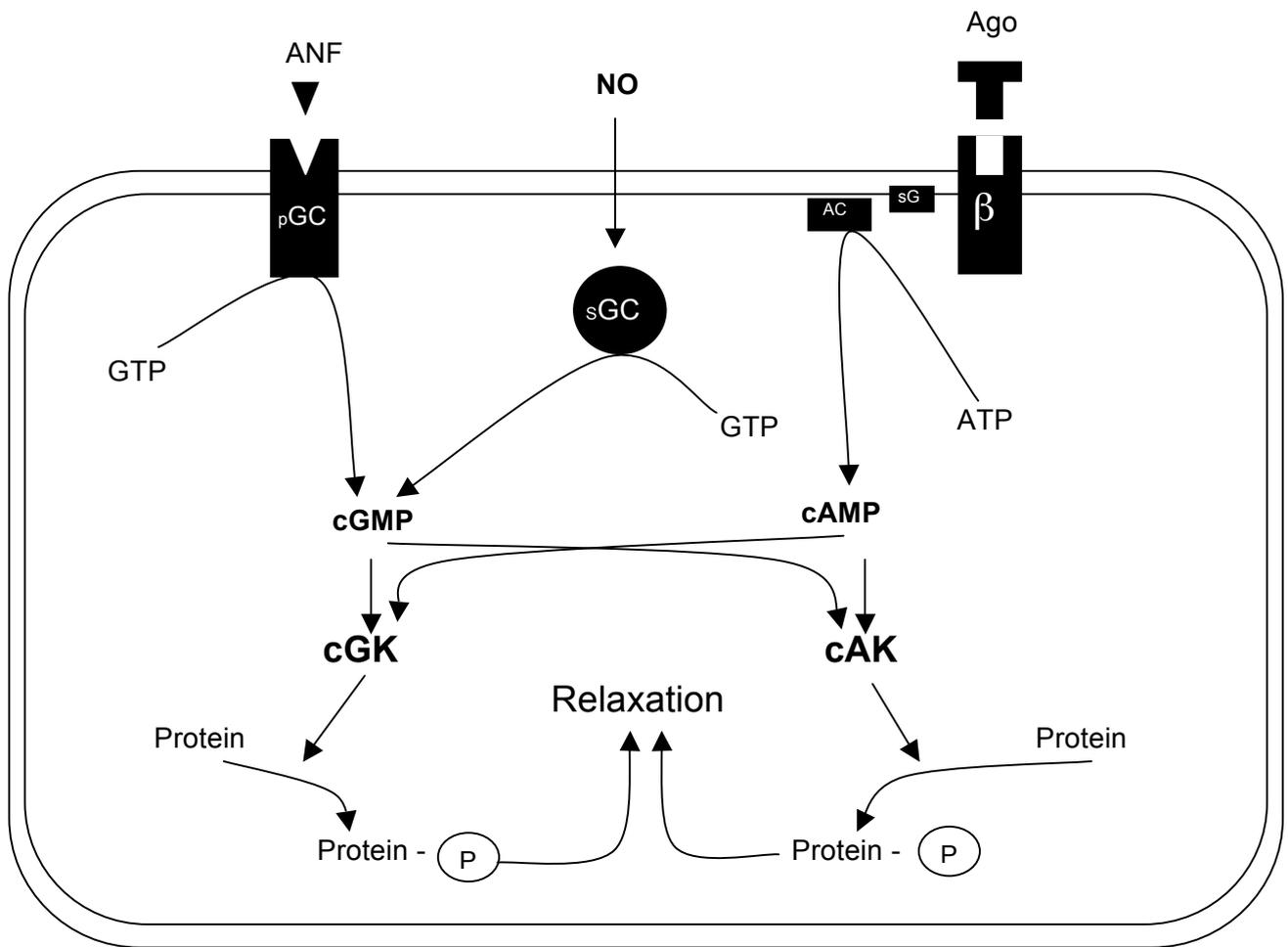
Zum direkten Nachweis der NO-vermittelten Aktivierung des BK-Kanals mussten sämtliche intrazellulären Aktivatoren ausgeschaltet werden. Deshalb fanden die weiteren Untersuchungen im single-channel Modus statt. Damit konnte zum Teil sichergestellt werden, dass die frei im Zytoplasma befindlichen Mediatoren keinen Kontakt mehr zum BK-Kanal haben. Nicht auszuschließen ist in dieser Messanordnung, dass vereinzelt second-messenger dem BK-Kanal anhaften und dadurch eine aktivierende Wirkung auf diesen ausüben.

Durch die Messanordnung befand sich die ursprünglich zytosolische Seite der Zellmembran in der Badlösung und die zugegebenen Mediatoren konnten ausschließlich an der zytosolischen Seite des BK-Kanals wirken. Die signifikante Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals erfolgte nach Rekonstitution mittels  $0,1 \mu\text{M}$  cGMP,  $0,1 \mu\text{M}$  ATP und cGKI (*Abbildung 19*). Dies zeigt, dass die alleinige Aktivierung der cGMP/cGKI-Signalkaskade zur Erhöhung der  $P_{\text{open}}$  führt. Zum Nachweis der extrazellulären Bindung von IbTx am BK-Kanal erfolgte bei noch stabiler Messanordnung die Zugabe von  $100 \text{ nM}$  IbTx. In keinem der durchgeführten Experimente ( $n=5$ ) war eine Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals gemessen worden. Dies unterstreicht die Vorstellung, dass IbTx am extrazellulären Teil des BK-Kanals angreift.

#### 5.2.4 Kreuzreaktivität zwischen cGMP und cAMP

In glatten Muskelzellen fungieren cGMP und cAMP als second messenger bei der Regulierung des Muskeltonus. Die Stimulierung von  $\beta$ -Rezeptoren an glatten Muskelzellen führt G-Protein-vermittelt zur Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase. Diese aktivierte Adenylatzyklase katalysiert aus ATP das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP). Durch Bindung des cAMP an die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAMP-Kinase) kommt es zur Änderung der Quartärstruktur des Enzyms mit Freisetzung der katalytischen Einheit. Dieses aktive Zentrum führt zur Phosphorylierung bestimmter Substratproteine, welche zur Muskelrelaxation führen. Unbekannt sind die für diese Relaxation verantwortlich Substrate. In der Diskussion stehen jedoch Proteine, die die Konzentration des freien Kalziums reduzieren, wie z. B. die Phospholipase C (Hall, Donaldson et al. 1990), spannungsabhängige Kalziumkanäle (Murray and Kotlikoff 1991) und BK-Kanäle (Carl, Kenyon et al. 1991).

Eine Mitbeteiligung/ Kreuzreaktivität zwischen dem cGMP- und dem cAMP-System kann in den whole-cell Experimenten nicht ausgeschlossen werden. Im single-channel-Experiment, bei dem sich die zytosolische Seite des BK-Kanals in der matrixfreien Badlösung befand, war das Kanalverhalten identisch zu den Ergebnissen im whole-cell-Modus. Nach Substitution von 0,1 mM cGMP, 0,1 mM ATP und cGKI kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals. Diese Ergebnisse schließen zwar die Kreuzreaktivität mit dem cAMP-System nicht völlig aus, sind aber, falls überhaupt unter physiologischen Bedingungen vorhanden, für den Einfluss auf das Experiment vernachlässigbar.



**Abbildung 21: Kreuzreaktivität zwischen cGMP und cAMP;** durch Erhöhung der zytosolischen Konzentration von cAMP und cGMP erfolgt die Relaxation glatter Muskelzellen. ANF: natriuretischer Faktor; NO: Stickstoffmonoxid; Ago: Agonist am  $\beta$ -Rezeptor; AC: Adenylylzyklase;  $sG$ : stimulierendes G-Protein;  $sGC/ pGC$ : lösliche/ partikuläre Guanylatzyklase

### 5.3 cGKI-abhängige Regulation des Gefäßtonus

NO bewirkt über die Freisetzung der sGC eine Erhöhung der intrazellulären cGMP- und cGKI-Konzentration. Die cGKI erhöht durch Phosphorylierung des BK-Kanals seine  $P_{open}$  (Brayden and Nelson 1992). Der vermehrte Kaliumausstrom aus dem Zytoplasma führt zur Hyperpolarisation und zur Inaktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration sinkt, die glatte Muskelzelle relaxiert und der Gefäßwiderstand nimmt ab (Abbildung 22) (Griffith, Edwards et al. 1987).

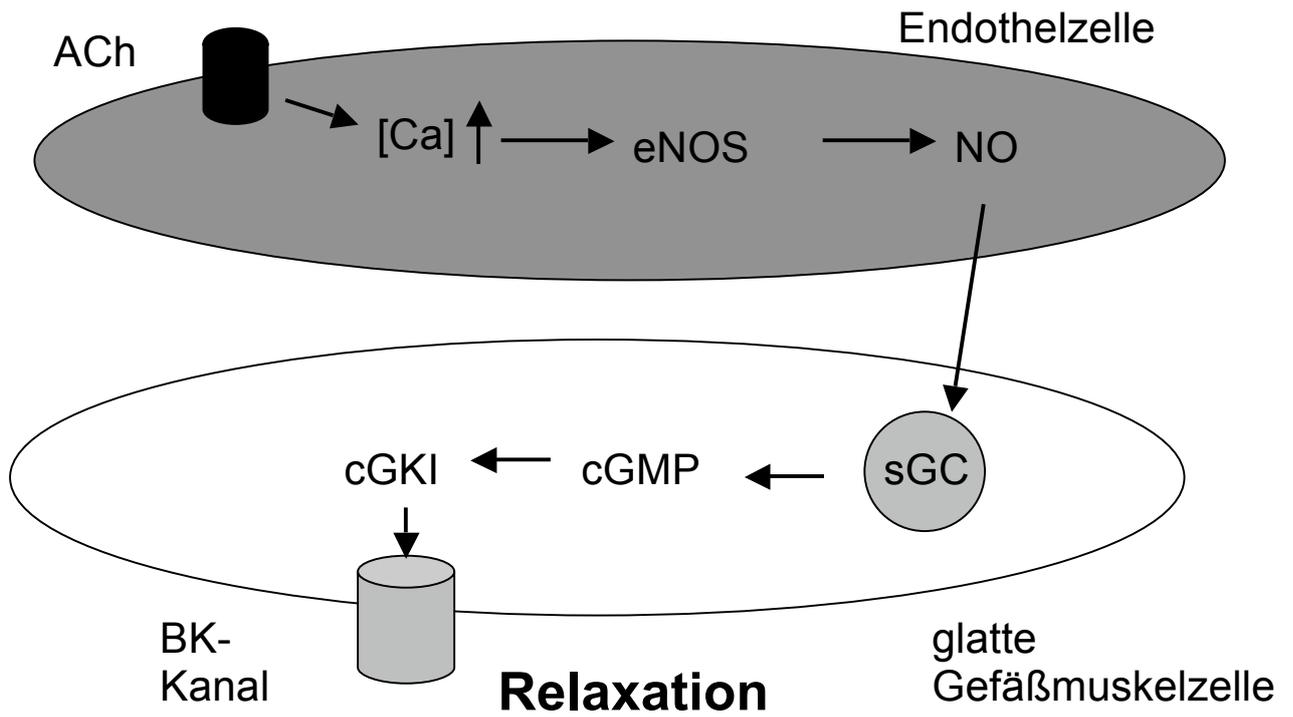
Eine hormoninduzierte und NO/cGMP/cGKI-unabhängige Vasokonstriktion konnte durch Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Aortenzellen nach NA-Stimulation, welche zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration hätte führen müssen, nicht nachgewiesen werden (Pfeifer, Klatt et al. 1998). Auch eine vasokonstringierende Wirkung durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System erscheint wenig wahrscheinlich, da die Reninexpression in Wildtyp und in cGKI<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich ist (Wagner, Pfeifer et al. 1998).

Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Modell der indirekten Aktivierung des BK-Kanals durch NO (Alioua, Huggins et al. 1995; Fukao, Mason et al. 1999; Tomioka, Hattori et al. 1999) gibt es Untersuchungen, die eine direkte Aktivierung des BK-Kanals durch NO nachwiesen. Zur Unterbrechung des NO/cGMP-Signalweges wurde Methylenblau verwendet, das die sGC selektiv hemmen sollte (Bolotina, Najibi et al. 1994).

Mit Hilfe des hier verwendeten Modells konnte dieses Postulat der direkten Aktivierung des BK-Kanals durch NO nicht bestätigt werden.

Die Verwendung von cGKI<sup>-/-</sup>-Zellen führte zu einem kompletten Verlust der NO-vermittelten Aktivierung des BK-Kanals. Selbst in Konzentrationen von 50 $\mu$ M DEA-NO ließ sich an den glatten Gefäßmuskelzellen von KO-Mäusen kein nachweisbarer Effekt auf die BK-Kanalaktivität erzielen.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit unterstreichen eindrucksvoll die Schlüsselrolle der cGKI für die NO vermittelte Vasorelaxation über den BK-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: endothelabhängige Vasorelaxation.** Die cGKI ist unter physiologischen Bedingungen der Mediator der NO/cGMP-abhängigen Gefäßrelaxation über den BK-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen der Maus.

## 6 Zusammenfassung

BK-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der NO-vermittelten Relaxation glatter Muskelzellen in Widerstandgefäßen (Brayden and Nelson 1992). Unklar war bisher, wie es dem NO gelingt, den BK-Kanal zu aktivieren. Wirkt das NO durch direkte Aktivierung des BK-Kanals (Bolotina, Najibi et al. 1994) oder ist für die Wirkung des NO immer ein second-messenger, wie z.B. das cGMP/cGKI-System erforderlich (Alioua, Huggins et al. 1995; Fukao, Mason et al. 1999; Tomioka, Hattori et al. 1999)?

In der vorliegenden Arbeit erfolgte initial die Charakterisierung des BK-Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen der Maus. Anschließend wurde unter zu Hilfenahme von cGKI<sup>-/-</sup>-Zellen die Wirkung von NO auf den BK-Kanal untersucht. Durch die Verwendung von cGKI<sup>-/-</sup>-Mauszellen wurde die cGMP/cGKI-Signalkaskade vollständig unterbrochen. Diese Unterbrechung hatte keinen Einfluss auf grundlegende Eigenschaften (Einzelkanalleitfähigkeit, Kalziumabhängigkeit, Spannungsabhängigkeit) des BK-Kanals. Experimentell gelang es bei diesen cGKI<sup>-/-</sup>-Zellen nicht durch NO-Substitution in unterschiedlichen Konzentrationen die P<sub>open</sub> des BK-Kanals zu verändern. Die Rekonstitution der cGKI an KO-Zellen führte zu einer signifikanten Erhöhung der P<sub>open</sub> des BK-Kanals.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungsergebnisse zeigen eindeutig, dass NO unter physiologischen Bedingungen den BK-Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen nicht direkt aktiviert. Sie zeigen ferner, dass die cGMP/cGKI-Signalkaskade kritisch für die Aktivierung des BK-Kanals durch NO ist. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die vasorelaxierende Wirkung von NO zumindest partiell über diesen Signalweg vermittelt wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere an der NO-induzierten Vasodilatation beteiligten Mechanismen unabhängig von diesem Signaltransduktionsweg sind.

Ein möglicher Ansatzpunkt für neue Antihypertensiva könnte somit die selektive Aktivierung des BK-Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen sein. Seine gewebsspezifische Zusammensetzung aus der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit und die Möglichkeit diese selektiv zu aktivieren macht diesen Kanal als pharmakologische Zielstruktur besonders interessant.

## 7 Literaturverzeichnis

- Albina J. E. und Reichner J.S. (1995). "Nitric oxide in inflammation and immunity." New Horiz **3**(1): 46-64.
- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Alioua A., Huggins J.P., Rousseau E. (1995). "PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle." Am J Physiol **268**(6 Pt 1): L1057-63.
- Alioua A., Tanaka Y., Wallner M., Hofmann F., Ruth P., Meera P., Toro L. (1998). "The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo." J Biol Chem **273**(49): 32950-6.
- Ammendola A., Geiselhöringer A., Hofmann F., Schlossmann J. (2001). "Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta." J Biol Chem **276**(26): 24153-9.
- Azuma H., Sekizaki S., Satoh A., Nakajima T. (1986). "Platelet aggregation caused by a partially purified jellyfish toxin from *Carybdea rastonii*." Toxicon **24**(5): 489-99.
- Benjamin N. und Vane J. (1996). "Nitric oxide and hypertension." Circulation **94**(6): 1197-8.
- Berridge M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." Nature **361**(6410): 315-25.
- Bian S., Favre I., Moczydlowski E. (2001). "Ca<sup>2+</sup>-binding activity of a COOH-terminal fragment of the *Drosophila* BK channel involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent activation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4776-81.
- Biel M., Sautter A., Ludwig A., Hofmann F., Zong X. (1998). "Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **358**(1): 140-4.

- Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J., Pagano P.J., Cohen R.A. (1994). "Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle." Nature **368**(6474): 850-3.
- Bootman M.D., Collins T.J., Peppiatt C.M., Prothero L.S., MacKenzie L., De Smet P., Travers M., Tovey S.C., Seo J.T., Berridge M.J., Ciccolini F., Lipp P. (2001). "Calcium signalling--an overview." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 3-10.
- Brayden, J. E. und Nelson M.T. (1992). "Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels." Science **256**(5056): 532-5.
- Bredt D. S. und Snyder S. N. (1992). "Nitric oxide, a novel neuronal messenger." Neuron **8**(1): 3-11.
- Brelidze T.I., Niu X., Magleby K.L. (2003). "A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 9017-22.
- Brenner R., Pérez G.J., Bonev A.D., Eckman D.M., Kosek J.C., Wiler S.W., Patterson A.J., Nelson M.T., Aldrich R.W. (2000). "Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel." Nature **407**(6806): 870-6.
- Bult H., Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., Van Maercke Y.M., Herman A.G. (1990). "Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter." Nature **345**(6273): 346-7.
- Burnstock G., Gannon B., Iwayama T. (1970). "Sympathetic innervation of vascular smooth muscle in normal and hypertensive animals." Circ Res **27**: Suppl 2:5-23.
- Calderone A., Thaik C.M., Takahashi N., Chang D.L., Colucci W.S. (1998). "Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts." J Clin Invest **101**(4): 812-8.
- Candia S., Garcia M.L., Latorre R. (1992). "Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel." Biophys J **63**(2): 583-90.
- Carl A., Kenyon J.L., Uemura D., Fusetani N., Sanders K.M. (1991). "Regulation of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels by protein kinase A and phosphatase inhibitors." Am J Physiol **261**(2 Pt 1): C387-92.

- Carvajal J.A., Germain A.M., Huidobro-Toro J.P., Weiner C.P. (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." J Cell Physiol **184**(3): 409-20.
- Chikuda H., Kugimiya F., Hoshi K., Ikeda T., Ogasawara T., Shimoaka T., Kawano H., Kamekura S., Tsuchida A., Yokoi N., Nakamura K., Komeda K., Chung UI., Kawaguchi H. (2004). "Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes." Genes Dev **18**(19): 2418-29.
- Chinkers M. und Garbers D. L. (1989). "The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling." Science **245**(4924): 1392-4.
- Deng J.T., Van Lierop J.E., Sutherland C., Walsh M.P. (2001). "Ca<sup>2+</sup>-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase." J Biol Chem **276**(19): 16365-73.
- Di Salvo J., Gifford D., Bialojan C., Rüegg J.C. (1983). "An aortic spontaneously active phosphatase dephosphorylates myosin and inhibits actin-myosin interaction." Biochem Biophys Res Commun **111**(3): 906-11.
- Dworetzky S.I., Boissard C.G., Lum-Ragan J.T., McKay M.C., Post-Munson DJ, Trojnacki JT, Chang CP, Gribkoff VK. (1996). "Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation." J Neurosci **16**(15): 4543-50.
- Fay F.S.(1995)."Calcium sparks in vascular smooth muscle: relaxation reguators"  
Science **270**(633):588-589.
- Feil R., Lohmann S.M., de Jonge H., Walter U., Hofmann F. (2003). "Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice." Circ Res **93**(10): 907-16.
- Francis S. H. und Corbin J. D. (1994). "Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases." Annu Rev Physiol **56**: 237-72.
- Friebe A. und Koesling D. (2003). "Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." Circ Res **93**(2): 96-105.
- Fukao M., Mason H.S., Britton F.C., Kenyon J.L., Horowitz B., Keef K.D. (1999). "Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072." J Biol Chem **274**(16): 10927-35.

- Fukata Y., Amano M., Kaibuchi K. (2001). "Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells." Trends Pharmacol Sci **22**(1): 32-9.
- Furchgott R. F. und Zawadzki J. V. (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Galvez A., Gimenez-Gallego G., Reuben J.P., Roy-Contancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G.J., Garcia M.L. (1990). "Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*." J Biol Chem **265**(19): 11083-90.
- Gamm D.M., Francis S.H., Angelotti T.P., Corbin J.D., Uhler M.D. (1995). "The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms." J Biol Chem **270**(45): 27380-8.
- Garg U. C. und Hassid A. (1989). "Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generating vasodilators." Am J Physiol **257**(1 Pt 2): F60-6.
- Garthwaite J. und Boulton C. L. (1995). "Nitric oxide signaling in the central nervous system." Annu Rev Physiol **57**: 683-706.
- Geiselhöringer A., Gaisa M., Hofmann F., Schlossmann J. (2004). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." FEBS Lett **575**(1-3): 19-22.
- Gerzer R., Böhme E., Hofmann F., Schultz G. (1981). "Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper." FEBS Lett **132**(1): 71-4.
- Giangiacoimo K.M., Fremont V., Mullmann T.J., Hanner M., Cox R.H., Garcia M.L. (2000). "Interaction of charybdotoxin S10A with single maxi-K channels: kinetics of blockade depend on the presence of the beta 1 subunit." Biochemistry **39**(20): 6115-22.
- Griffith T.M., Edwards D.H., Davies R.L., Harrison T.J., Evans K.T. (1987). "EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels." Nature **329**(6138): 442-5.
- Hall I.P., Donaldson J., Hill S.J. (1990). "Modulation of fluoroaluminate-induced inositol phosphate formation by increases in tissue cyclic AMP content in bovine tracheal smooth muscle." Br J Pharmacol **100**(3): 646-50.

- Harnett K. M. und Biancani P. (2003). "Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles." Am J Med **115 Suppl 3A**: 24S-30S.
- Heginbotham L., Lu Z., Abramson T., MacKinnon R. (1994). "Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence." Biophys J **66**(4): 1061-7.
- Hepler J. R. (2003). "RGS protein and G protein interactions: a little help from their friends." Mol Pharmacol **64**(3): 547-9.
- Herrera G. M. und Nelson M.T. (2002). "Sarcoplasmic reticulum and membrane currents." Novartis Found Symp **246**: 189-203; discussion 203-7, 221-7.
- Hofmann F. (2005). "The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases." J Biol Chem **280**(1): 1-4.
- Horstrup K., Jablonka B., Hönig-Liedl P., Just M., Kochsiek K., Walter U. (1994). "Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition." Eur J Biochem **225**(1): 21-7.
- Huang P.L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A., Fishman M.C. (1995). "Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase." Nature **377**(6546): 239-42.
- Ignarro L.J., Wood K.S., Wolin M.S. (1982). "Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(9): 2870-3.
- Itoh H., Shimomura A., Okubo S., Ichikawa K., Ito M., Konishi T., Nakano T. (1993). "Inhibition of myosin light chain phosphatase during Ca<sup>2+</sup>-independent vasocontraction." Am J Physiol **265**(5 Pt 1): C1319-24.
- Jackson W. F. (2000). "Ion channels and vascular tone." Hypertension **35**(1 Pt 2): 173-8.
- Jensen B.S., Strøbaek D., Olesen S.P., Christophersen P. (2001). "The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments?" Curr Drug Targets **2**(4): 401-22.
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. (2002). "The open pore conformation of potassium channels." Nature **417**(6888): 523-6.
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R. (2003). "The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel." Nature **423**(6935): 42-8.
- Jiang Z., Wallner M., Meera P., Toro L. (1999). "Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization." Genomics **55**(1): 57-67.

- Juhaszova M., Ambesi A., Lindenmayer G.E., Bloch R.J., Blaustein M.P. (1994). "Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in arteries: identification by immunoblotting and immunofluorescence microscopy." Am J Physiol **266**(1 Pt 1): C234-42.
- Kaczorowski G.J., Knaus H.G., Leonard R.J., McManus O.B., Garcia M.L. (1996). "High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **28**:255–267.
- Keilbach A., Ruth P., Hofmann F. (1992). "Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies." Eur J Biochem **208**(2): 467-73.
- Kitazawa T., Eto M., Woodsome T.P., Brautigan D.L. (2000). "Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility." J Biol Chem **275**(14): 9897-900.
- Komalavilas P., Shah P.K., Jo H, Lincoln T.M. (1999). "Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **274**(48): 34301-9.
- Kuhn M. (2003). "Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A." Circ Res **93**(8): 700-9.
- Landgraf W., Hofmann F., Pelton J.T., Huggins J.P. (1990). "Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism." Biochemistry **29**(42): 9921-8.
- Lane P. und Gross S. S. (2000). "The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity." Acta Physiol Scand **168**(1): 53-63.
- Lee M.R., Li L., Kitazawa T. (1997). "Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase." J Biol Chem **272**(8): 5063-8.
- Lippiat J.D., Standen N.B., Harrow I.D., Phillips S.C., Davies N.W. (2003). "Properties of BK(Ca) channels formed by bicistronic expression of hSloalpha and beta1-4 subunits in HEK293 cells." J Membr Biol **192**(2): 141-8.

- Liu Q. und Gross S. S. (1996). "Binding sites of nitric oxide synthases." Methods Enzymol **268**: 311-24.
- Loeb A.L., Izzo N.J. Jr., Johnson R.M., Garrison J.C., Peach M.J. (1988). "Endothelium-derived relaxing factor release associated with increased endothelial cell inositol trisphosphate and intracellular calcium." Am J Cardiol **62**(11): 36G-40G.
- Lohmann S.M., Vaandrager A.B., Smolenski A., Walter U., De Jonge H.R. (1997). "Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases." Trends Biochem Sci **22**(8): 307-12.
- Lopez M.J., Wong S.K., Kishimoto I., Dubois S., Mach V., Friesen J., Garbers D.L., Beuve A. (1995). "Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide." Nature **378**(6552): 65-8.
- Loscalzo J. und Welch G. (1995). "Nitric oxide and its role in the cardiovascular system." Prog Cardiovasc Dis **38**(2): 87-104.
- Markert T., Vaandrager A.B., Gambaryan S., Pöhler D., Häusler C., Walter U., De Jonge H.R., Jarchau T., Lohmann SM. (1995). "Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." J Clin Invest **96**(2): 822-30.
- Massberg S., Sausbier M., Klatt P., Bauer M., Pfeifer A., Siess W., Fässler R., Ruth P., Krombach F., Hofmann F. (1999). "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." J Exp Med **189**(8): 1255-64.
- Minami K., Fukuzawa K., Nakaya Y., Zeng X.R., Inoue I. (1993). "Mechanism of activation of the Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells." Life Sci **53**(14): 1129-35.
- Miyazawa T., Ogawa Y., Chusho H., Yasoda A., Tamura N., Komatsu Y., Pfeifer A., Hofmann F., Nakao K. (2002). "Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification." Endocrinology **143**(9): 3604-10.
- Moncada S., Palmer R.M. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-42.

- Morbidelli L., Chang C.H., Douglas J.G., Granger H.J., Ledda F., Ziche M. (1996). "Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium." Am J Physiol **270**(1 Pt 2): H411-5.
- Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Katsuki S., Kimura H. (1978). "Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin." Adv Cyclic Nucleotide Res **9**: 145-58.
- Murray R. K. und Kotlikoff M. I. (1991). "Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells." J Physiol **435**: 123-44.
- Nathan C. und Xie Q. W. (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." Cell **78**(6): 915-8.
- Neher E. und Sakmann B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Nelson M.T., Cheng H., Rubart M., Santana L.F., Bonev A.D., Knot H.J., Lederer W.J. (1995). "Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks." Science. 1995 Oct 27;270(5236):633-7.
- Orio P., Rojas P., Ferreira G., Latorre R. (2002). "New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits." News Physiol Sci **17**: 156-61.
- Orstavik S., Solberg R., Taskén K., Nordahl M., Altherr M.R., Hansson V., Jahnsen T., Sandberg M. (1996). "Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 759-65.
- Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-6.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-6.
- Pfeifer A., Klatt P., Massberg S., Ny L., Sausbier M., Hirneiss C., Wang G.X., Korth M., Aszódi A., Andersson K.E., Krombach F., Mayerhofer A., Ruth P., Fässler R., Hofmann F. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." Embo J **17**(11): 3045-51.

- Pfeifer A., Ruth P., Dostmann W., Sausbier M., Klatt P., Hofmann F. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **135**: 105-49.
- Pfitzer G. (2001). "Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle." J Appl Physiol **91**(1): 497-503.
- Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. (1990). "Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 10043-7.
- Rasmussen H., Takuwa Y., Park S. (1987). "Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction." Faseb J **1**(3): 177-85.
- Rubanyi G.M., Romero J.C., Vanhoutte P.M. (1986). "Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor." Am J Physiol **250**(6 Pt 2): H1145-9.
- Russwurm M., Behrends S., Harteneck C., Koesling D. (1998). "Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase." Biochem J **335** (Pt 1): 125-30.
- Sadoshima J., Akaike N., Kanaide H., Nakamura M. (1988). "Cyclic AMP modulates Ca-activated K channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas." Am J Physiol **255**(4 Pt 2): H754-9.
- Salerno J.C., Harris D.E., Irizarry K., Patel B., Morales A.J., Smith S.M., Martasek P., Roman L.J., Masters B.S., Jones C.L., Weissman B.A., Lane P., Liu Q., Gross S.S. (1997). "An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase." J Biol Chem **272**(47): 29769-77.
- Sandberg M., Natarajan V., Ronander I., Kalderon D., Walter U., Lohmann S.M., Jahn (1989). "Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat." FEBS Lett **255**(2): 321-9.
- Sausbier M., Schubert R., Voigt V., Hirneiss C., Pfeifer A., Korth M., Kleppisch T., Ruth P., Hofmann F. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." Circ Res **87**(9): 825-30.
- Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong X., Huber A., Neubauer G., Wang G.X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., Hofmann F., Ruth P. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." Nature **404**(6774): 197-201.

- Schlossmann J. und Hofmann F. (2005). "cGMP-dependent protein kinases in drug discovery." Drug Discov Today **10**(9): 627-34.
- Schreiber M., Yuan A., Salkoff L. (1999). "Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels." Nat Neurosci **2**(5): 416-21.
- Shah M. und Haylett D. G. (2000). "The pharmacology of hSK1 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels expressed in mammalian cell lines." Br J Pharmacol **129**(4): 627-30.
- Shen K.Z., Lagrutta A., Davies N.W., Standen N.B., Adelman J.P., North R.A. (1994). "Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation." Pflugers Arch **426**(5): 440-5.
- Shesely E.G., Maeda N., Kim H.S., Desai K.M., Kregge J.H., Laubach V.E., Sherman P.A., Sessa W.C., Smithies O. (1996). "Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13176-81.
- Somlyo A. P. und Somlyo A. V. (2003). "Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." Physiol Rev **83**(4): 1325-58.
- Somlyo A.V., Phelps C., Dipierro C., Eto M., Read P., Barrett M., Gibson J.J., Burnitz M.C., Myers C., Somlyo A.P. (2003). "Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants." Faseb J **17**(2): 223-34.
- Sonnenburg W. K. und Beavo J. A. (1994). "Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis." Adv Pharmacol **26**: 87-114.
- Sweeney H.L., Yang Z., Zhi G., Stull J.T., Trybus K.M. (1994). "Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1490-4.
- Tang K.M., Wang G.R., Lu P., Karas R.H., Aronovitz M., Heximer S.P., Kaltenbronn K.M., Blumer K.J., Siderovski D.P., Zhu Y., Mendelsohn M.E. (2003). "Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure." Nat Med **9**(12): 1506-12.
- Taniguchi J., Furukawa K.I., Shigekawa M. (1993). "Maxi K<sup>+</sup> channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells." Pflugers Arch **423**(3-4): 167-72.

- Tomioka H., Hattori Y., Fukao M., Sato A., Liu M., Sakuma I., Kitabatake A., Kanno M. (1999). "Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions." J Vasc Res **36**(4): 311-20.
- Tonner P. H. und Scholz J. (1999). "[The NO/cGMP signal transduction system: a central target for anesthetics?]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **34**(2): 78-89.
- Umans J. G. und Levi R. (1995). "Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure." Annu Rev Physiol **57**: 771-90.
- Vanhoutte P. M. und Shimokawa H. (1989). "Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm." Circulation **80**(1): 1-9.
- Vasan R.S., Beiser A., Seshadri S., Larson M.G., Kannel W.B., D'Agostino R.B., Levy D. (2002). "Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study." Jama **287**(8): 1003-10.
- Wagner C., Pfeifer A., Ruth P., Hofmann F., Kurtz A. (1998). "Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression." J Clin Invest **102**(8): 1576-82.
- Wernet W., Flockerzi V., Hofmann F. (1989). "The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **251**(1-2): 191-6.
- White K. A. und Marletta M. A. (1992). "Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein." Biochemistry **31**(29): 6627-31.
- Wooldridge A.A., MacDonald J.A., Erdodi F., Ma C., Borman M.A., Hartshorne D.J., Haystead T.A. (2004). "Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides." J Biol Chem **279**(33): 34496-504.
- Xia C., Bao Z., Yue C., Sanborn B.M., Liu M. (2001). "Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases." J Biol Chem **276**(23): 19770-7.
- Xia X.M., Ding J.P., Lingle C.J. (1999). "Molecular basis for the inactivation of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells." J Neurosci **19**(13): 5255-64.
- Yamada, K. (1998). "[Role of nitric oxide in learning and memory processes]." Nippon Yakurigaku Zasshi **111**(2): 87-96.

- Zhou X.B., Arntz C., Kamm S., Motejlek K., Sausbier U., Wang G.X., Ruth P., Korth M. (2001). "A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase." J Biol Chem **276**(46): 43239-45.
- Zhou X.B., Schlossmann J., Hofmann F., Ruth P., Korth M. (1998). "Regulation of stably expressed and native BK channels from human myometrium by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase." Pflugers Arch **436**(5): 725-34.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 1: Darstellung der Signalkaskade zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei der Kontraktion glatter Muskelzellen
- Abbildung 2: schematische Darstellung der sGC vermittelten Muskelrelaxation
- Abbildung 3: dreiteiliger Aufbau der cGKI
- Abbildung 4: schematische Darstellung der cGK-Isoformen
- Abbildung 5: schematische Darstellung der cGKI vermittelten Muskelrelaxation
- Abbildung 6: Goldmann-Hodgkin-Katz Gleichung zur Berechnung des Membranpotentials
- Abbildung 7: Phylogenie kalziumabhängiger Kaliumkanäle
- Abbildung 8: schematischer Aufbau der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit des BK-Kanals
- Abbildung 9: Struktur des selektiven BK-Kanalblockers Iberiotoxin
- Abbildung 10: schematische Darstellung von patch-clamp-Konfigurationen
- Abbildung 11: schematische Darstellung des Pulsprotokolls
- Abbildung 12: Messanordnung zur Bestimmung von whole-cell Strömen
- Abbildung 13: Strukturformel der Komplexverbindung DEA-NO
- Abbildung 14: Formel zur Ermittlung der  $P_{open}$  des Ionenkanals
- Abbildung 15: Bestimmung der Ionenleitfähigkeit des BK-Kanals
- Abbildung 16: Strom-Spannungskurve des BK-Kanals
- Abbildung 17: Wirknachweis von NO und Iberiotoxin an der WT-Maus
- Abbildung 18: Wirknachweis von DEA-NO und Iberiotoxin an der KO-Maus
- Abbildung 19: Rekonstitutionsversuche

Abbildung 20: Strom-Spannungsbeziehung der BK-Ströme

Abbildung 21: Kreuzreaktivität zwischen cGMP und cAMP

Abbildung 22: endothelabhängige Vasorelaxation

Tabelle 1: Gegenüberstellung der NOS-Isoenzyme

Tabelle 2: Gegenüberstellung der konstitutiven und der induzierbaren NOS

Tabelle 3: Klassifikation der kalziumabhängigen Kaliumkanäle

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

ANP	atrielles natriueretisches Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BK-Kanal	big conductance K <sup>+</sup> -channal
BNP	brain-typ natriuretic peptide
CaMK II	Calmodulin-abhängige Myosinkinase II
camp	cyklische Adenosinmonophosphat
CAP	catabolite activator protein
cGK	cGMP-aktivierte Proteinkinase
cGMP	cyklische Guanosinmonophosphat
CNG-channel	Cyclic-nucleotide-gated channel
CNP	C-type natriuretic peptide
DAG	Diacylglycerin
DEA-NO	Diethylamin-Nitrat
EDRF	endothelial-derived relaxing factor
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavinadenosindiphosphat
FMN	Flavinmononucleotid
GC	Guanylatcyclase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

IbTX	Iberiotoxin
IK-Kanal	Intermediate conductance K <sup>+</sup> -channel
IL-10	Interleukin-10
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Insositol-1,4,5-Triphosphat
IRAG	IP <sub>3</sub> -receptor-associated cGKI-substrate
LPS	Lipopolysaccharide
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
Maxi K-Kanal	kalziumabhängiger Kaliumkanal
MLC	myosin light-chain
MLCK	myosin light-chain kinase
MLCP	myosin light-chain phosphatase
MLC-P	activated (phosphorylated) myosin light-chain
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MYPT 1	myosinphosphatase target subunit 1
NADPH	Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO – Synthase
O <sup>2</sup>	Sauerstoff

PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
pGC	particuläre Guanylatcyclase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RCK	regulator of K-Conductance
RGS	regulator of G-protein signalling
Rho-GEF	Rho-guanine nucleotide exchange factors
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA	PKA aktivierte Kalziumpumpe
sGC	lösliche (soluble) Guanylatcyclase
SK-Kanal	small conductance K <sup>+</sup> -channel
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TEA	Triethylammoniumacetat
TGF	tissue growth factor
THB	Tetrahydrobiopterin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

### 8.3 Publikationshinweis

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt et al. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." Circ Res **87**(9): 825-30.

## 9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. F. Hofmann, Direktor des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Durch seinen unermüdlichen Optimismus, seinen analytischen Blick und seinem Interesse an dieser Arbeit hat er ganz wesentlich zu ihrem erfolgreichen Gelingen beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Initiator und Betreuer dieser Arbeit, Herrn Professor Dr. Thomas Kleppisch. Er hat diese Arbeit sowohl wissenschaftlich als auch praktisch hervorragend unterstützt. Seine unermessliche Geduld und sein großes Interesse haben entscheidend zum Fortgang der Arbeit beigetragen.

Ebenso gilt mein Dank all den Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.

Meiner Familie und meiner Frau danke ich ganz herzlich für ihre Unterstützung.