

**Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand des ANP-
Rezeptors GC-A in der Aorta**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Omar Al-Oshari

aus Otma/Dhamar, Jemen

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Anatomie und Zellbiologie, Arbeitsgruppe Signaltransduktion

Gutachter: Prof. Dr. med. Ralf Middendorff

Gutachter: PD Dr. Christian Troidl

Tag der Disputation: 28.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Natriuretische Peptide	1
1.1.1. Biosynthese, Aufbau und Funktion der natriuretischen Peptide	2
1.1.1.1 ANP	3
1.1.1.2 BNP	3
1.1.1.3 CNP.....	3
1.2 Rezeptoren für natriuretische Peptide	4
1.2.1 Expressionsorte und Funktionen der NP-Rezeptoren (GC-A, GC-B und NPR-C).....	4
1.2.1.1 GC-A	4
1.2.1.2 GC-B.....	5
1.2.1.3 NPR-C	6
1.2.2 Aufbau der Rezeptoren GC-A und GC-B	7
1.2.2.1 Extrazelluläre Bindungsdomäne	8
1.2.2.2 Membranregion	
1.2.2.3 Intrazelluläre Domäne	8
1.2.2.3.1 Kinase-Homologie-Domäne (KHD)	8
1.2.2.3.2. Hinge Region	8
1.2.2.3.3 Katalytische Domäne	9
1.3 Signalwege von GC-A und GC-B	8
1.3.1 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP).....	10
1.3.2 cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG).....	11
1.3.3 cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs).....	11
1.3.4 cGMP-gesteuerte Ionenkanäle	12
1.4 cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)	12
1.5 Aktivierung und Regulation von GC-A und GC-B	12
1.5.1 Aktivierung von GC-A und GC-B.....	12

Inhaltsverzeichnis

1.5.2 Regulation von GC-A und GC-B	14
1.5.2.1 Phosphorylierung von GC-A und GC-B	14
1.5.2.2 Homologe Desensitisierung	15
1.5.2.3 Heterologe Desensitisierung	16
1.6 Expression von GC-A und GC-B in der Aorta	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Verwendete Chemikalien	20
2.1.2 Antikörper	21
2.1.2.1 Primärantikörper	21
2.1.2.2 Sekundärantikörper	22
2.1.3 Material aus Zellkulturen	22
2.1.3.1 HEK-GC-A	22
2.1.3.2 MA-10- Zellen	22
2.1.3.3 Rattenaorten	22
2.1.4 Verwendete Apparaturen / Utensilien / Geräte	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Präparation und Inkubation der Rattenaorten	24
2.2.1.1 Lösungen	24
2.2.1.2 Durchführung	24
2.2.2 Membranproteinpräparationen	25
2.2.2.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:	25
2.2.2.2 Verwendung der Phosphatase-Inhibitoren	26
2.2.2.3 Versuchsdurchführung	26
2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.2.3.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	27

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.2 Durchführung	27
2.2.4 Western Blot	28
2.2.4.1 Phos-Tag™ -Methode	29
2.2.4.2 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	30
2.2.4.3 Versuchsdurchführung	32
2.2.4.3.1 Vorbereitung der Proben	32
- Gießen der Gele	32
- Trenngel ; Normalgel (6 %)	32
- Trenngel ; Phos-Tag™-Gel (6 %)	32
- Sammelgel	33
- Ablauf der Gelelektrophorese	33
- Proteintransfer	34
- Membranfärbung und -blockierung	34
- Immundetektion	35
- Strippen (Aufhebung der Antikörper-Bindungen).....	36
2.2.5 Dephosphorylierungsassay	36
2.2.6 Densitometrie	36
2.2.7 Datenanalyse	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Etablierung der Phos-tag SDS-PAGE Methode zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen in Western Blot Analysen	38
3.2 Einsatz der Phos-tag SDS-PAGE Methode zur Analyse des Phosphorylierungs- -status von GC-A	40
3.3 Isolierung von Rattenaorten und Generierung von Membranproteinen	43
3.4 Untersuchungen zum Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren	44
3.5 CNP induziert die Zunahme von GC-A- Phosphorylierung in Rattenaorten	46
3.6 Untersuchungen mit Kinase-Inhibitoren	48
4. Diskussion	49

Inhaltsverzeichnis

4.1 Expression von GC-A im Gefäßabschnitt Aorta	49
4.2 Komplexe Phosphorylierung und Desensitisierung von GC-A.....	50
4.3 Sensitisierung von GC-A durch CNP.....	51
4.4 Potenzielle Rolle der natriuretischen Peptide und ihrer Rezeptoren für die Windkesselfunktion der Aorta.....	51
5. Zusammenfassung.....	54
6. Abkürzungsverzeichnis.....	56
7. Abbildungsverzeichnis.....	58
8. Literaturverzeichnis.....	59
9. Ehrenwörtliche Erklärung.....	70
10. Danksagung.....	71

1. Einleitung

1.1 Natriuretische Peptide

Zu den natriuretischen Peptiden gehören das atriale natriuretische Peptid (ANP), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), die strukturell verwandt, genetisch aber unterschiedlich sind und an der Regulation von Blutvolumen, Blutdruck, ventrikulärer Hypertrophie, pulmonaler Hypertonie, Fettstoffwechsel und Knochenwachstum beteiligt sind (Potter et al. 2006; Kuhn 2016).

Ende der 1960er Jahre begannen de Bold und Kollegen Vorhofextrakte zu charakterisieren. Sie fanden heraus, dass sich der Inhalt dieser Extrakte abhängig vom Wasser-Elektrolyt-Haushalt veränderte (de Bold et al. 1981). Anhand von weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Vorhofextrakte einen potenten Faktor mit diuretischer und natriuretischer Wirkung enthalten, welcher durch Stimulation der renalen Natrium- und Wassersekretion den Blutdruck reduziert und damit zum ersten Mal einen funktionellen Zusammenhang zwischen Herz und Niere zeigte (de Bold et al. 1981). Der Faktor erhielt unterschiedliche Bezeichnungen wie Atrialer natriuretischer Faktor (ANF), Cardiodilatin, Cardionatrin, Atriopeptin und ANP, wobei letztere Bezeichnung heute am häufigsten verwendet wird (Potter et al. 2009).

Das zweite Peptid, das zur Familie der natriuretischen Peptide zählt, wurde anfänglich als „brain natriuretic peptide“ bezeichnet, da es zuerst aus Schweinhirnextrakten isoliert wurde (Sudoh et al. 1988). Allerdings zeigten weitere Studien, dass dieses Peptid auch in hohen Konzentrationen im Herzventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz oder Herzinfarkt nachweisbar war (Mukoyama et al. 1991a). Da dieses Peptid wie ANP im Herzen gebildet wird und ähnliche Struktur sowie Funktion wie ANP aufweist (Sudoh et al. 1988), wurde es in B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) umbenannt. ANP und BNP ist gemeinsam, dass sie zum einen bei Dehnung der Herzvorhöfe vermehrt sezerniert werden (de Bold et al. 1986; Goetze et al. 2020). Zum anderen binden beide Peptide mit fast gleich starker Affinität an den gleichen membranständigen Rezeptor, Guanylatzyklase A (GC-A), der auch NPR-A (Natriuretic peptide rezeptor-A) genannt wird (Kuhn 2016). Das dritte natriuretische Peptid wurde erstmalig im Jahre 1991 aus Schweinhirnextrakten aufgrund seiner Fähigkeit zur

Einleitung

Relaxation glatter Muskelzellen isoliert und als C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) bezeichnet (Sudoh et al. 1990).

Die drei reifen natriuretischen Peptide (ANP, BNP und CNP) besitzen einen Ring aus 17 Aminosäuren (siehe Abb. 1.1), welcher durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Aminosäureresten geschlossen wird (Stein und Levin 1998; Potter 2011b). Dieser Ring ist essentiell für die biologische Aktivität der natriuretischen Peptide.

1.1.1 Biosynthese , Aufbau und Funktion der natriuretischen Peptide

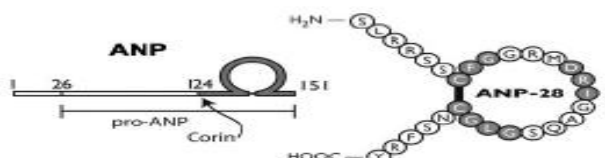

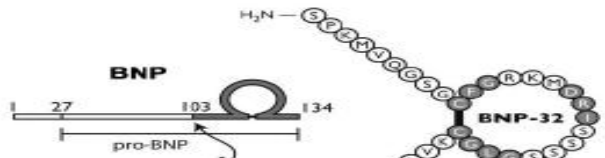
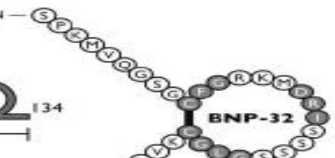
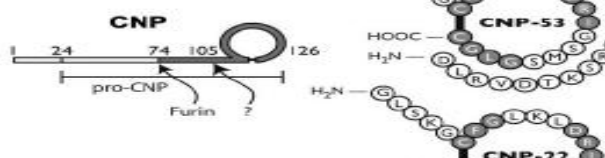
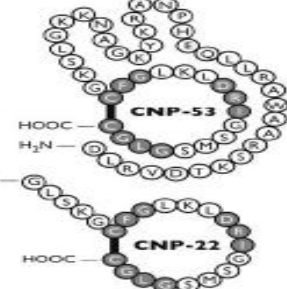
Syntheseort	Proteolytische Prozessierung	Reifes Peptid
Vorhof Ventrikel Niere		
Ventrikel Vorhof		
Knochen Gehirn Endothel Herz		

Abb. 1.1: Syntheseort und Aufbau der natriuretischen Peptide (Modifizierte Version nach Potter et al. 2006)

Alle natriuretischen Peptide werden als Prä-Prohormone synthetisiert. Nachfolgend wird eine Signalsequenz vom jeweiligen Prä-Prohormon durch eine Protease zu Pro-ANP, -BNP oder -CNP abgespalten, welche im letzten Schritt durch weitere Proteasen in die reife

Einleitung

Form (ANP, BNP und CNP) proteolytisch prozessiert werden. Die Umwandlung in die reife bzw. biologisch aktive Form erfolgt bei ANP durch Corin, bei BNP durch eine unbekannte Protease und bei CNP durch Furin. Zudem besitzen die drei Peptide (ANP, BNP und CNP) einen Ring aus 17 Aminosäureresten, welcher durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Aminosäureresten geschlossen wird.

1.1.1.1 ANP

Humanes Präpro-ANP besteht aus 151 Aminosäuren und wird durch Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz im Bereich der 126. Aminosäure schließlich zu Pro-ANP, welches in Vorhofgranula dominiert. Durch die membranständige Serinprotease Corin wird vom C-Terminus des Pro-ANP die biologisch aktive Form ANP (28 Aminosäuren) abgespalten (Yan et al. 2000). ANP wird zum größten Teil im Herzvorhof synthetisiert und in Granula gespeichert, wobei geringe Konzentrationen auch im Ventrikel und in der Niere gebildet werden (Abb. 1.1) (Potter et al. 2006). ANP wird bei Überdehnung der Herzvorhofwand, bedingt durch ein gesteigertes intravasales Volumen, vermehrt ausgeschüttet (Goetze et al. 2020).

1.1.1.2 BNP

BNP wird als Prä-Prohormon, bestehend aus 134 Aminosäuren, synthetisiert, aus dem sich Pro-BNP durch Abspaltung einer Signalsequenz im Bereich der 108. Aminosäure entwickelt. Das Pro-BNP wird nachfolgend proteolytisch in 2 Fragmente, biologisch aktives BNP (32 Aminosäuren) und das 76 Aminosäuren umfassende und biologisch inaktive NT-proBNP, gespalten. BNP wird v. a. im Vorhof und Ventrikel synthetisiert, in denen sich hohe Konzentrationen insbesondere bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder Herzinfarkt nachweisen ließen (Mukoyama et al. 1991a; Potter et al. 2006; Goetze et al. 2020).

2.1.1.3 CNP

Humanes Pro-CNP setzt sich aus 103 Aminosäureresten zusammen. Durch die intrazelluläre Endoprotease Furin wird das Pro-CNP zum reifen CNP-53 (53 Aminosäuren) prozessiert (Wu et al. 2003). CNP-53 wird in manchen Geweben enzymatisch zu CNP-22 (22 Aminosäuren) prozessiert (Potter et al. 2006). Obwohl

CNP-53 und CNP-22 ähnliche Funktionen haben (Yeung et al. 1996), ist deren Gewebsexpression unterschiedlich. CNP-22 ist vorwiegend im humanen Blutplasma (Stingo et al. 1992) und Liquor (Togashi et al. 1992) nachweisbar, während CNP-53 im Gehirn (Totsune et al. 1994), Herz (Minamino et al. 1991) und in den Endothelzellen (Stingo et al. 1992) die Hauptform repräsentiert. Zudem wird CNP, dessen Ausschüttung durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird, nicht in Granula gespeichert, (Suga et al. 1993; Potter et al. 2006; Goetze et al. 2020).

1.2 Rezeptoren für natriuretische Peptide

Bei Säugetieren gibt es drei Rezeptoren für natriuretische Peptide (NPs): NP-Rezeptor-A (NPR-A), NPR-B und NPR-C (Tab. 1.2). Sie werden auch als Guanylatzyklase-A (GC-A), GC-B und Clearance-Rezeptor bezeichnet (Potter 2005; Potter et al. 2006), wobei GC-A und GC-B zwei von insgesamt sieben bekannten Guanylatzyklasen, GC-A bis GC-G, repräsentieren (Potter 2011a).

1.2.1 Expressionsorte und Funktionen der NP-Rezeptoren (GC-A, GC-B und NPR-C)

1.2.1.1 GC-A

GC-A bindet neben ANP auch BNP mit etwas geringerer und CNP mit viel geringerer Affinität ($ANP \geq BNP \gg CNP$) (Bennett et al. 1991; Potter et al. 2009). Außer in den glatten Gefäßmuskelzellen wird GC-A in hohen Konzentrationen auch in Niere, Nebenniere, Lunge, Leber, im Gehirn und Fettgewebe exprimiert (Goy et al. 2001; Bryan et al. 2006; Potter 2011a; Kuhn 2016). Eine Synthese findet in geringerem Umfang auch im Herzgewebe und Kolon (Goy et al. 2001; Dickey et al. 2007; Kuhn 2016) statt. Durch ANP-induzierte cGMP-Produktion ist GC-A in vielen Funktionen involviert und spielt eine essentielle Rolle für die zentrale Steuerung von Blutdruck und Wasser-Elektrolyt-Haushalt. Spezifische Effekte zeigen sich v. a. im Gefäßsystem (Induktion der Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität), in der Niere (Stimulierung der Natriuresis und Diuresis) sowie in der Nebenniere (Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)) (Potter 2011a; Kuhn 2016). Weitere durch GC-A ausgelöste Effekte sind in Abb. 1.2 dargestellt:

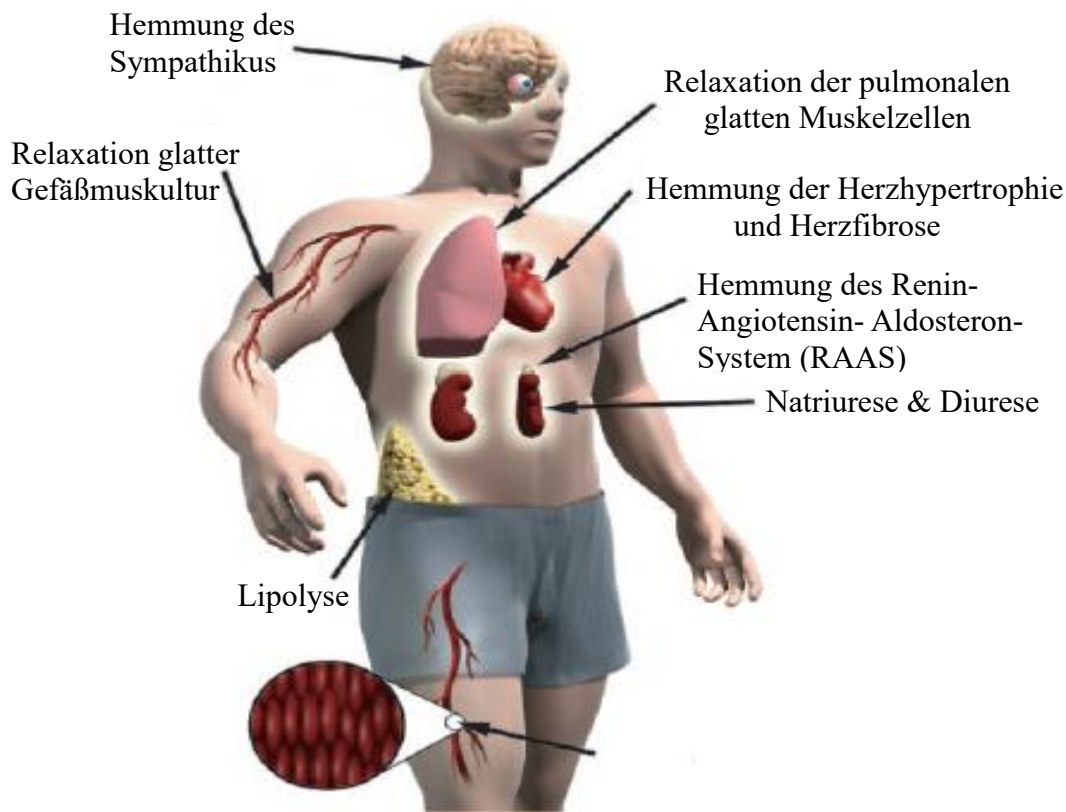


Abb. 1.2 Übersicht über wichtige Zielorgane und lokale Effekte von GC-A. Modifizierte Abbildung nach Potter et al. 2006.

1.2.1.2 GC-B

GC-B ist der spezifische Rezeptor für CNP und weist eine ähnliche Topologie und Struktur wie GC-A auf (Potter 2011a), während ANP und BNP keine natürlichen Liganden dieses Rezeptors sind (Koller et al. 1991; Kuhn 2016). Außer im Knochen, Gehirn, Uterus und im Herzen wird GC-B in hohen Konzentrationen auch in der Niere, Leber, Lunge, Nebenniere, in der glatten Gefäßmuskulatur sowie in den Fibroblasten und Ovarien exprimiert (Garbers 1992; Bryan et al. 2006; Potter 2011a; Kuhn 2016).

Durch Stimulierung der cGMP-Produktion ist der CNP/GC-B-Signalweg essentiell für das Knochenwachstum (Stimulierung der enchondralen Ossifikation), für die weibliche Reproduktion und Fertilität (Induktion der Eizellreifung) sowie für die Regulation der Herzhypertrophie und des kardialen Remodelings (Del Ry 2013; Kuhn 2016). Zudem spielt der CNP/GC-B-Signalweg eine wesentliche Rolle bei der lokalen Regulation des

Einleitung

vaskulären Tonus/Remodelings und vermittelt auch kardioprotektive Effekte, bspw. antiinflammatorische (Rattenmodell bei Myokarditis), antihypertrophische sowie antifibrotische Effekte (Rattenmodell bei Myokardinfarkt) (Soeki et al. 2005; Ogawa et al. 2007).

1.2.1.3 NPR-C

NPR-C hat keine cGMP-produzierende Aktivität und bindet alle drei natriuretischen Peptide mit ähnlicher Affinität (Pandey 2014). Außer in der glatten Gefäßmuskulatur, Niere und Nebenniere werden NPR-C und /oder seine mRNA auch im Gehirn, Mesenterium und im Herzen gebildet (Wilcox et al. 1991; Nagase et al. 1997). Durch rezeptorvermittelte Internalisierung sowie nachfolgender Degradation kontrolliert NPR-C die Konzentrationen der zirkulierenden natriuretischen Peptide, daher wird er auch Clearance-Rezeptor genannt (Matsukawa et al. 1999). Selektiv an NPR-C bindet ein synthetisches Peptid („C-ANF“), das zur Identifizierung des Rezeptors im Rahmen von Crosslinking-Experimenten verwendet werden kann (Müller et al. 2004).

Rezeptor	Ligand	Gewebsexpression	Hauptfunktion
GC-A	ANP \geq BNP	Glatte Gefäßmuskulatur, Niere, Nebenniere, Gehirn, Lunge, Leber, Fettgewebe, Herz	Arterieller Blutdruck und Blutvolumen ↓, RAAS ↓, Diurese & Natriurese ↑, Gefäßpermeabilität ↑
GC-B	CNP	Gehirn, Lunge, Knochen, Fettgewebe, Herz, Niere Ovarien, Nebenniere Glatte Gefäßmuskulatur, Uterus, Fibroblasten	Regulation der enchondralen Ossifikation und Eizellreifung, Regulation des Gefäßtonus und der Vasodilatation, Herzfibrose ↓
NPR-C	ANP, CNP und BNP	Niere, Nebenniere, Glatte Gefäßmuskulatur,	Kontrolle der lokalen Konzentrationen von natriuretischen Peptiden

Einleitung

		Gehirn, Herzen, Mesenterium	
--	--	--------------------------------	--

Tab. 1.1 Übersicht über wichtige Syntheseorte, Liganden und Funktionen der natriuretischen Peptidrezeptoren.

1.2.2 Aufbau der Rezeptoren GC-A und GC-B

GC-A und GC-B bestehen aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer Membranregion und einer intrazellulären Domäne. Letztere weist neben einer Kinase-Homologie-Domäne (KHD) und einer so genannten Hinge Region die katalytische Domäne (KD) mit der Guanylatzyklase-Aktivität auf (Garbers 1992; Potter 2011a; Somanna et al. 2013).

Extrazellulär
Ligand

Extrazelluläre
Bindungsdomäne

Membranregion

Kinase-Homologie-
Domäne (KHD)

Hinge Region

Katalytische
Domäne (KD)

Intrazellulär

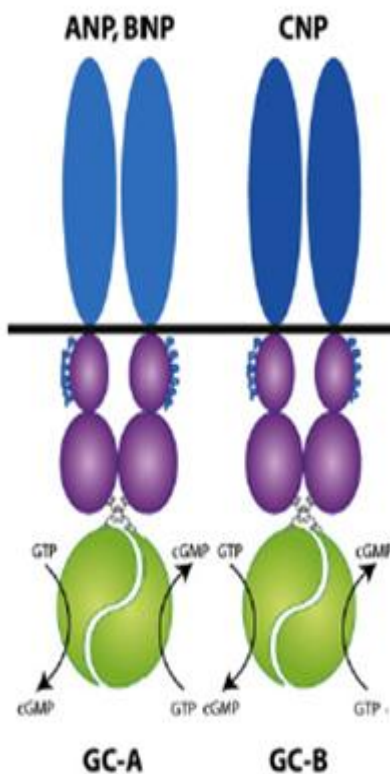


Abb. 1.3: Schematische Darstellung von GC-A und GC-B

GC-A und GC-B bestehen aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer kurzen Membranregion und einer intrazellulären Domäne, welche sich wiederum aus einer Kinase-Homologie-Domäne (KHD), einer so genannten Hinge Region und einer katalytischen Domäne (KD) zusammensetzt. Die kleinen blauen Ps an der Kinase-Homologie-Domäne (KHD) stellen Phosphorylierungsstellen dar. Beide Rezeptoren agieren als Dimere. ANP, Atriales natriuretisches Peptid.

Einleitung

BNP, B-Typ natriuretisches Peptid; cGMP, zyklisches Guanosin- monophosphat; CNP, C-Typ natriuretisches Peptid; GC-A, Guanylatzyklase A; GC-B, Guanylatzyklase B, GTP, Guanosintriphosphat. Modifizierte Version nach Potter 2011a.

1.2.2.1 Extrazelluläre Bindungsdomäne

Die extrazelluläre Bindungsdomäne repräsentiert diejenige Region, worin sich GC-A und GC-B am meisten unterscheiden und die die Affinität zu den natriuretischen Peptiden bestimmt (Potthast und Potter 2005). Diese Bindungsdomäne besteht aus etwa 450 Aminosäuren und verfügt über drei intramolekulare Disulfidbindungen sowie fünf N- Glykosylierungsstellen, welche bei beiden Rezeptoren ähnlich sind (Miyagi und Misono 2000; Potter et al. 2009).

1.2.2.2 Membranregion

Die Membranregion besteht aus ca. 20-25 Aminosäuren und teilt die Rezeptoren in eine extra- und eine intrazelluläre Domäne. Aufgrund ihrer hydrophoben Zusammensetzung (Potter et al. 2006) wird die Verankerung in der Plasmamembran ermöglicht.

1.2.2.3 Intrazelluläre Domäne

Die intrazelluläre Domäne, bestehend aus ca. 570 Aminosäuren, weist neben der Kinase-Homologie-Domäne die Hinge Region und die katalytische Domäne auf.

1.2.2.3.1 Kinase-Homologie-Domäne (KHD)

Die Kinase-Homologie-Domäne besteht aus etwa 250 Aminosäuren (Potter 2005) und befindet sich zwischen der Membran- und Hinge Region (Abb. 1.3). Durch die in der Kinase-Homologie-Domäne enthaltenen Phosphorylierungsstellen wird die Rezeptor-aktivität reguliert (Potter et al. 2006; Kuhn 2016; Edmund et al. 2019). Für GC-A wurden 7 und für GC-B 6 Phosphorylierungsstellen mit ATP-Bindungsdomänen beschrieben. (Potter 2011a; Yoder et al. 2012).

1.2.2.3.2 Hinge Region

Die Hinge Region verbindet die Kinase-Homologie-Domäne mit der katalytischen Domäne und besteht aus ca. 41 Aminosäuren, die eine amphipathische und superspiralisierte α -Helix bilden (Potter 2005). Die Hinge Region ermöglicht die

Einleitung

Dimerisierung der zwei katalytischen Domänen, was für deren Aktivität bedeutsam ist (Wilson und Chinkers 1995).

1.2.2.3.3 Katalytische Domäne

Die carboxyterminale Domäne, auch carboxyterminale Guanylatzyklase-Domäne genannt, besteht aus ca. 250 Aminosäuren und weist eine katalytische Einheit auf, die derjenigen von Adenylatzyklasen verwandt ist (Liu et al. 1997; Potter 2005). Diese Domäne katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP und Pyrophosphat und reguliert nachfolgend cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs), cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) sowie cGMP-gesteuerte Kationenkanäle (Kuhn 2016).

1.3 Signalwege von GC-A und GC-B

ANP, BNP und CNP vermitteln ihre physiologischen Effekte durch Bindung an GC-A bzw. GC-B. Diese Bindung stimuliert die Guanylatzyklase-Aktivität der intrazellulären Domänen und resultiert in einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel (Abb. 1.4), die wiederum cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG I/II), cGMP-gesteuerte Ionenkanäle sowie cGMP-regulierte PDEs aktivieren (Potter et al. 2006; Misono et al. 2011). Darüber hinaus kann cGMP unter bestimmten Bedingungen auch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) stimulieren (Müller et al. 2006).

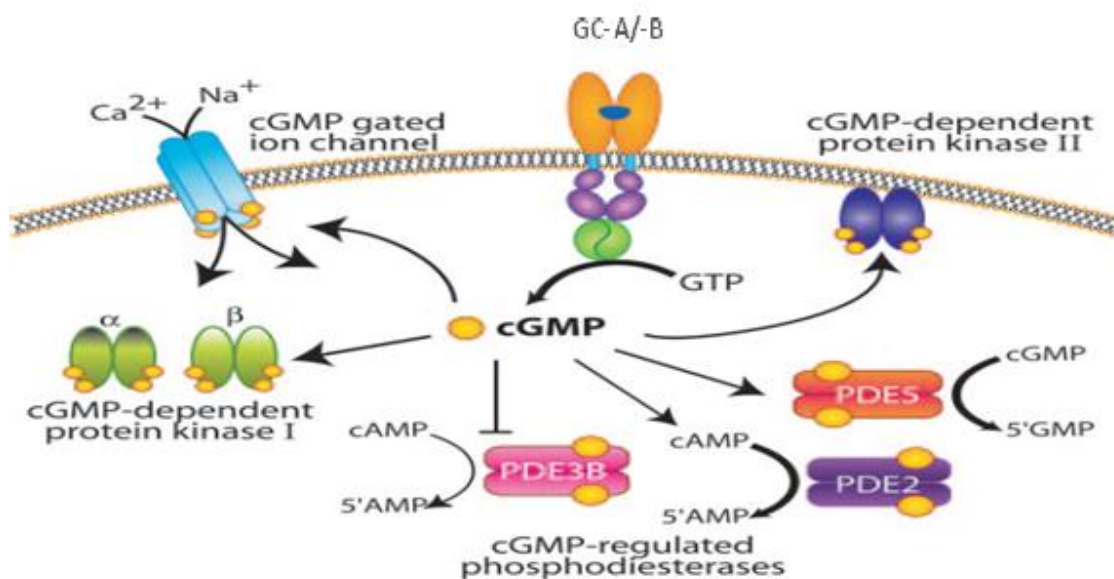


Abb. 1.4: Schematische Darstellung von GC-A/GC-B-Signalwegen:

Der Botenstoff cGMP induziert physiologische Effekte hauptsächlich durch Bindung an drei Proteinklassen: cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs), cGMP-gesteuerte Ionenkanäle sowie cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs). cGMP-gesteuerte Ionenkanäle regeln den Einstrom von Kalzium- und Natriumionen in die Zelle. Die Interaktion von cGMP mit PDEs kann die cGMP-degradierende Aktivität erhöhen (PDE5) und cAMP-degradierende Aktivität entweder verstärken (PDE2) oder hemmen (PDE3B). Die PKG I-Subtypen α und β sind primär cytosolisch, während PKG II Membran-assoziiert ist. Modifizierte Version nach Potter et al. 2006.

1.3.1 Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

Das cGMP wird von löslichen oder membranständigen Guanylatzyklasen aus Guanosintriphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat gebildet und spielt als klassischer sekundärer Botenstoff eine zentrale Rolle bei vielen physiologischen Vorgängen (Kuhn, 2016). Die Bindung von natriuretischen Peptiden an GC-A und GC-B aktiviert deren katalytische Domänen und führt somit zu einem schnellen Anstieg der cGMP-Konzentration (Airhart et al. 2003). Die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) wird durch Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) aktiviert (Pfeifer et al. 1998).

1.3.2 cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG)

PKG ist das wichtigste Zielprotein von cGMP und ist bei vielen physiologischen Prozessen beteiligt (Lorenz et al. 2017). Es gibt zwei PKG-Gene, PKG I- und PKG II-Gen. Das PKG I-Gen wird zur Produktion von zwei Isoenzymen PKG I α und PKG I β alternativ gespleißt (Potter et al. 2006). Beide PKG I-Isoenzyme befinden sich meist im Zytoplasma in löslicher Form und werden in hohem Maße in den Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und im Gehirn gebildet, während PKG II größtenteils membrangebunden ist und in hohen Konzentrationen im Gehirn, Intestinum, Knochen, in der Niere und in den Chondrozyten exprimiert wird (Lorenz et al. 2017). PKG kommt als Dimer vor und besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die jeweils aus einer katalytischen und einer regulatorischen cGMP-bindenden Domäne aufgebaut sind (Francis und Corbin 1999).

Frühere Studien zeigten, dass GC-A in Anwesenheit von ANP durch PKG in vitro phosphoryliert werden kann (Larose et al. 1992). Spätere Studien zeigten auch, dass ANP im Rahmen des ANP/GC-A-Signalweges die Aktivität vom kardialen L-Typ-Calciumkanal durch die intrazelluläre Produktion von cGMP-Molekülen mit nachfolgender Aktivierung der PKG inhibiert (Tohse et al. 1995). Außerdem stimuliert PKG I durch Reduktion der interzellulären Calciumkonzentration sowie der Sensitivität vom kontraktile System die Vasodilatation (Carvajal et al. 2000; Potter et al. 2006). PKG I α reguliert die Sensitivität vom kontraktile System durch Phosphorylierung und Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (Nakamura et al. 1999).

1.3.3 cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs)

Für die Regulation der intrazellulären cGMP-Konzentration sind neben den cGMP-produzierenden auch die cGMP-degradierenden Enzyme verantwortlich. Letztere weisen eine Phosphodiesterase-Aktivität auf, welche durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen die sekundären Botenstoffe, cAMP und cGMP, in die inaktive Form (AMP und GMP) umwandeln (Bender und Beavo 2006; Dunkerly-Eyring und Kass 2020). Es existieren insgesamt 11 PDE-Familien, die aus 21 PDE-Genen hervorgehen, wobei von den 21 PDE-Genen jedoch deutlich mehr als 21 mRNA- und Proteinprodukte, bedingt durch verschiedene Transkriptionsstartstellen und/oder das alternative Spleißen von mRNA-Vorstufen, generiert werden können (Bender und Beavo 2006).

Die Substratspezifität der PDE-Familien ist entscheidend für ihre Rolle im Zellmetabolismus. Drei PDE-Familien (PDE5, PDE6 und PDE9) weisen unter physiologischen Bedingungen nur cGMP-degradierende Aktivität auf, während die PDEs 4, 7 und 8 cAMP-spezifische Phosphodiesterasen darstellen (Bender und Beavo 2006). Die restlichen Familien (PDE1-3, PDE10 und PDE11) können sowohl cAMP also auch cGMP hydrolysieren (Bender und Beavo 2006).

PDE3 bindet cGMP und cAMP mit einer relativ hohen Affinität, wobei PDE3 eine größere hydrolytische Aktivität (V_{max}) für das Substrat cAMP (ca. 10 fach) als für cGMP aufweist (Bender und Beavo 2006). Zudem bindet cGMP kompetitiv an die katalytische Domäne von PDE3, was die cAMP-degradierende Aktivität von PDE3

inhibiert und nachfolgend zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen kann (Mehats et al. 2002; Bender und Beavo 2006). In vaskulären glatten Muskelzellen werden PDE1-5 exprimiert (Lehners et al. 2018) und spielen eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus durch Regulation des intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegels.

1.3.4 cGMP-gesteuerte Ionenkanäle

cGMP vermittelt zelluläre Effekte auch durch die Regulation von Ionenkanälen, welche eine Familie von nichtselektiven Kationenkanälen repräsentieren. Neben cGMP binden diese Ionenkanäle auch cAMP und andere zyklische Nukleotide (Kaupp und Seifert 2002). Die Ionenkanäle wurden erstmalig in den retinalen Photorezeptoren sowie in den olfaktorischen sensorischen Neuronen detektiert (Cook et al. 1987; Dhallan et al. 1990) und werden zudem v. a. in der Niere, Lunge, Nebenniere, Muskulatur, Leber, im Skelet, Kolon, Herz, Pankreas sowie in den Hoden gebildet (Kaupp und Seifert 2002; Matulef und Zagotta 2003; Brown et al. 2006).

1.4 cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)

PKA existiert als Tetramer und umfasst als Holoenzym neben zwei regulatorischen noch zwei katalytische Untereinheiten (Turnham und Scott 2016). PKA wird durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten aktiv, was in eine Konformationsänderung der jeweiligen regulatorischen Untereinheiten mit nachfolgender Stimulation der katalytischen Untereinheiten zur Phosphorylierung von Zielproteinen resultiert (Welch et al. 2010). PKA wird durch PDE3 aktiviert (Shakur et al. 2001), welche wiederum durch cAMP stimuliert und durch cGMP kompetitiv inhibiert werden kann (Mehats et al. 2002; Bender und Beavo 2006).

1.5 Aktivierung und Regulation von GC-A und GC-B

1.5.1 Aktivierung von GC-A und GC-B

GC-A und GC-B befinden sich in drei Aktivitätszuständen (Abb. 1.5): basal, aktiv und desensibilisiert (Potter et al. 2006). Im Basalzustand ist die Guanylatzyklase-Aktivität reprimiert. Die Bindung von ANP an GC-A führt zu einer intramolekularen Konformationsänderung von zwei membrannahen Regionen der extrazellulären Domänen mit nachfolgender Reduktion der intermolekularen Distanz (Obata et al.

Einleitung

2004; Potter et al. 2006). Hierdurch wird das Aktivierungssignal in die Kinase-Homologie-Domäne (KHD) übertragen und führt zur Dimerisierung der katalytischen Domänen und Aktivierung der Guanylatzyklen (Chinkers und Garbers 1989; Potter et al. 2006). Prolongierte Rezeptorexposition mit natriuretischen Peptiden stimuliert die Dephosphorylierung der Kinase-Homologie-Domäne, was zu einer Reduktion der Rezeptoraktivität führt. Nach Aufhebung der Ligand-Rezeptor-Bindung und Rephosphorylierung der Kinase-Homologie-Domäne wird der NP-Rezeptor in den Basalzustand zurückgeführt und kann durch eine erneute Ligandenbindung wieder aktiviert werden (Potter et al. 2006).

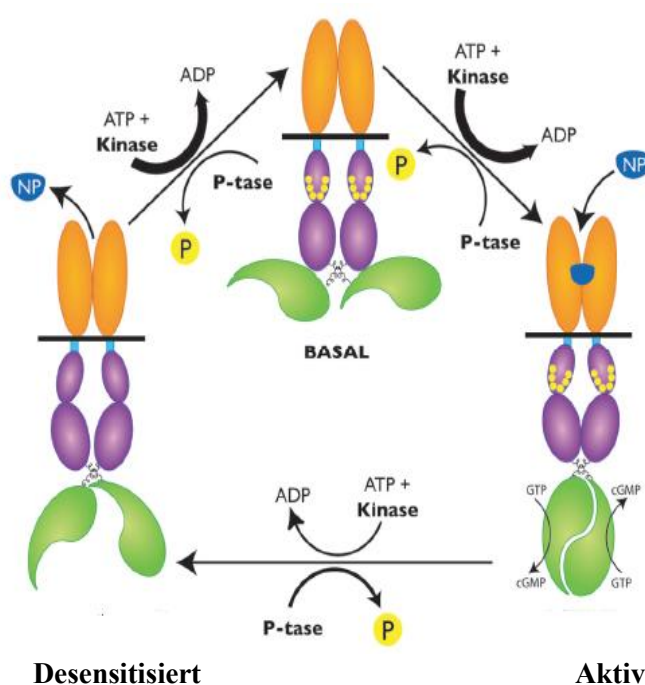


Abb. 1.5: Schema der Aktivitätszustände für GC-A und GC-B

Für GC-A und GC-B existieren drei Aktivitätszustände: basal, aktiv und desensitisiert. Im Basalzustand verfügt die KHD (violett) von GC-A über sieben und von GC-B über sechs Phosphorylierungsstellen (gelb markierte Stellen in den KHDs). Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von GC-A und GC-B (die gelben Ps) deren hormonale Aktivierung ermöglicht.

NPs (blau) binden an phosphorylierte inaktive Rezeptoren und induzieren eine Konformationsänderung, die membrannahahe Regionen der extrazellulären Domänen (orange) zusammenbringt. Dieses Signal führt nachfolgend zur Aufhebung des repressiven Effekts von KHD (violett) auf die KD (grün), was eine Dimerisierung von zwei KDs ermöglicht. Prolongierte Rezeptorexposition mit NPs stimuliert die Dephosphorylierung der KHDs, die in einer Reduktion der Rezeptoraktivität, einer Desensitisierung, resultiert. Durch Aufhebung der Ligand-Rezeptor-Bindung und Rephosphorylierung der KHD werden GC-A und GC-B in den Basalzustand wieder zurückgeführt. KD, Katalytische Domäne; KHD, Kinase-Homologie-Domäne; NP, Natriuretisches Peptid (ANP, BNP und CNP); P-tase; Phosphatase. Modifizierte Version nach Potter et al. 2006.

Einige Studien berichteten über ATP-Effekte auf die Guanylatzyklase-Aktivität. So wurde zum einen eine inhibitorische Wirkung von ATP auf die Guanylatzyklase-Aktivität gezeigt (Sitaramayya et al. 1991). Zum anderen wurde über die essentielle Rolle von ATP für die Regulation der Guanylatzyklase-Aktivität berichtet (Chinkers et al. 1991; Potter und Hunter 1998). Spätere Befunde zeigten, dass ATP die Rezeptoraktivität nicht erhöht, sondern nur deren Phosphorylierungszustand aufrechterhält (Antos et al. 2005). Neuere Studien offenbarten jedoch eine direkte Beteiligung von ATP am ANP/GC-A-Signalweg mit Steigerung der Rezeptoraktivität (Burczynska et al. 2007; Duda et al. 2011).

1.5.2 Regulation von GC-A und GC-B

Körperzellen haben diverse biochemische Mechanismen zur Regulation der Aktivität ihrer Rezeptoren. Dazu gehören Rezeptordegradation nach Internalisierung sowie genetische Kontrolle. Obwohl frühere Studien über Internalisierung von Komplexen mit nachfolgender Degradation berichtet hatten, hat sich heute die Meinung durchgesetzt, dass GC-A ein membranresidentes Protein darstellt und keiner Internalisierung oder Degradation unterliegt (Potter et al. 2009; Dickey et al. 2011; Kuhn 2016). Zu den Regulationsmechanismen, welche die Reaktionsfähigkeit von Rezeptoren direkt beeinflussen, gehören Modifikationen wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Solche spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von GC-A und GC-B (Robinson et al. 2017; Edmund et al. 2019).

1.5.2.1 Phosphorylierung von GC-A und GC-B

Viele Studien zeigten, dass die Aktivität von GC-A und GC-B durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird (siehe Egbert et al. 2014 und Kuhn 2016). Unter basalen Bedingungen ist GC-A an fünf Serin- (Ser-487, Ser-497, Ser-502, Ser-506, und Ser-510) und zwei Threoninresten (Thr-500 und Thr-513) phosphoryliert (Siehe Abb. 1.6). Die analogen Phosphorylierungsstellen von GC-B sind Ser-513, Ser-518, Ser-523, Ser-526 und Thr-516 sowie Thr-529), die wie bei GC-A in der Kinase-Homologie-Domäne lokalisiert sind (Potter und Hunter 1998a; Potter und Hunter 1998b; Schröter et al. 2010; Yoder et al. 2012). Die Mutation von mindestens vier Phosphorylierungsstellen bei GC-A oder allen Phosphorylierungsstellen bei GC-B zu Alanin geht mit einem Verlust der Reaktionsfähigkeit der Rezeptoren auf Stimulierung

Einleitung

durch Peptide einher, während eine Mutation der ersten sechs identifizierten Phosphorylierungsstellen beider Rezeptoren zu Glutamat, welches wie die Phosphatgruppe eine negative Ladung aufweist, die Rezeptoraktivität gar nicht oder nur wenig im Vergleich zu den unmutierten Rezeptoren reduziert (Potter und Potthast 2005; Yoder et al. 2010, 2012).

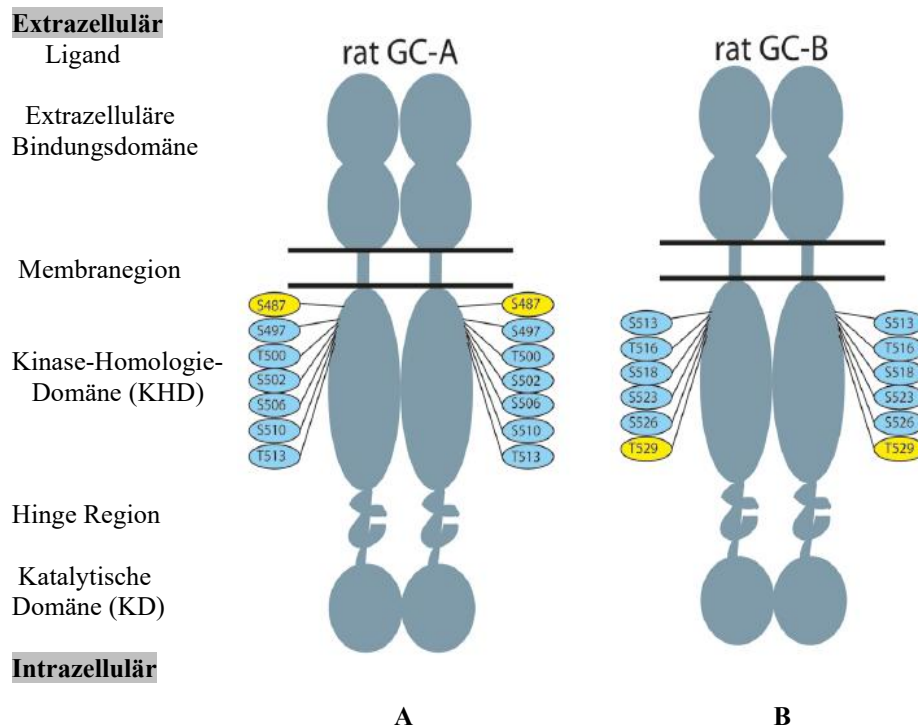


Abb. 1.6: Darstellung der Phosphorylierungsstellen bei GC-A und GC-B der Ratte

A) GC-A hat 7 Phosphorylierungsstellen: 5 Serin- und 2 Threoninreste. Die blauen Reste wurden mittels zweidimensionaler Phosphopeptid-Kartierung, die gelben Reste mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. **B)** GC-B hat 6 Phosphorylierungsstellen, 4 Serin- und 2 Threoninreste. Die blauen Reste wurden mittels zweidimensionaler Phosphopeptid-Kartierung, die gelben Reste mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. Modifizierte Version nach Yoder et al. 2010.

1.5.2.2 Homologe Desensibilisierung

Im Hinblick auf die zentrale Rolle des ANP/GC-A-Systems bei der Regulation von Blutdruck und Blutvolumen ist die Identifikation von spezifischen Mechanismen, die zur Steuerung der GC-A-Aktivität beitragen, von potentieller klinischer Bedeutung (Schröter et al. 2010; Kuhn 2016). Bei Herzinsuffizienz bzw. bei der hypertensiv bedingten kardialen Hypertrophie werden hohe Konzentrationen von ANP und BNP

nachgewiesen, wobei allerdings die GC-A-Aktivität unter diesen Bedingungen reduziert ist (Kuhn 2003; Schröter et al. 2010).

In dem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die hormonabhängige Guanylatzyklase-Aktivität von GC-A und GC-B durch prolongierte Ligandenexposition reduziert wird. Dieser Mechanismus wird als homologe Desensibilisierung bezeichnet, welche ganz oder teilweise durch Dephosphorylierung der Rezeptoren bewirkt wird (Potter et al. 2006; Schröter et al. 2010; Otto et al. 2017). Im Gegensatz zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bei denen eine Desensibilisierung durch Phosphorylierung induziert wird, ist im Falle von GC-A die Dephosphorylierung für eine Desensibilisierung verantwortlich (Schröter et al., 2010).

1.5.2.3 Heterologe Desensibilisierung

Bei der so genannten heterologen Desensibilisierung wird die Aktivität eines Rezeptors unabhängig von der Ligandenbindung reduziert. Dies kann z.B. durch Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) oder PKC-unabhängigen Signalwegen geschehen. Signalmoleküle wie Vasopressin, Endothelin oder Angiotensin II bewirken in Zellen die Bildung von Phospholipase C mit nachfolgender Produktion von Diacylglycerol, welches PKC aktiviert. PKC kann durch Aktivierung von Phosphatasen die Dephosphorylierung von GC-A induzieren und somit dessen Aktivität reduzieren (Potter und Garbers 1994). Sphingosin-1-phosphat wie auch Lysophosphatidsäure können PKC-unabhängig eine Desensibilisierung von GC-B auslösen (Chrisman et al. 2003; Abbey-Hosch et al. 2004).

Eine durch den Inositoltrisphosphat/Calcium-Signalweg bedingte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in den glatten Muskelzellen der Rattenaorta bewirkt eine heterologe Desensibilisierung von GC-B (Abbey und Potter 2002). Außerdem erzeugt die bioaktive Lysophosphatidsäure eine Desensibilisierung von GC-A in MA-10-Leydigzellen, wobei eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration als potentieller Mechanismus für die heterologe Desensibilisierung sowohl von GC-A als auch von GC-B diskutiert wird (Potthast et al. 2004; Müller et al. 2006).

1.6 Expression von GC-A und GC-B in der Aorta

Das Blutgefäßsystem ist ein wichtiges Zielorgan der natriuretischen Peptide. Beide cGMP-produzierenden NP-Rezeptoren, GC-A und GC-B, sind in den Gefäßwänden vorhanden und aktiv. Durch die Relaxation von glatten Muskelzellen und die Kontrolle von endothelialer Permeabilität sind sie für die Blutdruck- und Volumenregulation von Relevanz (Potter 2009; Kuhn 2016; Goetze et al. 2020).

Viele experimentelle Studien nutzten die Aorta als Modellsystem für biochemische Untersuchungen und konnten die Koexpression von GC-A und GC-B sowie die Erzeugung von Effekten wie Vasodilatation bei deren Aktivierung zeigen (z. B. Nagase et al. 1997, Steinmetz et al. 2004 und Potter 2011). Allerdings wurde bisher angenommen, dass für eine physiologisch-relevante Regulation der Gefäßweite das Signalsystem der natriuretischen Peptide im peripheren Gefäßsystem von Bedeutung ist, während Veränderungen der Gefäßweite in den großen Leitungsbahnen (wie der Aorta) als ein primär mechanischer (passiver) Prozess zu verstehen sind (Safar et al. 2014).

Weitere Untersuchungen lassen allerdings vermuten, dass die Aorta selbst ein eigenständiges und herausragendes Zielorgan für die natriuretischen Peptide sein könnte (Middendorff et al. 2008; Waisbrod 2011). Durch vergleichende Analysen konnte nämlich gezeigt werden,

- dass die Konzentrationen von GC-A und GC-B in der Aorta weitaus höher sind als in nachfolgenden Arterien oder anderen etablierten NP-Zielorganen wie Niere und Nebenniere,
- dass das gefäßerweiternde Potential von ANP wesentlich stärker in der Aorta als in peripheren Gefäßen ist
- dass beide Rezeptoren in den zwischen den elastischen Fasern lokalisierten glatten Muskelzellen angereichert sind
- und dass CNP in Organbaduntersuchungen mit intakten Aorten die gefäßerweiternde Aktivität von ANP verstärkt und einer Desensitisierung von GC-A entgegenwirkt.

Diese Befunde deuten auf einen besonderen Stellenwert des NP-Signalsystems in der „Leitungsbahn“ Aorta hin, bei der die systolische Dehnung (Erweiterung) der Aorta

durch ANP/BNP-induzierte Relaxation der glatten Muskelzellen aktiv gefördert wird und bei der eine „Transaktivierung“ von GC-A durch CNP/GC-B eine unter den lokalen Bedingungen (chronische Exposition hoher ANP/BNP-Spiegel) zu erwartende Desensibilisierung des ANP/BNP-Rezeptors verhindert.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle der Phosphorylierung von GC-A und GC-B als posttranslationale Modifikation zur Regulierung der Rezeptoraktivitäten ist in einer beträchtlichen Anzahl von Studien untersucht worden (siehe Potter 2011a). Während Phänomene wie die homologe oder heterologe Desensibilisierung der Rezeptoren gut belegt sind (Potter et al. 2009) und in manchen Studien auf eine Dephosphorylierung der Proteine zurückgeführt werden konnten (z. B. Egbert et al. 2014; Robinson et al. 2017), sind die hierfür verantwortlichen Phosphatasen noch nicht abschließend aufgeklärt (Kuhn 2016). Noch weniger weiß man über die Signalwege und Kinasen, die eine Re-Phosphorylierung und damit eine Sensibilisierung der Rezeptoren induzieren.

Primäres Ziel meiner Arbeit war es, eine neue Methode, mit der unterschiedliche Phosphorylierungszustände von Proteinen in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden können (Kinoshita et al. 2012), im Labor zu etablieren und ihre Anwendung auf Untersuchungen der GC-A-Phosphorylierung in Aorten zu prüfen. Damit sollte auch untersucht werden, ob die beobachtete „Trans“-Aktivierung von GC-A durch CNP in Aorten (Waisbrod 2011) mit einer Zunahme der GC-A-Phosphorylierung einhergeht.

Um diese Fragestellungen angehen zu können, sollte zunächst ein geeignetes Protokoll für die Gewinnung und Präparation des Untersuchungsmaterials (Ratten-Aorten) etabliert werden. Wichtige Kriterien hierfür waren a) die Isolierung von möglichst intakten Gefäßstrukturen unter weitgehend physiologischen Bedingungen und b) die Gewinnung von Material in ausreichender Menge, um nachfolgende Analysen der GC-A-Phosphorylierung durch Immunoblots zu gewährleisten.

Im zweiten Schritt mussten optimale Bedingungen für die Inkubationen der Aorten *ex vivo* in An- oder Abwesenheit der Rezeptoraktivatoren ANP und CNP erarbeitet werden.

Einleitung

Hierzu gehörten auch Untersuchungen zur Verwendung von Phosphatase-Inhibitoren bei den auf die Inkubationen folgenden Arbeitsschritten.

In früheren Arbeiten konnten mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) Transkripte für GC-A und GC-B in der Hypophyse detektiert werden (McArdle et al. 1994). Spätere Studien zeigten die Koexpression von GC-A und GC-B in α T3-1 Zellen (Müller et al. 2006), was auf eine Relevanz beider Rezeptoren für Zellfunktionen hindeutete. In glatten Gefäßmuskelzellen werden ebenfalls beide Rezeptoren, GC-A und GC-B, exprimiert und rufen eine Vasodilatation hervor (Nagase et al. 1997; Potthast et al. 2004; Steinmetz et al. 2004; Bryan et al. 2006; Kuhn 2009; Potter 2011). Eine mögliche Interaktion bzw. wechselseitige Beeinflussung zwischen dem ANP/GC-A- und dem CNP/GC-B-Signalweg wäre denkbar, welche der Regulation des Gefäßtonus eine besondere Bedeutung zukäme (Steinmetz et al. 2004).

In der Aorta, deren Untersuchung für diese Arbeit von besonderem Interesse war, konnte in früheren Studien eine Koexpression beider Rezeptoren, GC-A und GC-B, nachgewiesen werden (Nagase et al. 1997; Potthast et al. 2004; Steinmetz et al. 2004).

Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien :

<u>Chemikalien</u>	<u>Firma/Artikelnummer</u>
Acrylamid	Roth; Art. Nr. 7906.2
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem; A29410100
ANP	Bachem H-2100
Blockierungspulver	Roche; Art. Nr. 1096176
CNP	Bachem H-1296
Butanol	Roth; Art. Nr. 7171.2
ECL-Detektionslösung: Enhanced chemiluminescence	GE Healthcare, RPN2106
Entwickler	Adefo
Essigsäure	EMSURE ; Art. Nr. 1.09065.1000
Ethanol	Roth; Art.-Nr. K928.5
EDTA	Roth; Art. Nr. 8040.1
Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Protein Assay; Nr. 500-0006
Fixierer	Adefo
Längenstandard	Sigma; S8320 (36,000-200.000Da)
Lamda Protein Phosphatase	BioLabs P07535
Magermilchpulver	Roth; Art. Nr. T145.3
Manganchlorid (MnCl ₂)	BioLabs; B1761S
Microcystin	Cayman Chemical Company; Art. Nr. 10007188
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco
Natriumchlorid (NaCl)	Roth; Art. Nr.3957.1
Natriumfluorid (NaF)	Merck; Art. Nr. 1.06450.0025
PageRuler (Prestained Protein Ladder)	Thermo Scientific; Art. Nr. 26619 (10 kDa- 170 kDa)

Material und Methoden

Pencillin-Streptomycin	Sigma; P4333-100-ML
PET-cGMPs(PKG -Inhibitor)	BioLog
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma; P7626, MW 174,2
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II	Sigma; P5726
Phosphatase-Inhibitor Cocktail III	Sigma; P0044
Phos-Tag™	Wako Chemicals; Art. Nr. 300-93523, 304-93521
Ponceau Rot	Sigma; P7170-1L
Protein Standard ; Bovine serum albumin (BSA) = Rinder-Serumalbumin	Sigma; A7906
Rp8-cAMPs (PKA -Inhibitor)	BioLog
Salzsäure	Sigma; 30721-1L-GL
SDS	MP Biomedicals, LLG; Art. Nr. 811030
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem; A1148,0100
Thimerosal	Sigma; T2299-10G
Trichloressigsäure	Roth; Art. Nr. 3744.1
Tris-Hydrochlorid	Roth; Art. Nr. 4855.2
Tween 20	Roth; Art. Nr. 9127.2

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
GC-A	Kaninchen; polyklonal	1:500	Kuhn, Universität Würzburg
GC-A	Kaninchen; polyklonal	1:500	Fab Gennix

Material und Methoden

PKA RI	Maus; monoklonal	1: 1000	Transduktion
--------	------------------	---------	--------------

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugation	Verdünnung	Firma
Ziege Anti-Kaninchen	Peroxidase	1:2000	Pierce
Ziege Anti-Maus	Peroxidase	1:2000	Pierce

2.1.3 Material aus Zellkulturen

2.1.3.1 HEK-GC-A

Human embryonic kidney (HEK) Zellen, die mit GC-A transfiziert wurden und diesen Rezeptor stabil exprimieren (Klaiber et al. 2011), dienen zur Generierung einer Positivkontrolle in den Western Blot-Analysen. Die Zellen wurden als Zellpellets von Michaela Kuhn (Universität Würzburg) erhalten, und Membranproteine wurden wie beschrieben (Müller et al. 2006) präpariert.

2.1.3.2 MA-10- Zellen

Als Kontrolle für eine endogene zelluläre Expression von GC-A dienten MA-10 Maus Leydig-Tumorzellen (Müller et al. 2006). Eingesetzt in meiner Arbeit wurden Membranproteine aus diesen Zellen, die wie beschrieben (Müller et al. 2006) isoliert worden waren.

2.1.3.3 Rattenaorten

Aorten von adulten Wistar-Ratten wurden vom Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen erhalten. Sie wurden direkt nach der Entnahme in Flacon-Tubes mit Kochsalzlösung überführt und umgehend angeliefert oder von mir abgeholt. Die Nutzung der Tierorgane wurde zusammen mit anderen Vorhaben der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der JLU Gießen vorgestellt und bewilligt (AZ 180/12).

Material und Methoden

2.1.4 Verwendete Apparaturen / Utensilien / Geräte

Apparatur / Utensil / Gerät	Firma / Artikelnummer
Aluminiumfolie; Dicke: 30 µm	Roth; Art. Nr. 2596,1
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Falcon; 7543; USA Cellstar; P7740
Elektrophoresegerät	Amersham Pharmacia biotech; USA
Falcon-Röhrchen (15ml)	Falcon; Art. Nr. 352096
Filmkassetten 18 x 24 cm	Hypercasett; Amersham; RPN12642
Filmkassetten 24 x 30 cm	Hypercasett; Amersham; RPN13643
Filterpapier	Whatman; 3MM CHR
Glas-Becher, -Zylinder, -Flaschen	Duran, Schott, Mainz
Hammer	Lux
Heizblock	peqlab; Biotechnologie GmbH
Homogenisator (Glas)	Wheaton 2 ml ; USA
Kühlzentrifuge	Eppendorf; 5804R
Magnetrührer	IKA-COMBIMAG; Janke & Kunkel; Staufen
Mikrotiterplatten= 96- well-cell-culture plate	Cellstar; Art. Nr. 655.180
Mörser	Rosenthal; 181/1; Marktregwitz
Multipette	Eppendorf; Art. Nr. 8185-110-01
Multipetten-Aufsätze	MBT Brand; Art. Nr.147870105
Nitro-Zellulose-Membran	Amersham; Hybond-ECL GE Healthcare; RPN 2020D
pH-Messgerät	HI 221 Calibration Check; Hanna Instruments
Pipetten	Eppendorf; Research (10 µl , 20 µl, 100 µl, 200 µl), (1 ml, 5 ml, 10 ml)
Pipettenspitzen	Sarstedt; Art. Nr. 70.760, 70.762, 70.1115 MultiFlex Round; Art. Nr. 28480 Diamond; F161210

Material und Methoden

Pistill	KPM Berlin; P90-30
Reaktionsgefäße (0.5-2 ml)	Safe-Lock Tubes, Eppendorf; W128709; Hamburg, Sarstedt; 72.69.001; Nümbrecht
Röntgenfilme	Fuji; Art. Nr.47410
Rotor (UZ)	Titanium Rotor ; T865
Schüttler	Grant-Bio, PMR-30
Thermoblock	peqlab; CH-100
Transferkammer	Hoefer Scientific
Ultrazentrifuge (UZ)	Sorvall ultraspeed
Vortexer	Heidolph Reax top

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Inkubation der Rattenaorten:

2.2.1.1 Lösungen:

- Earle's Minimum Essential Medium (MEM)

- Peptide und Inhibitoren:

- ANP
- CNP
- PET-cGMPs (PKG -Inhibitor)
- Rp8-cAMPs (PKA -Inhibitor)

2.2.1.2 Durchführung:

Nach dem Erhalt aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden die Rattenaorten umgehend mittels einer Pinzette aus dem Falcon-Röhrchen herausgenommen und in eine Petrischale überführt. Unter Verwendung von Medium (MEM) wurden zwei Rattenaorten nacheinander von Blutresten und Fettgewebe freipräpariert und anschließend mittels einer Schere längs aufgeschnitten. Die freipräparierten 4 Aortenhälften wurden zunächst auf einem Papier abgetropft und dann

Material und Methoden

auf einer Laborwaage gewogen. Direkt danach wurden sie zusammen in ein 1,5 ml Eppendorf –Tube überführt und mit MEM (600 µl) in An- oder Abwesenheit von natriuretischen Peptiden für 15 min bei 37 °C inkubiert. In Experimenten mit Proteinkinase-Inhibitoren erfolgte eine Prä-Inkubation von 3 min mit den Inhibitoren. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Inkubationslösungen mittels einer Pipette abgenommen, und die Aortenteile wurden in flüssigem Stickstoff vor der Lagerung bei -80 °C eingefroren. Eine Übersicht über die Schritte gibt Abb. 2.1.

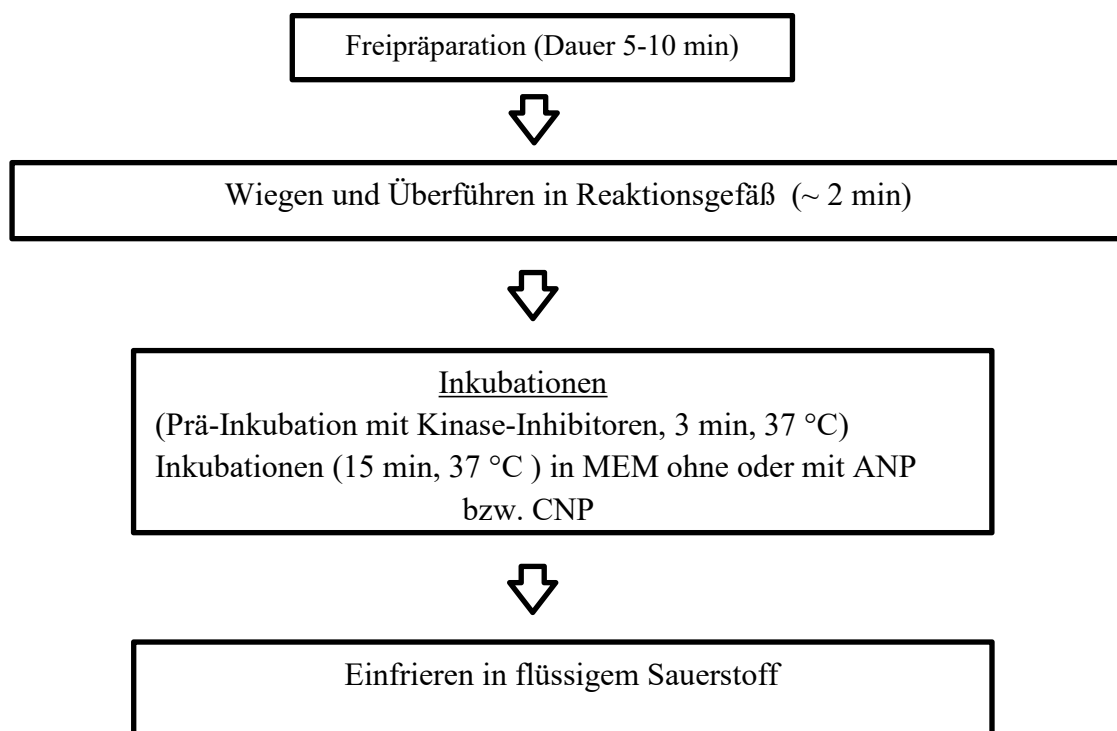


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Präparation und Inkubationen der Aorten.

2.2.2 Membranproteinpräparationen

2.2.2.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Homogenisierungspuffer (HOPU):	50 mM Tris-Cl, pH 7,5
	1 mM DTT
	1 mM EDTA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,1 mM

Material und Methoden

Tris-Puffer (1 μ l 0,1 μ M PMSF/ 1ml HOPU)
50 mM Tris; pH 7,5

2.2.2.2 Verwendung der Phosphatase-Inhibitoren

Substanz	Herstellung	Konzentration
Microcystin	10 mM Microcystin 100 μ g Microcystin in 10 ml Ethanol (100%)	50 nM
Natriumfluorid (NaF)	1 M NaF 42 mg NaF in 1 ml H ₂ O	5 mM
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Na-Orthovanadat, Na-Molybdat, Na-Tartrat, Imidazol)	10 μ l/1 ml Reaktionslösung	
Phosphatase-Inhibitor Cocktail III (Cantharidin, Bromolevamisol-Oxalat, Calyculin A)	10 μ l/1 ml Reaktionslösung	

2.2.2.3 Versuchsdurchführung

Um die Proteaseaktivität zu minimieren, wurden alle Arbeitsschritte unter Kühlung durchgeführt. Die bei -80 °C gelagerten Rattenaorten wurden auf bereits beschrifteter Aluminiumfolie gewogen und dann in flüssigem Stickstoff erneut tiefgefroren. Die Rattenaorten wurden dann durch Pulverisierung in einem Mörser (ca. 5-7 min) unter Verwendung von flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Danach wurde das Pulver mittels eines Spatels in einen Glashomogenisator überführt und unter Zugabe einer adäquaten Menge Homogenisierungspuffer (ca. 6,5 ml/g Gewebe) mit Hilfe von Scherkräften homogenisiert (ca. 10-12 min). Vor der Homogenisierung wurden dem Homogenisierungspuffer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zur weiteren

Material und Methoden

Minimierung der Proteaseaktivität und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt. Jeweils 10 µl Phosphatase-Inhibitoren Cocktail II/III oder eine Kombination von 5 µl 1 M NaF (= 5 mM) und 5 µl 10 µM Microcystin (= 50 nM) / 1 ml HOPU wurden zur Inhibierung der Phosphataseaktivität eingesetzt. Die sich anschließende Zentrifugation (bei 2500 g, 6 min und 4°C) in Eppendorf -Tubes (1,5 ml) diente der Sedimentation nicht vollständig homogenisierter Gewebeteile, Zelltrümmer und Kerne. Nachfolgend wurde der Überstand mittels einer Pipette abgenommen und in einer Ultrazentrifuge für 45 min bei 100.000 g und 4 °C in eine zytosolische und eine Membranprotein-Fraktion aufgetrennt. Zytosolische Überstände wurden abpipettiert und bei -80°C gelagert. Die Membran-Fractionen wurden in 50 mM Tris-Puffer (100-300 µl, je nach Pelletgröße) resuspendiert und ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.2.3.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Tris -Puffer	10 mM Tris-Cl, pH 7,5
Proteinstandard	BSA (Bovine serum albumin) ; 0.25 µg/µl.
Farbstoffkonzentrat	(von Bio-rad), bestehend aus Phosphorsäure, Methanol und Wasser Verdünnung 1:5 mit Aqua dest.

2.2.3.2 Durchführung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des „Bio-Rad Kits“ bestimmt. Hierbei wurde Rinder-Serumalbumin als Referenzprotein (0,25 µg/µl) verwendet. Zunächst wurden Eichproben für die Proteinstandardkurve nach folgender Tabelle pipettiert:

Material und Methoden

Ansatz-Nr. *	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 (μl)	BSA -> Proteinstandard 0,25 μg/μl)	Protein- Konzentration (μg/μl)
0**	100	0	0
1	88	12	3
2	76	24	6
3	64	36	9
4	52	48	12
5	40	60	15
6	28	72	18

Tab. 2.1: Schematische Darstellung der Eichproben für die Proteinstandardkurve

* Doppelbestimmung (stets zwei Ansätze zur Bestimmung einsetzen)

** ohne Referenzprotein (BSA).

Nachfolgend wurden von den Membran-Fractionen ca. 10-15 μ l zur Bestimmung der Proteinkonzentration benötigt. Diese 10-15 μ l wurden anschließend mit 10 mM Tris-Cl auf ein Volumen 100 μ l gebracht und ebenso wie alle Eichproben mit 1 ml Farbstofflösung versetzt. Die Farbintensität der zu bestimmenden Proben soll mit denen der Eichproben verglichen werden. Letztere markieren den für eine Quantifizierung erforderlichen Proteinkonzentrationsbereich (siehe die Tabelle oben: 1 \rightarrow 3 μ g/ μ l und 6 \rightarrow 18 μ g/ μ l). Bei zu geringer oder zu starker Farbintensität der zu untersuchenden Proben müssen größere oder kleinere Volumina eingesetzt werden. Am Ende wurden die Extinktionen der in eine 96-Well-Mikrotiterplatte abpipettierten Eich- und Messproben mittels eines ELISA-Readers gemessen. Dieses Gerät errechnet automatisch anhand der Eichproben die jeweiligen Proteinkonzentrationen der Membranprotein-Fractionen.

Material und Methoden

2.2.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Dabei werden die Proteine zunächst mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Größe aufgetrennt und danach auf eine Nitro-Zellulose-Membran transferiert. Bei der sich anschließenden Immundetektion bindet der Primärantikörper an das auf der Membran fixierte Antigen. Der mit einem Enzym (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelte Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper und kann durch die Peroxidase die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysieren, dessen Chemilumineszenz sich detektieren lässt.

2.2.4.1 Phos-Tag™ -Methode

Während im normalen Western Blot die Proteine nur nach Größe aufgetrennt werden, beeinflusst bei der Phos-Tag™-Methode das Vorkommen von phosphorylierten Gruppen die Wanderung der Proteine. Beim Gießen von Phos-Tag™ -Gelen werden zum Acryamid Phos-Tag-Acrylamid (Phos-Tag™) und Manganionen hinzugegeben. Phos-Tag™ ist ein funktionelles Molekül und dient zusammen mit den Manganionen der spezifischen Trennung phosphorylierter Proteine durch spezifische Bindung an phosphorylierte Ionen. Dadurch können phosphorylierte und dephosphorylierte Proteine getrennt detektiert werden (siehe Abb. 2.2).

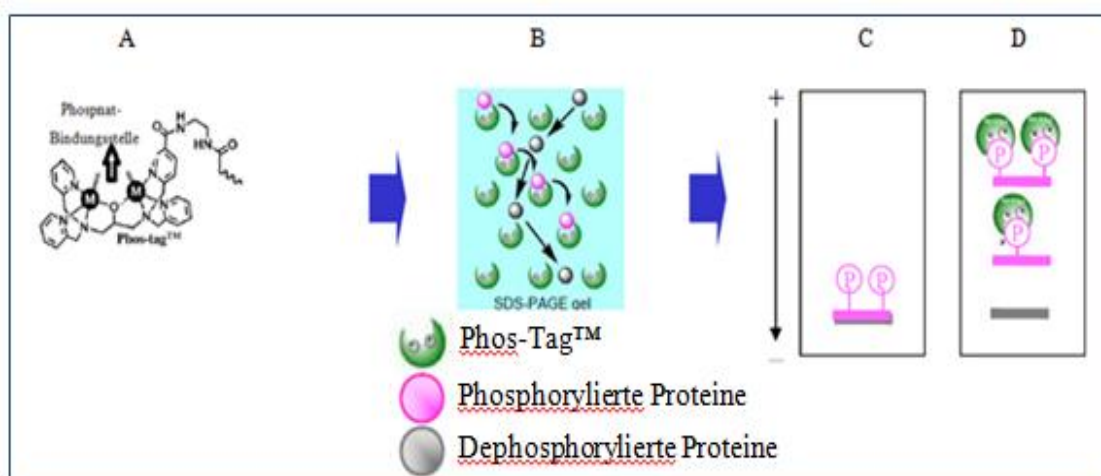


Abbildung 2.2 : Phos-Tag™ -Methode

Material und Methoden

A zeigt die Bindung von Phos-Tag™ an eine Phosphatgruppe. Die Bindung des Phos-Tag™-Manganion-Komplexes an phosphorylierte Proteine führt abhängig von der Anzahl der Phosphorylierungsstellen zur Reduktion ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, während dephosphorylierte Proteine ungestört wandern können (B). Ein Normalgel (C) dient nur dem Nachweis von Proteinen und gibt uns keine Information über den Phosphorylierungsgrad der Proteine. Aus diesem Grund wird nur eine Bande detektiert, deren Lokalisation abhängig von der Proteingröße ist. (D) stellt die detektierten Banden bei der Phos-Tag™ SDS-PAGE dar. Hier erfolgt nicht nur die größenabhängige Trennung von Proteinen, sondern auch die getrennte Detektion von phosphorylierten und dephosphorylierten Proteinen. Die Bindung des Phos-Tag™-Manganion-Komplexes an phosphorylierte Proteine führt zur Reduktion ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Stark phosphorylierte Proteine werden in ihrer Wanderung maximal eingeschränkt (obere Bande), während dephosphorylierte Proteine ungestört wandern können (untere Bande). Die Wanderungsgeschwindigkeit wird mäßig reduziert bei geringem Phosphorylierungsgrad (mittlere Bande).

2.2.4.2 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

3x Stopp-Mix	0,375 M Tris-HCl, pH 6,8 0,2 M DTT 20% (v/v) Glycerin 15% (w/v) SDS 0,6 mg/ml Bromphenolblau
Acrylamidlösung	30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid in H ₂ O
4x Trenngelpuffer	0,375 M Tris- HCl,; pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS
APS	10 % in H ₂ O

Material und Methoden

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	25 µl für jedes Gel
MnCl₂	10 mM
Phos-Tag™	5 mM
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
10x PAGE-Puffer	193 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 0,1 % SDS
EDTA-Transferpuffer	1 mM EDTA 1x Transferpuffer
10x Transferpuffer	100 mM Tris 139 mM Glycin ; pH 8,3
Ponceau-Rot	0,2% in H ₂ O
10x TBS Puffer	20 mM Tris 137 mM NaCl ; pH 7,6
TBST	0,05 % Tween20 1x TBS Puffer
Blockierungslösung	1% (10 g/l) Blockierungspulver (Rosche) 0,15 M NaCl 0.1 M Maleinsäure, pH 7.5 0,005% Thimerosal

Material und Methoden

Antikörper-Inkubationspuffer	10 % Blockierungslösung in TBST 0,005 % Thimerosal
Milchpulverlösung	25 g Magermilchpulver in 500 µl Aqua dest. 500 µl 0,005 % Thimerosal
Essigsäure-NaCl-Lösung	0,5 M NaCl 0,5 M Essigsäure
Tris-Cl	1,5 M ; pH 7,5 (für das Strippen)

2.2.4.3 Versuchsdurchführung

2.2.4.3.1 Vorbereitung der Proben

Zur Minimierung der Proteaseaktivität wurden die zu untersuchenden Proben stets auf Trockeneis transportiert. Beim Auftauen wurden sie mit 3x Stopp-Mix versetzt und entweder direkt verwendet oder bis zum nächsten Tag bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4.3.2 Gießen der Gele

Trenngel ; Normalgel (6 % Acrylamid)

Zur Herstellung des Trenngels wurden 6 ml 30 % Acrylamid/Bis, 7,5 ml 4x Trenngelpuffer, 16,5 ml H₂O, 125 µl APS (final 10 %) und 25 µl TEMED zunächst in einem Becherglas mittels eines Magnetrührers für etwa 1 min ohne Blasenbildung gerührt. Anschließend wurde die Lösung zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, durch das Aufgießen von Butanol zur Glättung der Oberfläche überschichtet und über Nacht polymerisieren gelassen.

Material und Methoden

Trenngel ; Phos-Tag-Gel (6 % Acrylamid, 25 µM Phos-Tag-Acrylamid)

Die Lösung für das Trenngel wurde aus 6 ml 30 % Acrylamid/Bis, 7,5 ml 4x Trenngelpuffer, 125 µl APS (final 10 %), 25 µl TEMED, 150 µl 5 mM Phos-Tag-Acrylamid, 300 µl 10 mM MnCl₂ (final 0,1 mM) und 16,05 ml H₂O in einem Becherglas hergestellt und mittels eines Magnetrührers für ca. 1 min ohne Blasenbildung gerührt. Danach wurden die oben beim Gießen des Normalgels beschriebenen Schritte durchgeführt.

Sammelgel

Am folgenden Tag wurde das Butanol abgegossen, und die obere Gelgrenze zur Entfernung der Butanolreste reichlich mit Wasser abgespült. Die Sammelgellösung wurde aus 2,6 ml 30 % Acrylamid/Bis, 5 ml 4x Sammelgelpuffer, 12,4 ml H₂O, 100 µl APS (100 mg/ml) und 25 µl TEMED hergestellt und seitlich eines Kammes über das Trenngel pipettiert. Durch das Einsetzen des Kammes zwischen den Glasplatten wurden Taschen für die aufzutragenden Proben gebildet. Nach etwa 30-60 Minuten ist das Sammelgel auspolymerisiert und der Kamm kann entfernt werden. Diese Sammelgellösung genügte für zwei Gele und wurde sowohl für Phos-TagTM- als auch für Normalgele gleichermaßen hergestellt.

Ablauf der Gelelektrophorese

Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels und der Entfernung des Kammes wurden die Probenaschen mit 1x PAGE-Puffer zur Entfernung von Gelresten ausgespült. Die zu analysierenden Proben wurden ca. 5 min bei 100 °C erhitzt, für 2-3 sec auf Eis abgekühlt und anschließend mittels einer langen Pipettenspitze in die Taschen des Sammelgels pipettiert, wobei in die erste Probenasche in der Regel ein Molekulargewichtsmarker (z. B. Längenstandard von Sigma) zur Zuordnung der Proteingrößen aufgetragen wurde.

Vor Beginn der Gelelektrophorese wurden beide Elektrophoresekammern mit 1x PAGE-Puffer befüllt: die untere Kammer bis zur Trennstelle zwischen Trenn- und

Material und Methoden

Sammelgel, die obere Kammer bis 1 cm oberhalb der Elektrode der oberen Kammer. Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug insgesamt ca. 4-5h. Zum Durchlaufen des Sammelgels wurde zunächst (für ca. 1h) eine konstante Leistung von 13 W eingestellt, dann wurde die Elektrophorese bei einer Leistung von 17 W (für ca. 3-4h) fortgeführt. Bei Phos-Tag™- Gelen wurde nach dem Austreten der blauen Bande die Gelelektrophorese noch für ca. 60-75 min zur optimalen Darstellung großer phosphorylierter Proteine wie GC-A laufen gelassen. Zudem wurde das Phos-Tag™-Gel nach Beendigung der Gelelektrophorese zunächst für etwa 20 min mit EDTA-Transferpuffer, bestehend aus 1 mM EDTA und 1x Transferpuffer, danach für 15 min mit 1x Transferpuffer (ohne EDTA) inkubiert. Die Inkubation mit EDTA diente der Beseitigung der im Phos-Tag™-Gel enthaltenen Manganionen und ermöglichte im Nachhinein den Proteintransfer auf die Nitro-Zellulose-Membran.

Proteintransfer

Für den Elektrotransfer wurde die Nitro-Zellulose-Membran nach Beendigung der Gelelektrophorese anodenseitig auf das Gel gelegt, beidseitig mit 1x Transferpuffer-angefeuchteten Filterpapieren belegt und zwischen die Gitter des Blotting-Einsatzes eingelegt. Der Proteintransfer erfolgte unter Verwendung von 1x Transferpuffer (ca. 5 l) in einer Transferkammer über Nacht bei 4°C.

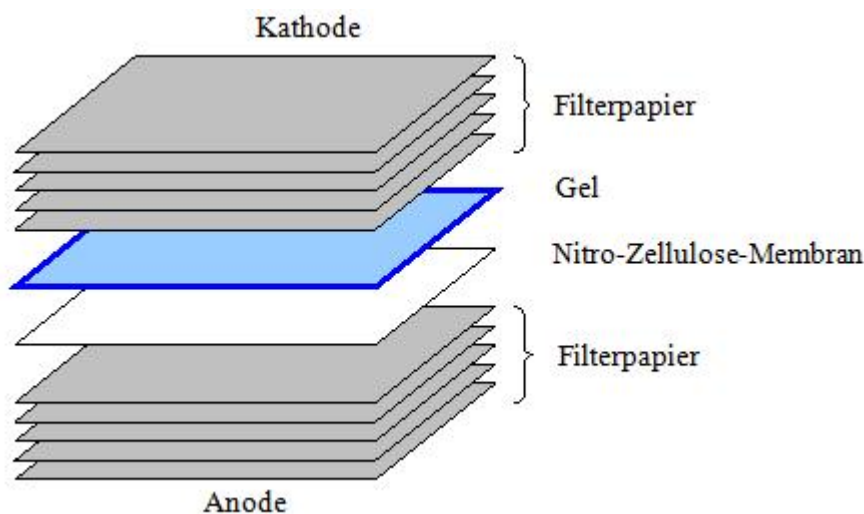


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Anordnung in der Transferkammer

Material und Methoden

Membranfärbung und -blockierung

Am darauf folgenden Tag wurden die Blots mit Ponceau-Rot (0,1 %) gefärbt. Nach 10-15 minütiger Inkubation mit dem Farbstoff wurden die Positionen der

Referenzproteine (siehe Tab. 2.9) mit einem schwarzen Kugelschreiber auf dem Blot markiert.

Referenzprotein	Molekulargewicht (kDa)
Myosin, Schweineherz	200
B-Galaktosidase, E. coli	116
Phosphorylase b, Kanninchenmuskel	97
Rinder-Serumalbumin	66
Glutamat-Dehydrogenase, Rinderleber	55
Albumin, Hühnereiweiß	45
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Kanninchenmuskel	36

Tab. 2.2: Verwendete Referenzproteine

Nachfolgend wurden die Blots in Blockierungslösung für ca. 2 h bei RT zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert.

Immundetektion

Nach der Inkubation mit Blockierungspuffer wurden die Blots 3 x für 5 min in TBST gewaschen. Zum Nachweis der zu untersuchenden Proteine wurden die Blots nachfolgend mit Primär- und Sekundärantikörpern für jeweils 1 h bei RT inkubiert. Die Primärantikörperlösungen (~ 30 ml) wurden bei 4°C gelagert und konnten mehrfach wieder verwendet werden. Die Sekundärantikörperlösungen (~ 40-60 ml) wurden stets frisch angesetzt. Nach den Inkubationen mit den Antikörperlösungen, die auf einem Schüttler durchgeführt wurden, wurden die Blots jeweils 3 x für 5 min in TBST gewaschen. Letztlich wurden die Blots 30-45 min in H₂O gewaschen und zur

Material und Methoden

Sichtbarmachung der Antigene in „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Detektionslösung für ca. eine Minute inkubiert. Zum Nachweis von GC-A wurden die Blots nach der ersten Immundetektion gestriipt und danach einer zweiten Immundetektion unterzogen. Hier erfolgte die Inkubation mit ECL-Detektionslösung über Nacht in einer Filmkassette im Kühlschrank (4 °C).

Strippen (Aufhebung der Antikörper-Bindungen):

Zunächst wurden die Blots 2 x für 5 min in Wasser gebadet. Anschließend erfolgte eine Inkubation für ca. 30 min in einer wässrigen Lösung von Magermilchpulver (5%), bestehend aus 25 g Magermilchpulver (5%), 500 µl 0,005 % Thimerosal und 500 ml H₂O. Nach 5-minütigem Waschen in H₂O wurden die Blots 30 min in einer Lösung von 0,5 M NaCl und 0,5 M Essigsäure inkubiert. Nachfolgend wurden die Blots ca. 5 min in H₂O gewaschen und dann für ca. 2 min in 1,5 M Tris-Cl (pH 7,5) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in H₂O und darauf folgender Inkubation in Blockierungslösung für 2 h bei RT wurden die oben bei Immundetektion beschriebenen Schritte erneut durchgeführt. Zur Exposition wurden die Blots zunächst für ca. 10-30 min, dann über Nacht mit Röntgenfilmen in einer Filmkassette zusammengelegt. Die Exposition über Nacht diente der optimalen Sichtbarmachung von GC-A. Die Röntgenfilme wurden in der Dunkelkammer für ca. 1-3 min entwickelt, nach Fixierung (1-3 min) in H₂O gewaschen und an der Luft und getrocknet.

2.2.5 Dephosphorylierungsassay

Zum Prüfen der Phos-TagTM-Methode wurden Proteinproben vor der SDS-PAGE-Analyse mit einer Protein Phosphatase (Lambda PP, BioLabs) inkubiert, die phosphorylierte Threonin-, Serin- und Tyrosinreste als Substrat nutzt.

Inkubationsansätze (50 µl) wurden in 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DTT und 1 mM MnCl₂ mit 200 Units Lambda PP und 3 bis 70 µg Protein bei 30 °C für 30 min durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Stopp-Mix terminiert und die

Material und Methoden

Proben bis zur Gelanalyse bei -70 °C gelagert. Für Kontrollen wurden analoge Inkubationen in Abwesenheit der Protein Phosphatase durchgeführt.

2.2.6 Densitometrie

Für densitometrische Analysen geeignete Röntgenfilme wurden gescannt (Epson Perfection V 700 Photo). Die resultierenden Bilder wurden als TIFF Files mittels ImageJ Software für densitometrische Quantifizierungen verwendet. Als Indikator für Veränderungen der GC-A Phosphorylierung wurde die Intensität der Immunofärbung in jeweils 2 Regionen (im Gel langsam wandernde = stark phosphorylierte GC-A Moleküle gegenüber nicht retardierten = nicht oder kaum phosphorylierten Molekülen) pro Bahn gemessen und das Verhältnis zwischen beiden Werten bestimmt.

2.2.7 Datenanalyse

Für graphische Darstellungen und die Analyse der Daten wurde Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Die Signifikanz von Effekten ($P < 0.05$) wurde mit Student t-Tests (ungepaart) beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Phos-tag SDS-PAGE Methode zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen in Western Blot Analysen

Bei normalen Western Blot Analysen werden Proteine in den zu untersuchenden Proben durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zunächst nach Größe aufgetrennt, und anschließend können ausgewählte Proteine durch Immunodetektion auf so genannten Blots nachgewiesen werden. Hiermit lassen sich z. B. Aussagen über die Expressionsorte und die Stärke der Expression (Müller et al. 2009) und Erkenntnisse über posttranslationale Modifikationen mit signifikantem Einfluss auf das Molekulargewicht wie Glykosylierungen (Müller et al. 2010a) gewinnen. Das Erlernen der hierbei praktizierten Techniken wurde mir leicht gemacht, da Western Blots in der Arbeitsgruppe routinemäßig durchgeführt wurden.

Bei der Phos-tag Methode werden im Wesentlichen dieselben Verfahren benutzt. Allerdings wird hier dem Acrylamid ein modifiziertes Acrylamid (Phos-tag acrylamid) hinzugefügt, das in Anwesenheit von Metallionen die Fähigkeit zur Bindung an Protein-Phosphatgruppen hat. Bei der Elektrophorese wandern dann phosphorylierte Proteine deutlich langsamer als nicht phosphorylierte Proteine durch die Gelmatrix (Kinoshita et al. 2012, Egbert et al. 2014).

In ersten Experimenten wurden verschiedene Parameter wie die Acrylamid-Konzentration oder die Elektrophorese-Bedingungen bei Phos-tag-Gelen im Vergleich zu normalen Gelen getestet. Nach dem Blotten und Färben der analysierten Proteinproben zeigte sich, dass Trenngele mit 6 % Acrylamid/25 μM Phos-tag-Acrylamid in Anwesenheit von 100 μM MnCl_2 für eine akzeptable Auftrennung der Proteingemische genutzt werden konnten.

Um die Funktionalität der Phos-tag-Methode zu prüfen, wurden Proteine von MA-10 (Maus Leydig) Zellen eingesetzt. Diese Zellen exprimieren GC-A, und ANP induziert eine homologe Desensibilisierung des Rezeptors, die intrazellulär nicht durch eine cGMP-abhängige (PKG), sondern durch eine cAMP-abhängige (PKA) Kinase vermittelt wird

Ergebnisse

(Müller et al. 2006). Zur Untersuchung des Vorkommens und möglicher Phosphorylierung der regulatorischen PKA Untereinheit RI (PKA RI) wurden gleiche Mengen (70 µg) an Membranprotein in einem Standard-Gel und in einem Phos-tag-Gel aufgetrennt und nach dem Blotten auf die Anwesenheit von PKA RI-Immunoreaktivität hin untersucht. In Parallelansätzen waren solche Proben in Anwesenheit oder Abwesenheit von Protein Phosphatase inkubiert worden. Das Ergebnis (Abb. 3.1) zeigt, dass PKA RI mit der erwarteten Molekularmasse von 47 kDa in den Membranfraktionen der Zellen vorkommt (A). Die Analyse im Phos-tag-Gel (B) dokumentiert, dass in den isolierten Membranproteinfraktionen der größere Teil der Kinase-Moleküle in einem phosphorylierten (Phosphatase-sensitiven) Zustand vorlag.

Mit diesem Experiment konnte somit die Anwendbarkeit der Phos-tag-Methode demonstriert werden.

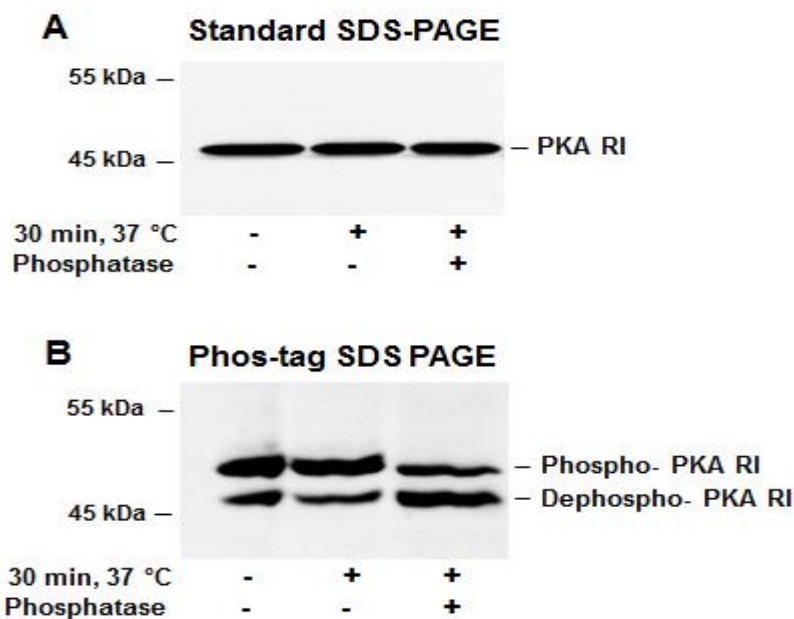


Abb. 3.1: Nachweis der partiellen Phosphorylierung von PKA RI in MA-10-Zellen mittels Phos-tag Gelelektrophorese

Aliquots (70 µg Protein) von Membranproteinen aus MA-10 Zellen wurden wie dargestellt entweder gar nicht (-) oder für 30 min in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von Protein Phosphatase

Ergebnisse

bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden nachfolgend per Standard SDS-PAGE (A, 6% Acrylamid) oder in einem Phos-tag-Gel (B, 6% Acrylamid, 25 µM Phos-tag-Acrylamid) aufgetrennt und via Immunoblotting mit Antikörpern gegen PKA RI analysiert. Die Position der PKA RI-Moleküle (rechts) und von co-migrierten Molekulargewichtsmarkern (links) ist angezeigt.

3.2 Einsatz der Phos-tag SDS-PAGE Methode zur Analyse des Phosphorylierungs-status von GC-A

Der ANP-Rezeptor GC-A ist ein relativ großes Molekül (~130 kDa) und enthält mindestens 7 Phosphorylierungsstellen, die in dynamischer Weise zur Regulation der Rezeptoraktivität genutzt werden (Otto et al. 2017; Edmund et al. 2019). Somit sind generell multiple Banden bei Phos-tag-Analysen des Rezeptors zu erwarten. Da sich die Phos-tag-Effekte auf die Mobilität von Proteinen bei mehreren Phosphatgruppen addieren (Kinoshita et al. 2012), könnten multipel phosphorylierte GC-A-Moleküle eine sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeit während der Elektrophorese aufweisen.

Für diesbezügliche Untersuchungen wurden Membranproteine von Zellen, die nach Transfektion übergroße Mengen von GC-A exprimieren (HEK-GC-A) und von Zellen (MA-10), die endogen den ANP-Rezeptor exprimieren, entweder gar nicht oder in Ab- oder Anwesenheit von Protein Phosphatase inkubiert und dann durch SDS-PAGE in Phos-tag- bzw. normalen Gelen aufgetrennt. Co-analysiert hierbei wurden zudem von Rattenaorten stammende Membranproteine (Abb. 3.2).

Die Proteinfärbung nach dem Blotten (A, B) korrespondiert mit den unterschiedlichen Proteinmengen (von 3 µg bei HEK-GC-A bis 70 µg bei MA-10), die aufgetragen wurden und demonstriert, dass der Proteintransfer auf die Blot-Membran bei beiden Gelen gleich effizient war. An den Positionen der verwendeten Molekulargewichtsmarkern lässt sich erkennen, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine generell in Phos-tag-Gelen gegenüber normalen Gelen stark reduziert ist (Kinoshita et al. 2012). Dabei ist klar, dass diese Marker nicht als Referenz

Ergebnisse

für Molekulargewichtsbestimmungen von phosphorylierten Proteinen in Phos-tag-Gelen dienen können.

Die Analyse der GC-A-Immunoreaktivität nach Elektrophorese im normalen Gel (C) dokumentiert a) die Spezifität des Antikörpers (die GC-A-Bande bei 125 kDa ist das einzige Signal), demonstriert b) die Überexpression von GC-A in den transfizierten HEK-Zellen, und zeigt c) dass 10 µg Rattenaorta-Membranen eine ähnliche Menge an GC-A enthalten wie 70 µg Membranproteine aus MA-Zellen. Wie zu erwarten, hatten die Inkubationen mit Protein Phosphatase keinen Einfluss auf die erhaltenen Proteinbanden.

Nach Elektrophorese im Phos-tag-Gel (D) ist eine Aufspaltung der GC-A-Immunoreaktivität in mehrere Banden evident. Im Einklang mit der Erwartung für phosphorylierte Moleküle nimmt die Intensität der Banden im oberen Teil des Blots nach Inkubation mit Protein Phosphatase ab. Diese Banden (siehe Klammer) werden daher als Phospho-GC-A-Formen bezeichnet. Die Intensität der untersten Bande wird nicht durch Phosphatase-Inkubation reduziert und als GC-A ohne Phospho-Gruppen deklariert. Das präzise Bandenmuster der phosphorylierten GC-A-Formen unterscheidet sich zwischen den drei untersuchten Proteinquellen, was für Zelltyp-spezifische Regulationsmechanismen von GC-A-Phosphorylierung sprechen könnte.

Mit diesen Untersuchungen ließ sich somit eine experimentelle Grundlage für die Anwendung der Phos-tag SDS-PAGE-Methode zu Untersuchungen von GC-A-Phosphorylierungszuständen und deren Veränderungen schaffen.

Ergebnisse

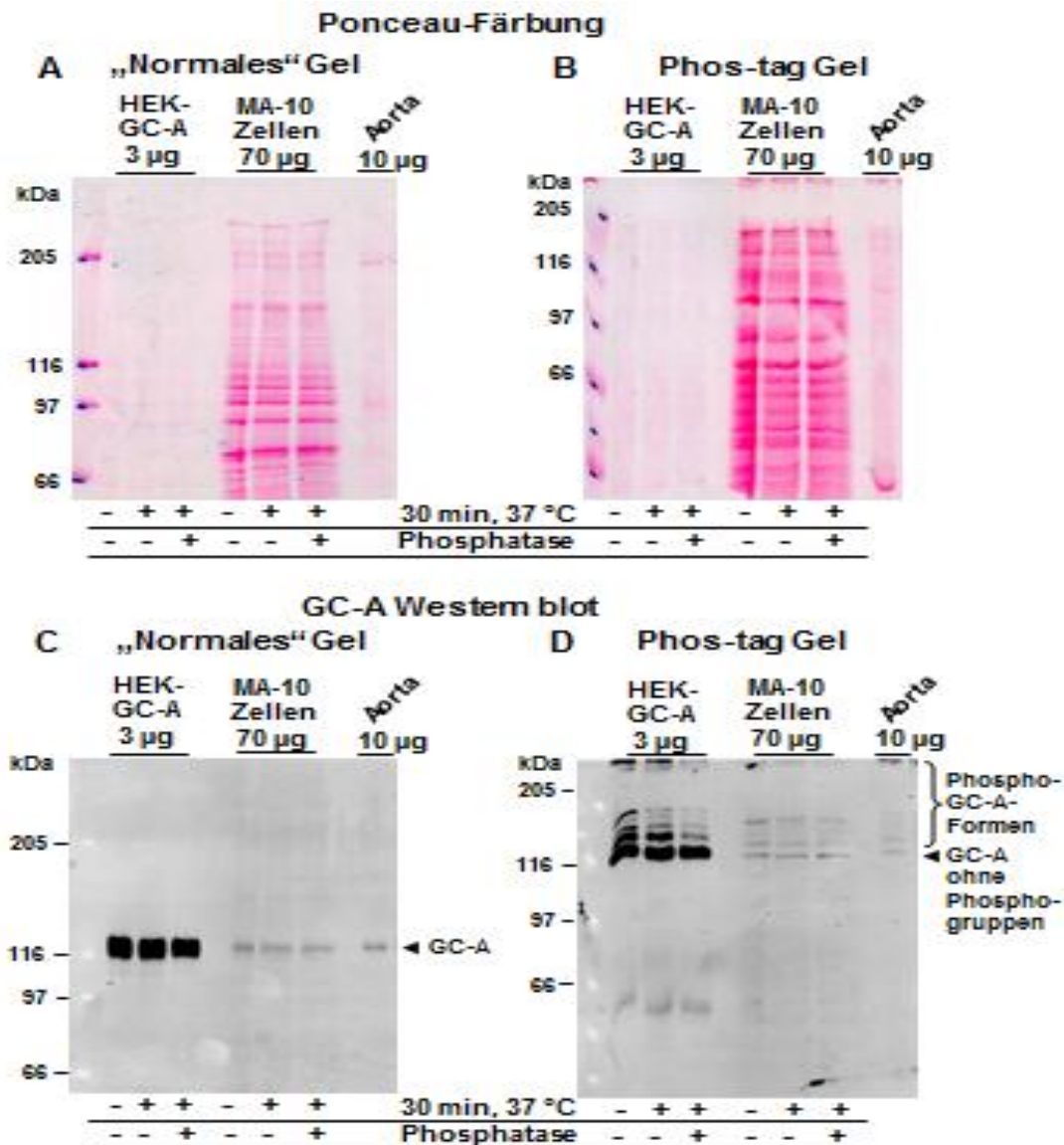


Abb. 3.2: Analyse der GC-A-Phosphorylierung mittels Phos-tag Gelelektrophorese

Jeweils gleiche Mengen von Membranproteinen aus HEK-Zellen, die mit GC-A transfiziert wurden (HEK-GC-A) oder aus MA-10 Zellen (MA-10) wurden wie dargestellt entweder gar nicht (-) oder für 30 min in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von Protein Phosphatase bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden zusammen mit Membranproteinen der Rattenaorta (Aorta) in einem Standard-Gel (A, 6% Acrylamid) oder in einem Phos-tag-Gel (B, 6% Acrylamid, 25 µM Phos-tag-Acrylamid) einer SDS-PAGE unterzogen, und die Proteine wurden nach dem Blotten mit Ponceau-Rot sichtbar gemacht (A, B). Nach Inkubation mit anti-GC-A-Antikörpern ist GC-A-Immunität im Western Blot gut (C, D) detektierbar. Anders als im Standard-Gel (C,

Ergebnisse

GC-A erscheint als eine einzige Bande bei etwa 125 kDa) sind im Phos-tag-Gel (D) zusätzliche Banden sichtbar, die GC-A-Moleküle mit reduzierter Wanderungsgeschwindigkeit im Gel repräsentieren. Die Positionen von GC-A in C und von nicht phosphoryliertem GC-A in D sind durch einen Pfeilkopf, die von phosphorylierten Formen des Rezeptors durch eine Klammer (D) markiert. Die Migration von Molekulargewichtsmarkern (in kDa) ist angezeigt.

3.3 Isolierung von Rattenaorten und Generierung von Membranproteinen

Für die speziell vorgesehenen Untersuchungen, ob die beobachtete Transaktivierung von GC-A in Aorten durch CNP-Exposition (Middendorff et al. 2008, Waisbrod 2011) mit einer Zunahme der GC-A-Phosphorylierung einhergeht, mussten zunächst geeignete Grundlagen für die Gewinnung und Präparation des Untersuchungsmaterials erarbeitet werden.

Frühere Untersuchungen zur GC-A-Phosphorylierung wurden zumeist in Zellen durchgeführt, die mit dem Rezeptor transfiziert worden waren und unphysiologisch hohe Konzentration enthielten (Potter 2011, Kuhn 2016). In meinem Fall sollte das Phänomen mit natürlicher (endogener) Expression des Rezeptors in Rattenaorten unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden.

Es erschien sinnvoll und notwendig, die Aorten vor den nachfolgenden Schritten von Blut, Fett und restlichem Bindegewebe zu säubern. Zum einen sollte dadurch der Zugang von Signalmolekülen (wie CNP) zu den glatten Muskelzellen erleichtert werden. Zum anderen wird dadurch die Konzentration von GC-A aus glatten Muskelzellen in den resultierenden Membranproteinfraktionen erhöht.

Basierend auf früheren Untersuchungen (Waisbrod 2011), wurden Inkubationszeiten von 15 min bei 37 °C für die Studien mit CNP oder ANP ausgewählt.

Es zeigte sich, dass einzelne Aorten für die Generierung von Membranproteinen und nachfolgende Western Blot-Analysen nicht ausreichend waren. Daher wurden jeweils zwei Organe in den Inkubationen eingesetzt und zusammen aufgearbeitet. Beim Homogenisieren des Gewebes fiel allerdings auf, dass die Gefäßstrukturen bisweilen

Ergebnisse

ungewöhnlich schwer aufzulösen waren. Dies minderte dann die Ausbeute an Membranproteinen. Eine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen konnte nicht gefunden werden.

Tabelle 3.1 gibt exemplarisch einen Überblick über die insgesamt etwa 200 durchgeführten Präparationen.

Probengewicht	Erhaltene Membranproteinfraktion		
	<u>Volumen (µl)</u>	<u>Konzentration (µg/µl)</u>	<u>Ausbeute (µg)</u>
mg			
214	200	0,62	124
252	200	1,67	334
219	200	0,77	154
197	200	0,78	156
241	200	1,4	280
240	180	0,3	81
233	190	0,45	57

3.4 Untersuchungen zum Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren

Um den Phosphorylierungszustand von GC-A nach Inkubationen mit potenziellem Einfluss auf die Rezeptorphosphorylierung bei den nachfolgenden Schritten „einzufrieren“, wurde die Effektivität von Phosphatase-Inhibitoren mittels Phos-tag SDS-PAGE-Analysen getestet. Als vergleichbar wirksam erwiesen sich zwei Kombinationen, zum einen bestehend aus Microcystin und Natriumfluorid, zum anderen aus zwei kommerziell-erhältlichen Phosphatase-Inhibitor-Cocktails (siehe 2.2.2.2).

Eine vergleichende Analyse (Abb. 3.3) zeigt die hohe Wirksamkeit beider Kombinationen anhand des großen Überschusses an phosphorylierten gegenüber nicht

Ergebnisse

phosphorylierten GC-A-Molekülen. Das Auftreten von unterschiedlichen Bandenmustern (vgl. die Banden in den mit 1 und 2 markierten Bahnen) ist ein Indikator für unterschiedliche Wirkungsspektren der beiden Phosphatase-Inhibitor-Kombinationen.

Aufgrund eines störenden Einflusses auf Proteinkonzentrationsbestimmungen bei Verwendung der Phosphatase-Inhibitor-Cocktails wurden Microcystin und NaF im Standardprotokoll zur Inhibierung von Phosphatase-Aktivitäten eingesetzt.

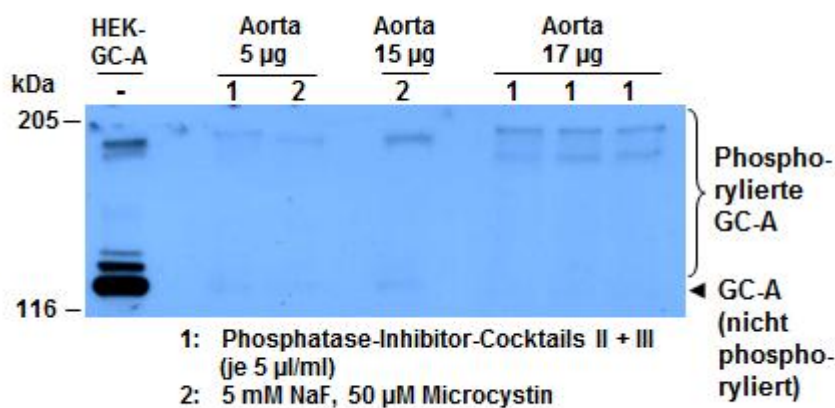


Abb. 3.3: Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren auf die Detektion von GC-A Phosphorylierung

Rattenaorten-Proben wurden wie beschrieben (2.2.1.2) präpariert und anschließend 15 min bei 37 °C in Medium (MEM) inkubiert. Bei den nachfolgenden Schritten (Homogenisierung, Abtrennung und Re-Suspension der Membranproteine) wurden zur Inhibierung von Phosphatase-Aktivität entweder Phosphatase-Inhibitor-Cocktails (1) oder NaF und Microcystin (2) zugesetzt. Die resultierende GC-A Immunoreaktivität nach Analyse der Proben (5 – 17 µg Membranprotein) via Phos-tag SDS-PAGE und Immunoblotting ist gezeigt. Co-analysiert wurden Membranproteine von mit GC-A transfizierten HEK-Zellen (HEK-GC-A). Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern (links), die der GC-A-Banden (rechts) und Daten zu den Phosphatase-Inhibitoren (unten) sind angegeben.

3.5 CNP induziert die Zunahme von GC-A- Phosphorylierung in Rattenaorten

In früheren Studien mit Rattenaorten, die in ihren glatten Muskelzellen den ANP- (GC-A) und CNP-Rezeptor (GC-B) exprimieren, wurde eine drastische Erhöhung der enzymatischen (cGMP-produzierenden) und der vasorelaxierenden Aktivität von GC-A nach Inkubationen mit CNP beobachtet (Middendorff et al. 2008, Waisbrod 2011).

Um zu sehen, ob dieser Effekt mit einer Zunahme der GC-A-Phosphorylierung korreliert, wurden Aorten erneut mit CNP (oder ANP, jeweils 0.1 μM) inkubiert und nach Isolierung der Membranproteine in Phos-tag-Gelen auf den Zustand der GC-A-Phosphorylierung hin untersucht. Diese Experimente (Abb. 3.4) zeigten bei Kontrollanalysen in Standard-Gelen die für GC-A erwartete und durch die Peptidinkubationen nicht beeinflusste Bande bei 127 kDa (**A**). Bei den parallelen Phos-tag-Analysen war regelmäßig eine deutliche Zunahme von stark phosphorylierten GC-A-Molekülen nach Inkubation mit CNP zu erkennen (**B**). Zur Quantifizierung wurden die Regionen mit Immunreaktivität wie in **C** gezeigt markiert und densitometrisch ausgewertet, wobei das Verhältnis von a (stark phosphoryliert) zu b (kaum phosphoryliert) bestimmt wurde. Die so erhaltenen Daten von 4 Experimenten (**D**) demonstrieren eine signifikante Zunahme der GC-A Phosphorylierung nach Inkubation mit 0,1 μM CNP. Ein signifikanter Effekt von ANP auf den Status der GC-A-Phosphorylierung ließ sich in solchen Experimenten nicht nachweisen. Allerdings zeigten diesbezügliche Analysen regelmäßig eine Tendenz zu einer Abnahme der GC-A Phosphorylierung nach ANP-Exposition.

Analoge Experimente, in denen höhere Konzentrationen (1 statt 0.1 μM) von CNP (und ANP) eingesetzt wurden, dokumentierten ebenfalls eine CNP-induzierte Zunahme der GC-A-Phosphorylierung (nicht gezeigt). Der Effekt war hier allerdings geringer als bei der niedrigeren Peptidkonzentration. Dieses Phänomen steht im Einklang mit früheren Analysen, bei denen eine Reduzierung der CNP-Effekte auf die Guanylatzyklase- und gefäßerweiternde Aktivität von GC-A bei größeren Peptidkonzentrationen beobachtet wurde (Waisbrod 2011).

Ergebnisse

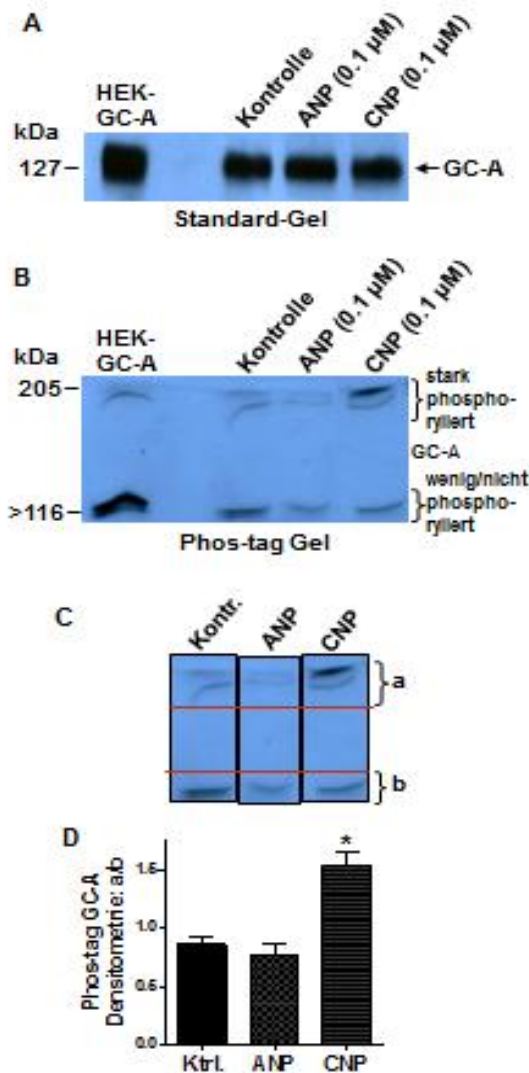


Abb. 3.4: Inkubationen mit CNP erhöhen den Phosphorylierungsgrad von GC-A in Rattenaorten:

A: Frisch präparierte Rattenaorten wurden für 15 min in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit (0,1 µM) von ANP oder CNP inkubiert, und die Reaktionen wurden durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gestoppt. Nach Homogenisierung und Isolierung von Membranproteinen unter Bedingungen von Phosphatase-Inhibierung wurden gleiche Mengen (20 µg Protein) zusammen mit Membranproteinen (2 µg) von GC-A-überexprimierenden HEK-Zellen (HEK-GC-A) durch SDS-PAGE in einem Standard-Gel (6% Acrylamid) aufgetrennt. Die Banden von GC-A (Pfeil) bei 127 kDa nach Western Blot-Analyse mit GC-A Antikörpern sind

gezeigt **B:** Analoge Proben wie in **A** wurden in einem Phos-tag Gel (6 % Acrylamid, 25 µm Phos-tag Acrylamid) aufgetrennt. Die Western Blot Analyse zeigt die Aufspaltung der GC-A-Immunoreaktivität in Banden, die sehr langsam wandernde (stark phosphorylierte, obere Klammer) und eher normal wandernde (wenig/nicht phosphorylierte, untere Klammer) Proteine repräsentieren. Angaben in kDa beziehen sich auf die Positionen von co-analysierten Molekulargewichtsmarkern. **C:** Um ANP/CNP-induzierte Veränderungen im Phosphorylierungszustand von GC-A erfassen zu können, wurden die relevanten Regionen (a, b) der Immunoreaktivität bei solchen Analysen markiert und die Intensität der Immunofärbung durch Densitometrie erfasst. **D:** Ergebnis der densitometrischen Auswertung von 4 Experimenten wie in **B**, wobei die Werte für den Sektor a (stark phosphoryliert) jeweils durch

Ergebnisse

die für b geteilt wurden. Die Inkubation mit CNP (0,1 μ M) führt zu einer signifikanten Zunahme (* $P < 0,05$; $n=4$) an GC-A Phosphorylierung.

3.6 Untersuchungen mit Kinase-Inhibitoren

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, welcher Signalweg für die CNP-induzierte Erhöhung der GC-A-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte. Hierzu wurden Inkubationen der Rattenaorten mit CNP (oder ANP) in Abwesenheit oder Anwesenheit von unterschiedlichen Kinase-Inhibitoren durchgeführt. Leider ließen sich mit diesen Experimenten keine schlüssigen Ergebnisse erzielen. Das hatte im Wesentlichen mit der Organisation der praktischen Arbeit zu tun. So konnten oftmals nur wenige Aorten an vorher nicht bekannten Tagen erhalten werden. Für die finale Analyse in Phos-tag-Gelen wurden daher Proben, die in einem größeren Zeitraum generiert worden waren, gesammelt und zusammen untersucht. Unglücklicherweise traten im späteren Verlauf meiner Arbeit, bei der ich nicht kontinuierlich im Labor arbeiten konnte, bisweilen Störungen bei den Phos-tag Western Blot Analysen auf, die eine Auswertung der Ergebnisse verhinderten. Aufgrund der Begrenztheit der bei den Experimenten erhaltenen Membranproteinmengen ließen sich zudem Analysen von Inkubationsansätzen in vielen Fällen nicht wiederholen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Methode eingeführt und getestet, mit der durch Integration eines Phos-tag genannten Moleküls in Polyacrylamidgele eine Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungszustand bei einer SDS Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht wird. Hiermit ließ sich nachweisen, dass CNP in Aorten nicht nur eine früher beobachtete Aktivierung von GC-A (Waisbrod 2011), sondern auch eine Zunahme der Phosphorylierung von GC-A induziert. Dieser direkte Nachweis einer durch CNP hervorgerufenen posttranslationalen Modifikation bei GC-A stützt damit die Evidenz für eine physiologisch relevante Interaktion zwischen den CNP/GC-B und ANP/GC-A-Signalwegen in den glatten Muskelzellen der Aorta.

Von methodischem Interesse waren die Untersuchungen zur Phosphorylierung von PKA RI. Die Phos-tag-Methode offenbarte hierbei ein attraktives Potential, um durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung verursachte Aktivitätsveränderungen von Kinasen durch Western Blot-Analysen zu erfassen.

4.1 Expression von GC-A im Gefäßabschnitt Aorta

Durch Induktion der cGMP-Produktion ist der ANP/GC-A-Signalweg in vielen Funktionen involviert und spielt eine wichtige Rolle für die zentrale Steuerung von Blutdruck und Wasser-Elektrolyt-Haushalt. Spezifische Effekte zeigen sich v. a. im Gefäßsystem durch Induktion der Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität, in der Niere durch Stimulierung der Natriurese und Diurese sowie in der Nebenniere durch Inhibierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Potter 2011). Mäuse mit fehlender GC-A- oder ANP-Expression entwickeln einen erhöhten arteriellen Blutdruck (20 bis 40 mmHg höher als normal), Herzhypertrophie sowie Herzfibrose, während Tiere mit erhöhter Expression von ANP oder BNP einen um 20 bis 30 mmHg niedrigeren Blutdruck als Tiere mit normaler Expression aufweisen (Lopez et al. 1995; Oliver et al. 1997; Potter et al. 2006; Kuhn 2016). Diese Befunde

Diskussion

deuten auf eine sowohl physiologische als auch potenziell klinische Relevanz des ANP/GC-A-Systems hin.

In früheren Arbeiten wurde die GC-A-Expression in den glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen und deren zentrale Rolle zur Stimulierung der Vasodilatation beschrieben (Potthast et al. 2004; Bryan et al. 2006; Kuhn 2009; Potter 2011). Jüngere Studien zeigten eine besondere Anreicherung und Aktivität in der Aorta (Waisbrod 2011), was auf eine besondere, spezifische Funktion von ANP/GC-A in diesem Gefäßabschnitt hindeuten könnte.

4.2 Komplexe Phosphorylierung und Desensitisierung von GC-A

Es wurde in früheren Studien beschrieben, dass die Aktivität von GC-A durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird (Potter und Garbers 1992, 1994; Potter et al. 2009). Unter basalen Bedingungen ist GC-A an fünf Serin- (Ser-487, Ser-497, Ser-502, Ser-506, und Ser-510) und zwei Threoninresten (Thr-500 und Thr-513) phosphoryliert (Schröter et al. 2010; Yoder et al. 2010, 2012). Dephosphorylierung der Serin- (Ser-497, Ser-502, Ser-506, und Ser-510) und/oder der Threoninreste (Thr-500 und Thr-513) resultiert in eine Desensitisierung von GC-A, die allerdings auch durch Phosphorylierung eines Serinrestes (Serin-487) induziert werden kann (Schröter et al. 2010). Dies offenbart einen komplexen Mechanismus zur Regulation der GC-A-Aktivität (Schröter et al. 2010).

Eine Dephosphorylierung des Rezeptors ist in vielen Fällen als molekularer Mechanismus bei homologen Desensitisierungen von GC-A beschrieben worden (Potter 2011 Kuhn 2016). Die funktionelle Desensitisierung (Abnahme der bei Ligandenbindung induzierbaren cGMP-Synthese) war in einigen Studien bereits nach 15 min evident, aber verstärkte sich nachfolgend und erreichte Maximalwerte bei 30 bis 60 min Inkubationsdauer (z. B., Potter und Hunter 1999; Müller et al. 2006). Die in Rattenaorten beobachtete homologe Desensitisierung von GC-A nach 15-minütiger Prä-

Diskussion

Exposition mit ANP (Waisbrod 2011) war ebenfalls nicht sehr ausgeprägt (Reduktion der cGMP-Produktion um etwa 30%).

Aufgrund meiner Untersuchungen, bei denen ich nur geringe, statistisch nicht signifikante Veränderungen der GC-A-Phosphorylierung nach 15 min ANP-Exposition feststellen konnte, lässt sich meines Erachtens dennoch eine Rolle von Dephosphorylierung bei der Desensibilisierung nicht ausschließen. Hierzu sollten Untersuchungen mit längeren ANP-Prä-Inkubationszeiten durchgeführt werden.

4.3 Sensibilisierung von GC-A durch CNP

Während diverse Mechanismen (siehe vor allem homologe und heterologe Desensibilisierung) zur Aktivitätsreduktion von GC-A aufgeklärt wurden, gibt es bisher kaum Vorstellungen darüber, welche Faktoren und Signalwege für eine (Re-)Sensibilisierung und (Re)Phosphorylierung des Rezeptors verantwortlich sind (Kuhn 2016). In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass CNP-Inkubationen in Rattenaorten eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades von GC-A induzieren. Diese Zunahme an Phosphorylierung könnte somit sehr plausibel die molekulare Basis für die früher beobachtete Zunahme der ANP-induzierbaren cGMP Produktion in Aortengewebe nach CNP-Exposition (Waisbrod 2011) sein. Eine mögliche physiologische Relevanz dieser Interaktion ist vor dem Hintergrund der Aorta-Windkesselfunktion (siehe unten) denkbar. Die molekularen Grundlagen für distinkte funktionale Effekte der beiden cGMP-produzierenden Membranrezeptoren GC-A und GC-B unter Bedingungen einer Ko-Lokalisation in Zellmembranen wurde kürzlich am Beispiel von Kardiomyozyten gezeigt (Subramanian et al. 2018).

4.4 Potenzielle Rolle der natriuretischen Peptide und ihrer Rezeptoren für die Windkesselfunktion der Aorta

In zahlreichen Studien wurde die Aorta untersucht und als repräsentativ für das gesamte Gefäßsystem betrachtet. Manche Arbeiten beschrieben die hormonabhängige Regulation des Gefäßtonus und lieferten damit Erkenntnisse über die Rolle von GC-A

Diskussion

bei zentraler Steuerung von Blutvolumen und Blutdruck (Potter et al. 2006; Potter 2011). Ein sehr wichtige Funktion der Aorta ist die so genannte Windkesselfunktion, die über verschiedene Mechanismen (z. B. die elastischen Eigenschaften) aufrechterhalten wird und für die physiologische Zirkulation von essentieller Bedeutung ist (Westerhof et al. 2009; Krüger et al. 2015). Die Aorta sowie ein Teil des proximalen Gefäßsystems speichern kurzfristig etwa 50 % des während der Systole gepumpten Blutvolumens, welche dann durch das Zusammenziehen der Aorta bei der Diastole in die periphere Zirkulation weitergegeben wird. Hierdurch wird der durch die Herzpumpe erzeugte diskontinuierliche Blutstrom in eine kontinuierliche Strömung umgewandelt. Dieses systolisch-diastolische Zusammenspiel repräsentiert den Windkesselleffekt, der nicht nur die periphere Zirkulation, sondern auch noch das Herz beeinflusst, und führt konsekutiv zur Reduktion des linksventrikulären Nachlastes sowie zur Verbesserung des koronaren Blutflusses und der linksventrikulären Relaxation (Belz 1995).

Die Windkesselfunktion wird laut früherer Arbeiten durch die elastischen Fasern der Aorta reguliert, die ca. 40% der thorakalen Aortenwand ausmachen und in Richtung Peripherie abnehmen (Belz, 1995). Durch einen hohen Blutdruck wird die Dehnungsfähigkeit der elastischen Fasern herabgesetzt (Stratos et al. 1992; Belz, 1995). Etwa. 60 % der thorakalen Aortenwand besteht aus Muskel-, Endothelzellen und restlichen Gewebsbestandteilen, wobei die Muskelzellen den größten Teil darstellen und somit vermutlich eine zentrale Rolle bei der Gefäßfunktion (vor allem bei der Windkesselfunktion) spielen.

Es ist anzunehmen, dass für den Windkesselleffekt eine ANP-induzierte Stimulation der cGMP-Produktion und Vasorelaxation in den glatten Muskelzellen wichtig ist. Der Hauptsyntheseort für die GC-A-Liganden ANP und BNP ist das direkt an die Aorta angrenzende Herz (Goetze et al. 2020). Somit spielt das Organ eine essentielle Rolle für die zentrale Steuerung von Blutvolumen und Blutdruck (Potter 2011), und die Plasmaspiegel von ANP und BNP in Aorta sollten chronisch hoch sein. Unter solchen Bedingungen wäre eine eigentlich zu erwartende homologe Desensitisierung von GC-A (mit der Konsequenz einer reduzierten Relaxationsfähigkeit der glatten Muskelzellen)

Diskussion

ungünstig. Da CNP ebenfalls im Herzen und in den Endothelzellen produziert wird (Goetze et al. 2020), könnte der CNP/GC-B Signalweg in den glatten Muskelzellen dazu dienen, der Desensitisierung von GC-A zur Aufrechterhaltung der Windkesselfunktion entgegenzuwirken.

Die hier diskutierten Mechanismen sind zudem von klinischem Interesse. Bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen kommt es zu einer starken Zunahme der Produktion und Sekretion von ANP und BNP im Herzen (Goetze et al. 2020). Als Folge von Desensitierungsprozessen auf Rezeptorebene ist die hormonelle Wirksamkeit der beiden natriuretischen Peptide im Körper stark reduziert (Kuhn 2016). Inwieweit unter solchen Bedingungen eine reduzierte Windkesselfunktion zum Krankheitsbild beiträgt und ob sich Therapieansätze mit CNP oder anderen GC-B-Agonisten entwickeln lassen, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Der als Guanylatzyklase-A (GC-A) bekannte Rezeptor für das im Herz produzierte Hormon atriales natriuretisches Peptid (ANP) hat physiologische Bedeutung für die Kontrolle von Blutdruck und Flüssigkeitsvolumen. Zusammen mit dem Rezeptor (GC-B) für das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) kommt GC-A in außergewöhnlich hoher Konzentration in den glatten Muskelzellen der Aorta vor. Während GC-A eine Relaxation und damit eine Gefäßerweiterung auslöst, ist die Rolle von GC-B in diesen Zellen weniger klar. Die Aktivität beider Rezeptoren kann durch Dephosphorylierung reduziert und durch Phosphorylierung erhöht werden.

In dieser Arbeit konnte eine neuartige Methode („Phos-tag SDS-PAGE“) zum Nachweis von Veränderungen der Proteinphosphorylierung im Labor eingeführt und genutzt werden. Hiermit ließ sich zeigen, dass Inkubationen mit CNP in Rattenaorten eine starke Zunahme der GC-A Phosphorylierung hervorrufen. Diese Ergebnisse stützen und erklären frühere Befunde einer Verstärkung der cGMP-generierenden und gefäßerweiternden Aktivität von GC-A durch CNP in der Aorta.

Der Mechanismus einer Kreuz-Aktivierung von GC-A durch CNP/GC-B könnte von wesentlicher Bedeutung für die Windkesselfunktion der Aorta sein.

Summary

Guanylyl cyclase-A (GC-A) is known as receptor for the cardiac hormone atrial natriuretic peptide (ANP) and has physiological significance for the control of blood pressure and fluid volume homeostasis. Together with the related receptor guanylyl cyclase-B (GC-B) for C-type natriuretic peptide (CNP), GC-A is present at exceptionally high concentrations in smooth muscle cells of the aorta. While GC-A induces smooth muscle relaxation and vasodilatation, the role for CNP in these cells is less clear. The activity of both receptors can be reduced by dephosphorylation and increased through enhanced phosphorylation.

Zusammenfassung

In this doctoral thesis, I could establish a novel method (“Phos-tag SDS-PAGE”) for the detection of changes in protein phosphorylation. The method allowed to demonstrate that incubations with CNP generated a strong increase in GC-A phosphorylation in rat aortas. These results corroborated and explained previous findings that CNP can enhance the cGMP-generating and vasodilatory activity of GC-A in the aorta.

The vasodilatory activity of GC-A and its cross activation by CNP could play a pivotal role for the “windkessel”-function of the aorta.

Abkürzungsverzeichnis

5. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosin triphosphat
APS	Ammonium persulfat
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
BNP	B -Typ Natriuretisches Peptid
BSA	B ovine Serum A lbumin
cANF	Cys18 Atrialer Natriuretischer F aktor
cAMP	cyclisches Adenosin monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin monophosphat
CNP	C -Typ Natriuretisches Peptid
DTT	D ithio t hreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. E thylendiamintetra a ccetat
ELISA	E nzyme L inked I mmunosorbent A ssay
GC-A	Guanylatzyklase-A (engl. guanylate c yclase A)
GC-B	Guanylatzyklase-B (engl. guanylate c yclase B)
GTP	G uanosin triphosphat
h	Stunde (engl. H our)
HEK	H uman E mryonic K idney
HOPU	H omogenisierungsbu f fer
H ₂ O	W asser
kDa	K ilodalton
KHD	K inase H omologie D omäne
L	L iter
mg	M illigramm
min	M inute
ml	M illiliter
MnCl ₂	M anganchlorid

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger Ribonukleinsäure (engl. messenger Ribonucleic acid)
nM	Nanomolar
NP	Natriuretisches Peptid
NPR-A	Natriuretischer Peptidrezeptor-A
NPR-B	Natriuretischer Peptidrezeptor-B
NPR-C	Natriuretischer Peptidrezeptor-C
Nr.	Nummer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDE	Phosphodiesterase
Phos-tag TM -PAGE	Phos-tagTM- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PKA	cAMP-abhängigen Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PKG I	cGMP-abhängige Proteinkinase I
PKG II	cGMP-abhängige Proteinkinase II
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde (engl. second)
SDS	sodium dodecyl sulfate (engl.)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-buffered Saline (engl.)
TBST	TBS plus Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UZ	Ultrazentrifuge
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Syntheseort und Aufbau der natriuretischen Peptide (Modifizierte Version nach Potter et al. 2006).....	2
Abbildung 1.2: Übersicht über wichtige Zielorgane und lokale Effekte von GC-A. Modifizierte Abbildung nach Potter et al. 2006.....	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von GC-A und GC-B	7
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von GC-A/GC-B-Signalwegen.....	9
Abbildung 1.5: Schema der Aktivitätszustände von GC-A und GC-B.....	13
Abbildung 1.6: Darstellung der Phosphorylierungsstellen bei GC-A und GC-B der Ratte	15
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Präparation und Inkubationen der Aorten.....	25
Abbildung 2.2: Phos-Tag™ -Methode.....	29
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Anordnung in der Transferkammer...	34
Abbildung 3.1: Nachweis der partiellen Phosphorylierung von PKA RI in MA-10-Zellen mittels Phos-tag Gelelektrophorese.....	38
Abbildung 3.2: Analyse der GC-A-Phosphorylierung mittels Phos-tag Gelelektrophorese.....	39
Abbildung 3.3: Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren auf die Detektion von GC-A Phosphorylierung	40
Abbildung 3.4: Inkubationen mit CNP erhöhen den Phosphorylierungsgrad von GC-A in Rattenaorten	41

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

- Abbey SE, Potter LR** (2002) Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations. *The Journal of Biological Chemistry* 277(45):42423–42430.
- Abbey-Hosch SE, Cody AN, Potter LR** (2004) Sphingosine-1-phosphate inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase B (GC-B/NPR-B). *Hypertension* 43(5):1103–1109.
- Airhart N, Yang, YF, Roberts CT, Silberbach M** (2003) Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 278(40): 38693–38698.
- Antos LK, Abbey-Hosch SE, Flora DR, Potter LR** (2005) ATP-independent activation of natriuretic peptide receptors. *J Biol Chem.* 280(29): 26928–26932.
- Belz GG** (1995) Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 9(1): 73–83.
- Bender AT, Beavo JA** (2006) Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacol Rev.* 58(3):488–520.
- Bennett BD, Bennett GL, Vitangcol RV, Jewett JR, Burnier J, Henzel W, Lowe DG** (1991) Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem.* 266(34):23060–23067.
- Brown RL, Strassmaier T, Brady JD, Karpen JW** (2006) The Pharmacology of Cyclic Nucleotide-Gated Channels: Emerging from the Darkness. *Curr Pharm Des.* 12(28):3597–3613.
- Bryan PM, Smirnov D, Smolenski A, Feil S, Feil R, Hofmann F, Lohmann S, Potter LR** (2006) A sensitive method for determining the phosphorylation status of natriuretic peptide receptors: cGK-Ialpha does not regulate NPR-A. *Biochemistry* 45(4):1295–1303.
- Burczynska B, Duda T, Sharma RK** (2007) ATP signaling site in the ARM domain of atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Mol Cell Biochem.* 301(1–2): 93–107.

Literaturverzeichnis

- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP** (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of Cellular Physiology* 184(3):409–420.
- Chinkers M, Garbers DL** (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* 245(4924):1392–1394.
- Chinkers M Singh S, Garbers DL** (1991) Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *The Journal of Biological Chemistry* 266(7):4088–4093.
- Chrisman TD, Perkins DT, Garbers DL** (2003) Identification of a potent serum factor that causes desensitization of the receptor for C-Type natriuretic peptide. *Cell Communication and Signaling: CCS* 1(1):4.
- Cook NJ, Hanke W, Kaupp UB** (1987) Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(2):585–589.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H** (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences* 28(1):89–94.
- de Bold AJ, de Bold ML, Sarda IR** (1986) Functional-morphological studies on in vitro cardionatriin release. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension* 4(2):S3-7.
- Del Ry S** (2013) C-type natriuretic peptide: a new cardiac mediator. *Peptides* 40:93–98.
- Dhallan RS, Yau KW, Schrader KA, Reed RR** (1990) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347(6289):184–187.
- Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR** (2007) Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology* 148(7): 3518–3522.

Literaturverzeichnis

- Dickey DM, Flora DR, Potter LR** (2011) Antibody tracking demonstrates cell type-specific and ligand-independent internalization of guanylyl cyclase a and atriuretic peptide receptor C. *Molecular Pharmacology* 80(1):155–162.
- Duda T, Yadav P, Sharma RK** (2011) Allosteric modification, the primary ATP activation mechanism of ANF-RGC. *Biochemistry* 50(7): 1213–1225.
- Dunkerly-Eyring B, Kass DA** (2020) Myocardial Phosphodiesterase und their Role in cGMP Regulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 75(6): 483-493.
- Edmund AB, Walseth TF, Levinson NM, Potter LR** (2019) The pseudokinase domains of guanylyl cyclase-A and -B allosterically increase the affinity of their catalytic domains for substrate. *Sc. Signal.* 12(566):eaau5378.
- Egbert JR, Shuhaibar LC, Edmund AB, Helden DAV, Robinson JW, Uliasz TF, Baena V, Geerts A, Wunder F, Potter LR, Jaffe LA** (2014) Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development* 141(18): 3594-3604
- Francis SH, Corbin JD** (1999) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 36(4): 275–328.
- Garbers DL** (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71(1): 1-4.
- Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ** (2020) Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol.* 17(11):698-717.
- Goy MF, Oliver PM, Purdy KE, Knowles JW, Fox JE, Mohler P J, Qian X, Smithies O, Maeda N** (2001) Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *The Biochemical Journal* 358(Pt 2): 379–387.
- Klaiber M, Dankworth B, Kruse M, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang R-B, Völker K, Gassner B, Oberwinkler H, Feil R, Freichel M, Groschner K, Skryabin BV, Frantz S, Birnbaumer L, Pongs O, Kuhn M** (2011) A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylylcyclase

Literaturverzeichnis

- A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* (45):18500-5.
- Kaupp UB, Seifert R** (2002) Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiological Reviews* 82(3): 769–824.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T** (2012) Phos-tag Affinity Electrophoresis for Protein Kinase Profiling. *Protein kinase Technologies* 68:13-34.
- Koller K, Lowe D, Bennett G, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel D** (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252(5002): 120–123.
- Krüger T, Grigoraviciute A, Veseli K, Schibilsky D, Wendel HP, Schneider W, Schlensak C** (2015) Elastic properties of the young aorta: ex vivo perfusion experiments in a porcine model. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 48(2): 221–227.
- Kuhn, M.** (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation Research*, 93(8), 700–709.
- Kuhn, M.** (2009) Function and Dysfunction of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors: Lessons from Genetic Mouse Models and Implications for Human Diseases. In H. H. H. W. Schmidt, F. Hofmann, & J.-P. Stasch (Eds.), *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (Vol. 191, pp. 47–69).
- Kuhn M** (2016) Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev.* 96(2):751-804.
- Larose L, Rondeau JJ, Ong H. De Léan, A** (1992) Phosphorylation of atrial natriuretic factor R1 receptor by serine/threonine protein kinases: evidences for receptor regulation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 115(2):203–211.
- Lehners M, Dobrowinski H, Feil S, Feil R** (2018) cGMP Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity. *J Cardiovas Dev Dis* 5(2): 20.

Literaturverzeichnis

- Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH** (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):13414–13419.
- Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A** (1995) Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378:65–68.
- Lorenz R, Bertinetti D, Herberg FW** (2017) cAMP-Dependent Protein Kinase and cGMP-Dependent Protein Kinase as Cyclic Nucleotide Effectors. *Handb Exp Pharmacol* 238: 105-122.
- Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O** (1999) The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13): 7403-7408.
- Matulef K, Zagotta WN** (2003) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19:23–44.
- McArdle CA, Olcese J, Schmidt C, Poch A, Kratzmeier M, Middendorff R** (1994) C-type natriuretic peptide (CNP) in the pituitary: is CNP an autocrine regulator of gonadotropes? *Endocrinology* 135(6): 2794–2801.
- Middendorff R, Waisbrod G, Müller D** (2008) New aspect of CNP function. *Endocrine abstracts* 15:S34.
- Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SLC, Conti M** (2002) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 13(1):29–35.
- Minamino N, Makino Y, Tateyama H, Kangawa K, Matsuo H** (1991) Characterization of immunoreactive human C-type natriuretic peptide in brain and heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179(1): 535–542.
- Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, Young HS** (2011) Structure, signaling mechanism and regulation of natriuretic peptide receptor-guanylate cyclase. *The FEBS Journal* 278(11): 1818–1829.

Literaturverzeichnis

- Miyagi M, Misono KS** (2000) Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1478(1):30–38.
- Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H** (1991a) Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *Journal of Clinical Investigation* 87(4): 1402–1412.
- Müller D, Cortes-Derick L, Budnik LT, Brunswig-Spickenheier B, Pancratius M, Speth RC, Mukhopadhyay AK, Middendorff R** (2006) Homologous and Lysophosphatidic Acid-Induced Desensitization of the Atrial Natriuretic Peptide Receptor, Guanylyl Cyclase-A, in MA-10 Leydig Cells. *Endocrinology* 147(6), 2974–2985.
- Müller D, Greenland KJ, Speth RC, Middendorff R** (2010a) Neuronal differentiation of NG108 cells has impact on nitric oxide- an membrane (natriuretic peptide receptor-A) cyclic GMP-generating proteins. *Molecular und Cellular Endocrinology* 320 (1-2): 118-127.
- Müller, D., Hida, B., Guidone, G., Speth, R. C., Michurina, T. V., Enikolopov, G., & Middendorff, R.** (2009). Expression of Guanylyl Cyclase (GC)-A and GC-B during Brain Development: Evidence for a Role of GC-B in Perinatal Neurogenesis. *Endocrinology*, 150(12): 5520–5529.
- Müller D, Mukhopadhyay AK, Speth RC, Guidone G, Potthast R, Potter LR, Middendorff R** (2004) Spatiotemporal Regulation of the Two Atrial Natriuretic Peptide Receptors in Testis. *Endocrinology* 145(3): 1392–1401.
- Nagase, M., Katafuchi, T., Hirose, S., & Fujita, T.** (1997). Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 15(11), 1235–1243.
- Nakamura M, Ichikawa K, Ito M, Yamamori B, Okinaka T, Isaka N, Yoshida Y, Fujita S, Nakano T** (1999) Effects of the phosphorylation of myosin

Literaturverzeichnis

- phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cellular Signalling* 11(9): 671–676.
- Ogawa H, Yanagawa B, Tanaka K, Ohnishi S, Kataoka M, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda Ogawa H, Kodama M, Aizawa Y, Kangawa K, Nagaya N** (2007) CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356(1):60–66.
- Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N** (1997) Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(26): 14730–14735.
- Otto NM, McDowell WG, Dickey DM, Potter LR** (2017) A Glutamate-Substituted Mutant Mimics the Phosphorylated and Active Form of Guanylyl Cyclase-A. *Mol Pharmacol* 92(1): 67-74.
- Pandey KN** (2014) Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca(2+) release, and activation of protein kinase C. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:75.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszódi A, Andresson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, Hofmann F** (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO Journal* 17(11): 3045–3051.
- Potter LR** (1998) Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization. *Biochemistry* 37(8): 2422–2429.
- Potter LR** (2005) Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 10:1205–1220.
- Potter LR** (2011a) Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cellular Signalling* 23(12):1921–1926.
- Potter LR** (2011b) Natriuretic Peptide Metabolism, Clearance and Degradation. *The FEBS Journal* 278(11): 1808–1817.

Literaturverzeichnis

- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM** (2006) Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocrine Reviews* 27(1):47–72.
- Potter LR, Garbers DL** (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 269(20): 14636–14642.
- Potter LR, Hunter T** (1998a) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Molecular and Cellular Biology* 18(4): 2164–2172.
- Potter LR, Hunter T** (1998b) Identification and Characterization of the Major Phosphorylation Sites of the B-type Natriuretic Peptide Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 273(25): 15533–15539.
- Potter, L. R., & Hunter, T.** (1999). A constitutively “phosphorylated” guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Molecular Biology of the Cell*, 10(6), 1811–1820.
- Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM** (2009) Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications. *Handbook of Experimental Pharmacology* (191): 341–366.
- Potthast R, Abbey-Hosch SE, Antos LK, Marchant JS, Kuhn M, Potter LR** (2004) Calcium-dependent dephosphorylation mediates the hyperosmotic and lysophosphatidic acid-dependent inhibition of natriuretic peptide receptor-B/guanylyl cyclase-B. *The Journal of Biological Chemistry* 279(47): 48513–48519.
- Potthast R, Potter, LR** (2005) Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Peptides* 26(6): 1001–1008.
- Robinson JW, Egbert JR, Davydova J, Schmidt H, Jaffe LA, Potter LR** (2017) Dephosphorylation is the mechanism of fibroblast growth factor inhibition of guanylyl cyclase-B. *Cell Signal* 40: 222-229.
- Safar ME, O'Rourke MF, Fröhlich ED** (2014) Blood Pressure and Arterial Wall Mechanics in Cardiovascular Diseases, Springer: London.
- Schröter J, Zahedi RP, Hartmann M, Gassner B, Gazinski A, Waschke J,**

Literaturverzeichnis

- Sickmann A, Kuhn M** (2010) Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *The FEBS Journal* 277(11): 2440–2453.
- Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V** (2001) Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 66: 241–277.
- Sitaramayya A, Marala RB, Hakki S, Sharma RK** (1991) Interactions of nucleotide analogues with rod outer segment guanylate cyclase. *Biochemistry* 30(27): 6742–6747.
- Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K** (2005) C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 45(4): 608–616.
- Somanna NK, Pandey AC, Arise KK, Nguyen V, Pandey KN** (2013) Functional silencing of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A by microRNA interference: analysis of receptor endocytosis. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 4(1): 41–53.
- Stein BC, Levin, RI** (1998) Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *American Heart Journal* 135(5 Pt 1): 914–923.
- Steinmetz M, Potthast R, Sabrane K, Kuhn M** (2004) Diverging vasorelaxing effects of C-type natriuretic peptide in renal resistance arteries and aortas of GC-A-deficient mice. *Regulatory Peptides* 119(1–2): 31–37.
- Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, Wei CM, Pittelkow MR, Burnett JC** (1992) Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *The American Journal of Physiology* 263(4 Pt 2): H1318-1321.
- Stratos C, Stefanadis C, Kallikazaros I, Boudoulas H, Toutouzas, P** (1992) Ascending aorta distensibility abnormalities in hypertensive patients and response to nifedipine administration. *The American Journal of Medicine* 93(5): 505–512.

Literaturverzeichnis

- Subramanian H, Froese A, Jönsson P, Schmidt H, Gorelik J, Nikolaev VO** (2018) Distinct submembrane localisation compartmentalises cardiac NPR1 and NPR2 signalling to cGMP. *Nat. Commun.* 9(1):2446.
- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H** (1988a) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332(6159): 78–81.
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H** (1990) C-Type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168(2): 863–870.
- Suga, S., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., Yoshimasa, T., & Nakao, K.** (1993). Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology*, 133(6): 3038–3041.
- Togashi K, Kameya T, Kurosawa T, Hasegawa N, Kawakami M** (1992) Concentrations and molecular forms of C-type natriuretic peptide in brain and cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry* 38(10): 2136–2139.
- Tohse N, Nakaya H, Takeda Y, Kanno M** (1995) Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca²⁺ channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. *British Journal of Pharmacology* 114(5): 1076–1082.
- Totsune K, Takahashi K, Ohneda M, Itoi K, Murakami O, Mouri, T** (1994) C-type natriuretic peptide in the human central nervous system: distribution and molecular form. *Peptides* 15(1): 37–40.
- Turnham RE, Scott, JD** (2016) Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene* 577(2): 101–108.
- Waisbrod** (2011) Co-expression of natriuretic peptide receptors and its implications on receptor regulation in smooth muscle cells of the aorta. *Med. Dissertation Universität Gießen.*
- Welch EJ, Jones BW, Scott JD** (2010) Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Molecular Interventions* 10(2): 86–97.
- Westerhof N, Lankhaar JW, Westerhof BE** (2009) The arterial Windkessel. *Medical*

Literaturverzeichnis

- & Biological Engineering & Computing 47(2): 131–141.
- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG** (1991) Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Molecular and Cellular Biology* 11(7): 3454–3462.
- Wilson EM, Chinkers M** (1995) Identification of Sequences Mediating Guanylyl Cyclase Dimerization. *Biochemistry* 34(14): 4696–4701.
- Yan W, Wu F, Morser J, Wu, Q** (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(15): 8525–8529.
- Yeung VT, Ho SK, Nicholls MG, Cockram, CS** (1996) Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. *Peptides* 17(1): 101–106.
- Yoder AR, Robinson JW, Dickey DM, Andersland J, Rose BA, Stone MD, Griffin TJ, Potter LR** (2012) A Functional Screen Provides Evidence for a Conserved, Regulatory, Juxtamembrane Phosphorylation Site in Guanylyl Cyclase A and B. *PLoS ONE*,7(5):7(5):e36747.
- Yoder AR, Stone MD, Griffin TJ, Potter LR** (2010) Mass Spectrometric Identification of Phosphorylation Sites in Guanylyl Cyclase A and B. *Biochemistry* 49(47): 10137–10145.

Erklärung

8. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Wetzlar, 28.12.2022

Omar Al-Oshari

9. Danksagung

„An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt und zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben“

Die Experimente dieser Arbeit wurden unter Betreuung vom Herrn Dr. Dieter Müller und Herrn Prof. Dr. med. Ralf Middendorff im Zeitraum von 2012 bis 2021 am Institute für Anatomie und Zellbiologie an der Liebig-Justus-Universität Gießen angefertigt. Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich in dieser Zeit zusammenarbeiten durfte und die mich bis zum Gelingen meiner Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ralf Middendorff für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die anregende Kritik und die ausgezeichneten Möglichkeiten danken, die mir an seiner Abteilung zur Verfügung gestellt wurden, das Thema zu bearbeiten.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. Dieter Müller (Hamburg) für die optimale und vertrauensvolle Zusammenarbeit, für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, seine konstruktiven Vorschläge und Anregungen, für die stets konstruktiven und hilfreichen Gespräche sowie für seine grenzenlose fachliche sowie persönliche Unterstützung.

Ich bedanke ich mich zudem bei allen Laborkolleginnen und -kollegen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Ralf Middendorff für die stets konstruktiven und hilfreichen Gespräche, für die immer sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, für die Einweisung in Arbeitstechniken sowie für ihre stets freundliche und geduldige Hilfe. Zu nennen sind Sabine Tasch, Jörn Lübberstedt und Andre Kaschtschanow, die mich hervorragend bei der Aneignung der Methodik sowie zum praktischen Gelingen meiner Arbeit unterstützt haben.

9. Danksagung

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich auch bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern und Geschwistern, die mich nicht nur bei dieser Arbeit unterstützt haben, sondern mir in allen Lebenssituationen beigestanden haben. Ein besonderer Dank geht auch an meine Ehefrau, Nada Al-Oshari, für ihre stetigen Aufmunterungen sowie ihre regelmäßige Unterstützung.