

# Funktionelle Studie der NO/cGMP Signalkaskade in Niere und Thrombozyten



## DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)  
der Fakultät IV - Chemie und Pharmazie -  
Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Elisabeth Schinner**  
aus Neustadt/WN  
im Jahr 2010

Dissertation eingereicht: Oktober 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Joachim Wegener  
1. Gutachter (1. Prüfer): Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann  
2. Gutachter (2. Prüfer): Herr Prof. Dr. Armin Kurtz  
3. Prüfer: Herr Prof. Dr. Jörg Heilmann

Meiner Mutter  
und in Gedenken an meinen Vater

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	3
1. EINLEITUNG .....	7
1.1 DIE NO/CGMP/PKG SIGNALKASKADE .....	7
1.2 CGMP-ABHÄNGIGE PROTEINKINASEN.....	9
1.2.1 Struktur.....	9
1.2.2 Lokalisation, Substrate und Funktion.....	10
1.3 DIE NIERE.....	12
1.3.1 Aufbau der Niere.....	12
1.3.2 Physiologische und pathophysiologische Rolle des Glomerulus, insbesondere der Mesangialzellen .....	13
1.3.3 Physiologische und pathophysiologische Rolle des Interstitiums, insbesondere der Fibroblasten .....	15
1.4 VERWENDETE KNOCK-OUT- BZW. TRANSGENE MUTANTEN.....	17
1.5 ZIELE UND FRAGESTELLUNG: FUNKTION DES NO/CGMP/PKG SIGNALWEGES IN MESANGIUM UND INTERSTITIUM.....	18
1.6 DIE THROMBOZYTEN .....	20
1.6.1 MORPHOLOGIE DER THROMBOZYTEN .....	20
1.6.2 Molekulare Mechanismen der Thrombozytenaktivierung bzw. Hemmung.....	23
1.7 ZIELE UND FRAGESTELLUNG: FUNKTION VON IRAG IN DEN THROMBOZYTEN .....	27
2. MATERIAL UND METHODEN .....	28
2.1 VERWENDETE MAUSMUTANTEN .....	28
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	28
2.3 ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOTS, IMMUNHISTO- UND IMMUNCYTOCHEMIE .....	29
2.4 ZELLKULTURMEDIUM UND STIMULANTIEN.....	30
2.5 PRIMER (JEWEILS VON MUS MUSCULUS) FÜR RT-PCR MIT LIGHT CYCLER.....	30
2.6 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL .....	31
2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	31
2.8 STOFFWECHSELVERSUCHE .....	32
2.8.1 Kreatininbestimmung mittels HPLC .....	32
2.9 MESANGIALZELL-VERSUCHE .....	35
2.9.1 Glomeruli-Isolierung.....	35

---

2.9.2 Immuncytochemie .....	37
2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot .....	38
2.9.4 Proliferationsversuche .....	41
2.10 FIBROSE INDUKTION UND –ANALYSE .....	42
2.10.1 Unilaterale Ureter Ligation (UUL).....	42
2.10.2 Immunhistochemie .....	42
2.10.3 Protein-Analyse mittels Western-Blot .....	44
2.10.4 RNA-Analyse am Light Cycler .....	44
2.11 THROMBOZYTENANALYSE .....	48
2.11.1 Luminoaggregometer: Messung der Thrombozytenaggregation und ATP- Sekretion	48
2.11.2 FACS: Detektion der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung, Fibrinogenbindung und P- Selektin-Sekretion .....	50
2.11.2.1 Detektion der Fibrinogenbindung mittels Durchflußzytometrie .....	51
2.11.2.2 Detektion der Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors und der P-Selektin-Sekretion mittels FACS.....	52
2.11.2.3 Auswertung und Kompensation .....	52
2.11.3 Adhäsions-Assay .....	53
3. ERGEBNISSE NIERE-TEIL 1: EXPRESSION UND PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IN DER NIERE .....	55
3.1 EXPRESSION DER cGMP-KINASE I IM GLOMERULUS UND ANGRENZENDEM JGA.....	55
3.1.1 Immunhistochemischer Nachweis der cGKI im JGA .....	55
3.1.2 Immunhistochemischer und immuncytochemischer Nachweis der cGKI in Mesangialzellen .....	56
3.1.3 Substratproteine der cGKI in Mesangialzellen.....	59
3.2 PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IM MESANGIUM .....	60
3.2.1 Urinabgabe und Trinkvolumina .....	61
3.2.2 Ermittlung der GFR .....	63
3.2.3 Ermittlung der Ionenkonzentrationen.....	65
4. DISKUSSION NIERE-TEIL 1: EXPRESSION UND PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IN DER NIERE .....	68
4.1 FUNKTION DER cGKI IM INTRA- UND EXTRAGLOMERULÄREN MESANGIUM .....	68
4.1.1 Beeinflussung der GFR durch die Expression der cGKI in intraglomerulären Mesangialzellen .....	69
4.1.2 Beeinflussung des tubuloglomerulären Feedbacks durch die Expression der cGKI im extraglomerulären Mesangium .....	70

---

4.2 cGMP/PKG-ABHÄNGIGE REGULATION TUBULÄRER IONENTRANSPORTER ALS URSACHE FÜR DIE ABWEICHENDEN IONENKONZENTRATIONEN IN CGKI $\alpha$ -RESCUE-MUTANTEN .....	72
4.2.1 Beeinflussung von Natriumtransportern .....	72
4.2.2 Beeinflussung von Kaliumtransportern .....	74
5. ZUSAMMENFASSUNG NIERE-TEIL 1: EXPRESSION UND PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IN DER NIERE .....	76
6. ERGEBNISSE NIERE-TEIL 2: PATHOPHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IN DER NIERE .....	77
6.1 ROLLE VON cGMP/cGKI FÜR WACHSTUMS- BZW. FIBROSE-VORGÄNGE.....	77
6.1.1 Einfluss von cGMP/cGKI auf die Proliferation von Mesangialzellen.....	77
6.1.2 Einfluss von cGMP/cGKI auf die Progression der renalen Fibrose .....	83
6.1.2.1 Expression der cGKI $\alpha$ im medullären Interstitium .....	83
6.1.2.2 Makroskopische Befunde .....	85
6.1.2.3 Untersuchungen auf mRNA-Ebene mittels Light Cycler .....	85
6.1.2.4 Untersuchungen auf Protein-Ebene mittels Western-Blot und immunhistochemischer Analysen .....	90
7. DISKUSSION NIERE-TEIL 2: PATHOPHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IN DER NIERE .....	94
7.1 ANTIPROLIFERATIVER EFFEKT VON cGMP/cGKI IN MESANGIALZELLEN .....	94
7.2 ANTIFIBROTISCHER EFFEKT VON cGMP/cGKI IN DER NIERE .....	96
8. ZUSAMMENFASSUNG NIERE-TEIL 2: PATHOPHYSIOLOGISCHE FUNKTION DER CGKI IN DER NIERE .....	100
9. ERGEBNISSE THROMBOZYTEN.....	102
9.1 NO/cGMP-ABHÄNGIGE HEMMUNG DER AGGREGATION UND SEKRETION MITTELS IRAG .....	102
9.1.1 Rolle von IRAG für die Hemmung der Aggregation und der ATP-Sekretion aus „dense“ Granula.....	102
9.1.2 Rolle von IRAG für die Hemmung der P-Selektin-Sekretion aus „alpha“ Granula und der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung.....	110
9.2 NO/cGMP-ABHÄNGIGE HEMMUNG DER ADHÄSION AN FIBRINOGEN MITTELS IRAG .....	114
10. DISKUSSION THROMBOZYTEN .....	116
10.1 EINFLUSS VON IRAG AUF DIE HEMMUNG DER AGGREGATION .....	116
10.2 EINFLUSS VON IRAG AUF DIE HEMMUNG DER SEKRETION .....	118
10.3 EINFLUSS VON IRAG AUF DIE HEMMUNG DER ADHÄSION.....	119
10.4 VERGLEICH DER HEMMUNG DER THROMBOZYTENAGGREGATION VERSUS GRANULASEKRETION .....	120

---

10. ZUSAMMENFASSUNG DER ROLLE VON IRAG FÜR DIE THROMBOZYTENAKTIVIERUNG .....	121
11. LITERATURVERZEICHNIS .....	122
12. ANHANG .....	131
12.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	131
12.2 ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....	132
12.3 DANKSAGUNG .....	135
12.4 ERKLÄRUNG .....	136

## 1. Einleitung

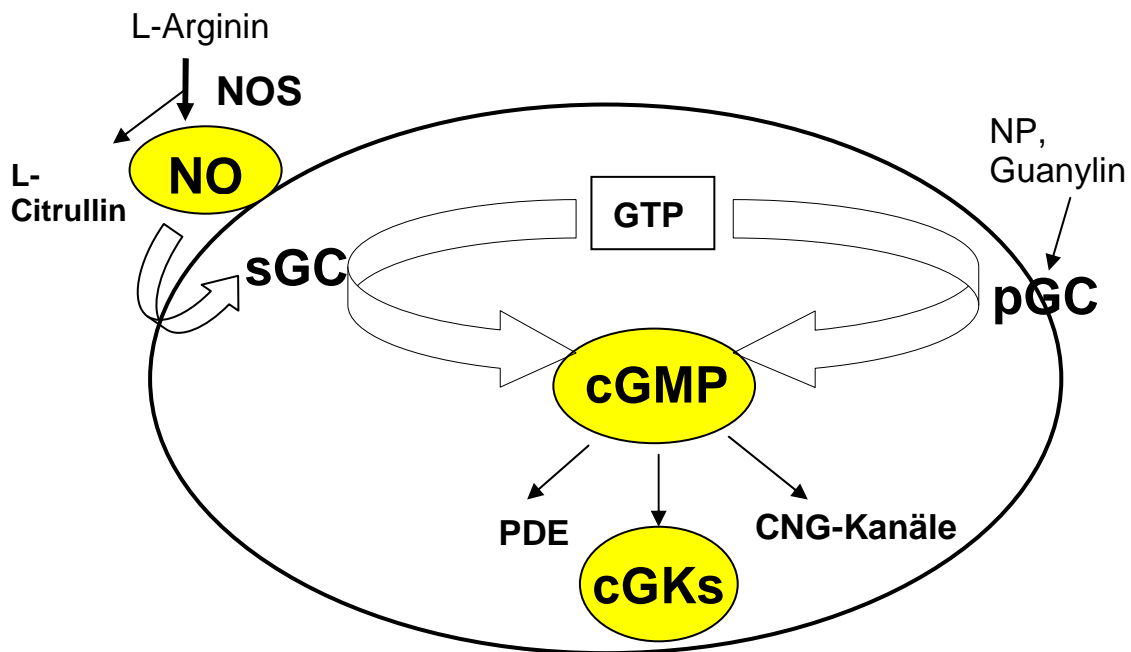
Stickstoffmonoxid, kurz „NO“, erweckt als körpereigener Stoff schon seit Jahrzehnten großes Interesse. Auch wenn bereits Nobelpreise für dessen Entdeckung vergeben wurden (105), besteht noch immer Forschungsbedarf, um mehr über dessen „Signaling“ in Erfahrung zu bringen und dadurch neue Therapieansätze zu entwickeln. Viele NO freisetzende Pharmaka stehen bereits zur Therapie, z.B. von angina pectoris, zur Verfügung. Der Fokus galt in dieser Arbeit dem NO/cGMP/PKG Signalweg, der in zahlreichen (patho-) physiologischen Prozessen seine Relevanz bereits bewiesen hat. Hier wurde dessen Bedeutung zuerst für die Niere bzw. für die renale Fibrose untersucht, während der dritte Teil der Arbeit auf das NO/cGMP „Signaling“ in Thrombozyten eingeht.

### **1.1 Die NO/cGMP/PKG Signalkaskade**

Der Botenstoff Stickstoffmonoxid stellt ein gasförmiges Radikal dar, dessen Bildung endogene NOS (NO-Synthasen) übernehmen, indem sie die Desaminierung von Arginin unter Bildung von Citrullin und NO katalysieren. Bislang werden 3 NOS-Isoformen unterschieden: die nNOS (neuronal NOS), eNOS (endotheliale NOS) und die iNOS (induzierbare NOS). Die Namensgebung der nNOS und eNOS resultierte ursprünglich aus den unterschiedlichen Geweben, in denen sie zuerst nachgewiesen wurden, gilt jedoch inzwischen als überholt. So findet man die endotheliale NOS nicht nur in Endothel-Zellen, sondern auch in Thrombozyten und zahlreichen anderen Zellen, die neuronale NOS in Nervenzellen und die induzierbare NOS vornehmlich in Makrophagen und Neutrophilen (35). Bevorzugt sollte deshalb die Unterteilung in NOS1 (nNOS), NOS2 (iNOS) und NOS3 (eNOS) erfolgen (15). Funktionell lassen sich NOS1 (nNOS) und NOS3 (eNOS) auch unter cNOS (konstitutive NOS) zusammenfassen, da beide Isoformen konstitutiv exprimiert werden. Ihre Aktivität wird durch die freie intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert, weshalb die cNOS auch als Calcium-abhängige NOS bezeichnet werden. Die NOS2 dagegen wird Calcium-unabhängig auf Transkriptionsebene reguliert. Ist sie erst einmal aktiviert, produziert sie weitaus höhere NO-Konzentrationen als die cNOS. Die mutmaßliche Hauptbedeutung der NOS2 (iNOS) liegt daher in der Bildung hoher cytotoxischer NO-Konzentrationen, was auf deren Funktion im Rahmen von Entzündungsreaktionen schließen lässt. Hingegen die Calcium-abhängigen cNOS regulieren über NO/cGMP primär die Kontraktion glatter Muskulatur, aber auch Proliferationsprozesse sowie die Aktivierung von Thrombozyten (58), worauf im Rahmen dieser Arbeit noch detaillierter eingegangen wird. Als



gasförmiges Molekül kann NO frei durch Zellmembranen diffundieren. Der wohl für NO bedeutendste intrazelluläre Rezeptor ist die sGC (soluble Guanylate-Cyclase oder lösliche Guanylyl-Cyclase), einem Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer Häm-bindenden  $\beta$ -Untereinheit. Durch die NO-Bindung an deren Häm-Gruppe wird das Enzym aktiviert, um die Konversion von cGMP (zyklisches Guanosin-3'5'-Mono-Phosphat) aus GTP (Guanosin-5'-Triphosphat) zu katalysieren. Im Gegensatz zu der im Cytosol vorliegenden sGC besitzt die membranständig lokalisierte pGC (partikuläre Guanylyl-Cyclase) keinen NO-bindenden Protoporphyrin IX-Ring, weswegen deren Aktivierung nicht NO übernimmt, sondern NP (natriuretische Peptide) oder Guanylin (36, 74). Das für die Weiterleitung des NO-Signals gebildete cGMP besitzt verschiedene Zielstrukturen, von denen bisher bekannt sind: CNG-Kanäle (cyclic nucleotide-gated channels oder cyclische Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle), cGKs bzw. PKGs (cGMP-abhängige Proteinkinasen) und die PDEs (Phosphodiesterasen).



**Abb. 1: NO/cGMP-Signaltransduktionsweg:** NO wird aus L-Arginin unter Katalyse der NOS synthetisiert, diffundiert über die Zellmembran in die Zelle und aktiviert dort die sGC, welche die Bildung von cGMP aus GTP katalysiert. Diese Synthese erfolgt ferner auch durch die pGC nach Aktivierung durch NP oder Guanylin. cGMP stimuliert schließlich unterschiedliche Effektoren: PDEs, cGKs oder CNG-Kanäle.

Die intrazelluläre Konzentration von cGMP wird durch das Verhältnis zwischen ihrer Produktion durch Guanylyl-Cyclasen und ihrer Degradation durch PDEs reguliert. Bislang sind 11 Familien von PDEs beschrieben, die sich in ihrer Affinität zu cGMP bzw. cAMP unterscheiden. Besonders erwähnenswert sind die PDE2 und die PDE3; denn einerseits hydrolysieren sie spezifisch cAMP, andererseits wird ihre Hydrolyseaktivität

durch cGMP reguliert, indem cGMP PDE2 stimuliert und PDE3 inhibiert. Dadurch kann cGMP auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration Einfluss nehmen (sog. „crosstalk“) (12, 133). Die wichtigste selektiv cGMP-abbauende Phosphodiesterase stellt PDE5 dar, die aber auch durch cGMP selbst stimuliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Funktion des NO/cGMP Signalweges zuerst in der Niere und anschließend in den Thrombozyten untersucht. Während renal als cGMP abbauende PDEs die Familien 1, 9 und 11 besonders erwähnenswert sind, spielt in den Thrombozyten bzgl. cGMP vor allem die PDE5 eine bedeutende Rolle.

Im nächsten Abschnitt werden die cGKs (PKGs) vorgestellt, eine der wichtigsten Zielstrukturen für cGMP.

## **1.2 cGMP-abhängige Proteinkinasen**

Die cGMP-abhängigen Kinasen gehören der Klasse der Serin/Threonin-Kinasen an. Die cGKs bzw. PKGs stellen die Haupteffektoren für cGMP dar. Nach deren Aktivierung katalysieren sie die Übertragung von Phosphatgruppen. ATP fungiert hierbei als Donor, die AS Serin bzw. Threonin als Akzeptoren (101). In Eukaryonten wurden zwei Gene (*prkg1* und *prkg2*) für diese Enzyme identifiziert. *prkg1* kodiert für cGKI, das durch alternatives Spleißen der mRNA in zwei Isoformen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  exprimiert wird. Im Gegensatz zur membranständigen cGKII, die durch das *prkg2* Gen kodiert wird, liegen beide Isoformen im Cytosol in löslicher Form vor (148, 159).

### **1.2.1 Struktur**

Drei funktionelle Domänen determinieren den Aufbau der cGKs:

1. C-terminale (katalytische) Domäne mit je einer Bindungsstelle für ATP und einer für das Substrat, sie katalysiert die Phosphatübertragung von ATP auf das Zielprotein.

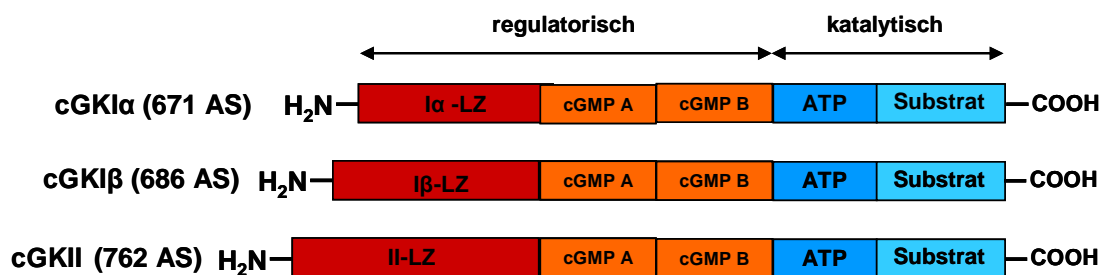
2. Regulatorische Domäne mit einer hoch- und einer niedrigaffinen cGMP Bindungstasche; die Bindung von cGMP induziert eine Konformationsänderung, woraufhin die Hemmung der katalytischen Domäne durch die N-terminale Pseudosubstratbindungsstelle aufgehoben wird.

3. N-terminale Domäne übernimmt mehrere Funktionen:

- Dimerisierung: Mittels eines Leucin-Zipper-Motivs wird die Bildung der Homodimere der cGKs ermöglicht.

- Autoinhibierung: Bei Abwesenheit von cGMP wird das aktive Zentrum des Enzyms inhibiert (Pseudosubstratbindung).
- Targeting: Der Aminoterminus vermittelt die Zielsteuerung der Kinasen zu unterschiedlichen subzellulären Strukturen (57).

Die Formen der cGKI (auch als PKGI bezeichnet) differieren strukturell nur hinsichtlich der unterschiedlich langen aminoterminalen Domänen (159). Zudem ist cGKI $\alpha$  wesentlich sensitiver für cGMP als cGKI $\beta$ ; folglich werden viel (ca. 10 x) geringere cGMP-Konzentrationen für deren Aktivierung benötigt.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur der cGKs:** Die Enzyme bestehen aus einer aminoterminalen Domäne, einer regulatorischen Untereinheit mit dem Leucin-Zipper-Motiv (LZ) und zwei cGMP-Bindungsstellen (cGMP A/cGMP B) und einer katalytischen Untereinheit mit der ATP- und der Substratbindungsstelle sowie einer carboxy-terminalen Domäne. Die (Iso)formen differieren nur hinsichtlich der Anzahl an Aminosäuren (AS).

### 1.2.2 Lokalisation, Substrate und Funktion

Die cGKs werden in verschiedenen Geweben exprimiert, dementsprechend ist deren physiologische Bedeutung unterschiedlich.

Der cGKII wird primär die Regulation von Sekretionsprozessen zugesprochen. Während sie auf die intestinale Wasser- und Chloridsekretion stimulierend wirkt (147), soll die renale Reninfreisetzung durch cGKII unterdrückt werden (150).

Im Rahmen dieser Arbeit steht die cGKI im Vordergrund. Deren starke Expression im glatten Muskel lässt vermuten, welche herausragende Bedeutung ihr für die dort ablaufenden Signalmechanismen zukommt. Unabhängig vom Substrat bewirkt die cGKI vornehmlich eine Relaxation des glatten Muskels. Als Gegenspieler im Sinne einer Kontraktion ist besonders ROCK (RhoKinase) erwähnenswert. Sie hemmt die MLCP (Myosin light chain phosphatase), indem sie deren regulatorische Untereinheit MYPT1 (myosin targeting subunit 1) phosphoryliert. Zwei Optionen stehen der cGKI zur Verfügung, um die kontraktionsfördernde Wirkung von ROCK zu unterbinden. Ein

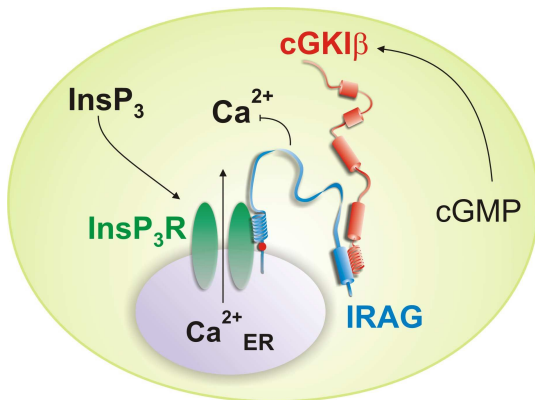
möglicher Signalweg beinhaltet die Phosphorylierung von Rho (kleines GTP bindendes Protein) durch cGKI. Der dadurch gestörte GDP/GTP Austausch bewirkt eine langanhaltende Inaktivität von ROCK, infolgedessen die MLCP aktiv bleibt. Dies mindert die Sensitivität des kontraktiven Apparates für intrazelluläres Calcium (102, 132). Zudem kann cGKI $\alpha$  selbst spezifisch die regulatorische Untereinheit MYPT1 der Myosinphosphatase an Serin (695) phosphorylieren, wodurch die Phosphorylierung des benachbarten Threonins (696) durch ROCK blockiert wird (141, 142). Demzufolge stellt die Phosphorylierung von MYPT1 durch cGKI $\alpha$  einen, von der cytosolischen Calciumkonzentration unabhängigen Signalweg dar, der eine durch ROCK induzierte Kontraktion unterbindet.

Dagegen wird die Offenwahrscheinlichkeit Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Kaliumkanäle (BKCa) in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert. Durch die cGKI induzierte Phosphorylierung des Kanals wird dessen Offenwahrscheinlichkeit begünstigt, resultierend in einem Kaliumausstrom und einer dadurch bedingten Hyperpolarisation. Infolgedessen schließen spannungsabhängige L-Typ-Calcium-Kanäle, wodurch ein weiterer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration unterbleibt. Somit trägt auch dieser Signalweg zur Relaxierung bei, indem die Aktivität der Calcium/Calmodulin-abhängigen MLCK (Myosin light chain kinase) gedrosselt wird (131).

Als ein weiteres Substrat der cGKI wurde RGS2 (regulator of G-Protein Signaling 2) identifiziert (143). Nach deren Phosphorylierung durch cGKI wird die Signalübertragung Gq gekoppelter Rezeptoren unterbunden, indem die GTPase-Aktivität des Gq Proteins erhöht wird (53, 54). Gq gekoppelte Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C unter Bildung von IP<sub>3</sub> (Inositol - 1,4,5 - triphosphat) und DAG (Diacylglycerol). IP<sub>3</sub> triggert nach Bindung an den IP<sub>3</sub> Rezeptor I die Calciumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Die verminderte IP<sub>3</sub> Synthese erklärt die – nach Phosphorylierung durch cGKI – eintretende relaxierende Wirkung des RGS2 Proteins.

Ubiquitär exprimiert ist zudem VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), das auch durch cGKI aktiviert werden kann. Es reguliert zum einen Vorgänge des Aktin-Cytoskeletts und des Vesikel-Transports (17, 52). In Thrombozyten bietet VASP außerdem eine Möglichkeit, Calcium-unabhängig den Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa zu aktivieren (7). Des Weiteren ist - vor allem im Hinblick auf die Thrombozytenversuche - das spezifische cGKI $\beta$  Substrat IRAG von wichtiger Bedeutung, weswegen hierauf separat eingegangen wird.

### cGKI-Substrat IRAG



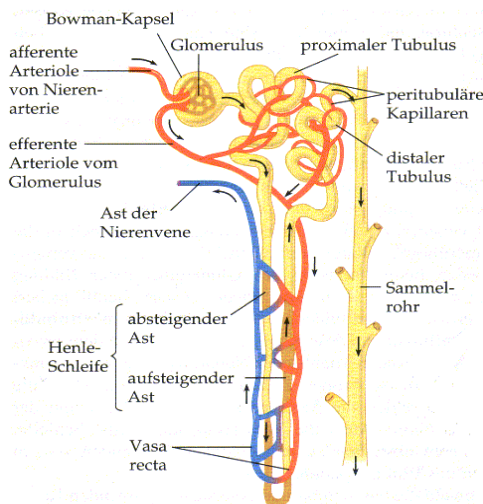
**Abb. 3: Trimerer Komplex** bestehend aus cGKI $\beta$ , IRAG und InsP $_3$  R.

Durch die cGKI $\beta$ -abhängige Phosphorylierung von IRAG (IP $_3$ -Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat) wird der IP $_3$ -Rezeptor (InsP $_3$ R bzw. IP $_3$ RI) vermittelte Calciumausstrom aus dem SR gehemmt (42, 119). IRAG, InsP $_3$ R und cGKI $\beta$  bilden einen stabilen trimeren Komplex aus. Die C-terminal gelegene Transmembrandomäne verankert IRAG am ER, die zentrale coiled-coil Domäne dient der Interaktion mit dem

IP $_3$ -Rezeptor I und an der N-terminalen Domäne befindet sich die Interaktionsstelle mit cGKI $\beta$  (siehe Abb. 3).

## 1.3 Die Niere

### 1.3.1 Aufbau der Niere

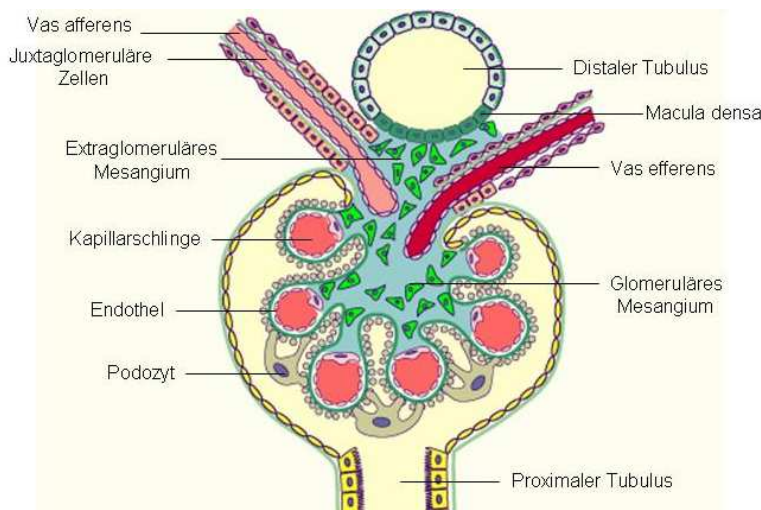


**Abb. 4: Aufbau eines Nephrons** (128)

Die funktionell-histologische Einheit der exkretorischen Niere ist das Nephron (vgl. Abb. 4), bestehend aus dem Corpusculum renale (Nierenkörperchen: Glomerulus und Bowman'scher Kapsel), dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr. Das Blut wird über das Vas afferens dem Glomerulus zugeführt und passiert dort den glomerulären Filter. Das gebildete Ultrafiltrat fließt durch die verschiedenen Tubuli-Abschnitte bis hin zum Sammelrohr, wobei in allen Bereichen diverse

Transport- und Diffusionsprozesse stattfinden, die der Resorption und Sekretion von Ionen und Wasser dienen (120). Die Aufklärung der exakten Lokalisation der cGKI in der Niere musste als Basis für anschließende funktionelle Untersuchungen gewährleistet sein (siehe Ergebnisse). Aussagen sowohl zur Lokalisation als auch zur Funktion der cGKI in der Niere werden im Rahmen dieser Arbeit auf den Glomerulus und das Interstitium beschränkt, weshalb in den beiden kommenden Kapiteln vorerst auch nur diese beiden Strukturen näher vorgestellt werden.

### 1.3.2 Physiologische und pathophysiologische Rolle des Glomerulus, insbesondere der Mesangialzellen



**Abb. 5: Schematische Ansicht eines Nierenkörperchens** (nach Prof. Schwaller, Universität Fribourg, Schweiz)

In den Glomeruli wird das Ultrafiltrat abgepresst. Die GFR (glomeruläre Filtrationsrate) wird hauptsächlich über den Gefäßwiderstand des Vas afferens und des Vas efferens, also dem Filtrationsdruck, -fläche und dem Blutfluss reguliert. Das Mesangium setzt sich aus den beiden Begriffen meso (zwischen) und angi (auf das Blutgefäß bezogen) zusammen. Es wird zwischen intra- und extraglomerulärem Mesangium (Lacis-Zellen) unterschieden. Die Lacis-Zellen sind über Gap-junctions mit dem JGA, sowie miteinander verbunden. Hierdurch wird die Informationsübertragung ausgehend von der Macula densa über die Lacis-Zellen des extraglomerulären Mesangiums bis hin zum JGA gewährleistet, wo die Ausschüttung von Renin stimuliert bzw. unterbunden wird.

In der glomerulären Matrix befinden sich die Mesangialzellen, die vielfältige Funktionen übernehmen. Einerseits verankern sie die Kapillarschlingen des Glomerulus mit dem juxtaglomerulären Apparat, wodurch ihnen eine zentrale Bedeutung beim Erhalt der Struktur und der Funktion des Ultrafiltrationsapparates zukommt (50). Andererseits sind sie befähigt zur Kontraktion, Phagozytose und Synthese von extrazellulärer Matrix sowie zur Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (77). Durch ihren Anteil an Actin und Myosinfilamenten sind sie mit glatten Muskelzellen vergleichbar, was die Kontraktionsfähigkeit der Mesangialzellen erklären könnte. Zudem stehen sie über Mikrofibrillen direkt in Kontakt mit der glomerulären Basalmembran, wodurch sie - als Antwort auf Vasokonstriktoren bzw. Vasorelaxantien - die Geometrie des Kapillarbettes und somit auch die GFR regulieren können (118). Jedoch ist nicht nur die Nachbarschaft zur Basalmembran, sondern auch die zum Endothel von entscheidender funktioneller, vor allem pathophysiologischer Bedeutung, indem aus dem Endothel stammende proinflammatorische Stimuli die Mesangialzellen stimulieren können. Daraufhin setzen diese Zytokine frei, die wiederum die Infiltration von Makrophagen begünstigen (135). Außerdem sezernieren sowohl infiltrierte Makrophagen als auch aktivierte

Mesangialzellen Wachstumsfaktoren, die im Krankheitsfall eine unkontrollierte Zellproliferation sowie eine überschüssige extrazelluläre Matrixbildung induzieren können.

Die wohl bekannteste Signaltransduktionskaskade, die für diesen Prozess ausschlaggebend ist, beginnt mit der Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, nachfolgender Stimulierung der Serin-Threonin-Kinase Raf, durch deren Phosphorylierung die MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinases) MEK (MAP Kinase-Kinase) und im Anschluss die ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktiviert werden (20, 39, 68, 122). Charakteristisch für diese Kinasen ist deren Kontrollfunktion in Prozessen wie Proliferation und Apoptose. Von den MAP-Kinasen existieren verschiedene Gruppen, wobei für die Proliferation vor allem die ERK MAPK von Bedeutung ist, welche durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird. Diese Signaltransduktionskaskade beinhaltet die sequentielle Aktivierung von Ras-Raf-MEK-ERK-Elk-1. Sie ist gerade deshalb erwähnenswert, da deren Bedeutung bereits für die Proliferation von Mesangialzellen diskutiert wurde (25, 78), was auch in dieser Arbeit (Kap. 6.1.1) untersucht wird.

Eine Erkrankung, deren Progression vor allem von Wachstumsfaktoren abhängt, ist die Glomerulosklerose. Ein typisches Kennzeichen eines pathologisch geschädigten Glomerulus ist eine „Verhärtung“ (Sklerose) der Kapillarschlingen. Sie wird durch eine exzessive Expansion des Mesangiums hervorgerufen, wofür wiederum die Wachstumsfaktoren verantwortlich sind.

Die Relevanz der Mesangialzellen sowohl für physiologische als auch für pathophysiologische Vorgänge darf also nicht unterschätzt werden. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, nach Darlegung der Expression der cGKI in den Mesangialzellen auch deren funktionelle Bedeutung zu untersuchen. Die beschriebene Glomerulosklerose wird meist von einer interstitiellen Fibrose begleitet, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

### ***1.3.3 Physiologische und pathophysiologische Rolle des Interstitiums, insbesondere der Fibroblasten***

Das Interstitium der Niere füllt den Raum zwischen den Tubuli aus. Es wird unterteilt in cortikales und medulläres Interstitium. Die hohe Osmolarität des medullären Interstitiums ermöglicht die Aufkonzentrierung des Harns. Das Interstitium dient primär der mechanischen Festigkeit sowie der Integration tubullärer und vaskulärer Parameter.

Unter physiologischen Bedingungen nimmt das Interstitium nur ca. 2 Volumenprozent ein, was durch eine ausgewogene Balance zwischen Synthese und Degradation von extrazellulärer Matrix gewährleistet wird.

Hingegen enden die meisten progressiven Nierenerkrankungen in einer Störung dieses Gleichgewichts, wodurch die Ausbildung einer Fibrose begünstigt wird. Hierfür kennzeichnend ist eine unkontrollierte, überschüssige Bindegewebsvermehrung. Daraus resultiert sowohl eine Verhärtung des Organs, als auch deren Funktionsverlust in Form eines Nierenversagens (95). Aus diesem Grunde ist die Erforschung der zugrunde liegenden pathologischen Signaltransduktionsmechanismen und daraufhin die Entwicklung therapeutischer Ansätze unabdingbar, um in das Krankheitsgeschehen eingreifen zu können, bevor ein irreversibler Funktionsverlust eintritt.

Eine besondere Rolle für die Progression der Fibrose spielen die Fibroblasten. Sie füllen den Raum zwischen den Zellen mit extrazellulärer Matrix und besitzen mesenchymalen Charakter, d.h. sie sind im Gegensatz zu Epithelzellen nicht an eine Basalmembran gebunden sondern frei beweglich. Bei der Entstehung einer Fibrose nehmen tubuläre Epithelzellen die Eigenschaften einer Mesenchymzelle an und differenzieren schließlich zu interstitiellen Myofibroblasten aus (137, 165, 168). Diesen Umwandlungsprozess bezeichnet man als EMT (Epitheliale-Mesenchymale Transition). Er bewirkt eine vermehrte Anhäufung von Myofibroblasten, vornehmlich in peritubulären und periglomerulären Bereichen (8). Die Myofibroblasten unterscheiden sich von den Fibroblasten durch Expression von  $\alpha$ SMA (alpha-smooth-muscle-actin) und durch die vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix (33).

Begünstigt wird diese verstärkte Ausdifferenzierung der Endothelzellen und Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Wachstumsfaktoren: CTGF (Connective-tissue-growth-factor), TGF $\beta$  (Transforming-growth-factor- $\beta$ ) und PDGF-A, -B, -C und -D (Platelet-derived-growth-factor). Sie werden durch die innerhalb weniger Stunden einsetzende Invasion von Monozyten und Makrophagen produziert (10).



Aber nicht nur Wachstumsfaktoren (108) auch Vasokonstriktoren, wie AngiotensinII oder Endothelin (3, 5, 111) beschleunigen den Fibrose-Prozess. Beide Substanzklassen können die Rho-GTPasen aktivieren (81, 139, 111). Eine mögliche Kaskade beinhaltet die Aktivierung von RhoA und deren Kinase ROCK (Rho-assoziierte Protein-Kinase), wodurch smad-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden und die Gentranskription initiiert wird (84):

Bei RhoA handelt es sich um ein sog. kleines G-Protein mit intrinsischer GTPase-Aktivität, welches für die Ausbildung von Aktinstressfasern und fokaler Adhäsion wichtig ist (108). Außerdem ist es an der Regulation von Zytokinen und nachfolgender Zellteilung - speziell den Übergang von G1- zur S-Phase - beteiligt (164). Aktiviertes RhoA wiederum stimuliert ROCK. Nachfolgend regulieren smads die Transkription von Genen für Proteine der extrazellulären Matrix hoch und führen somit zu einer verstärkten ECM (extracellular-matrix) Synthese (110). Es wird bereits postuliert, dass cGKI in diesen Signalweg und dadurch in die Gentranskription eingreifen kann:

In VSMCs (Vascular-smooth-muscle-cells) konnte gezeigt werden, dass eine durch cGKI bedingte Phosphorylierung von RhoA deren Aktivierung und folglich auch die von ROCK unterbindet (116, 117). Ebenso konnte in PaSMCs (Pulmonary-artery-SMCs) nach Endothelin Gabe - als ein vasokonstriktorischer Initiator der Kaskade - zuerst die proliferationsfördernde Bedeutung von RhoA/ROCK und anschließend die durch PKG vermittelte Hemmung nachgewiesen werden (140). Als Marker, um den Verlauf der Fibrose beurteilen zu können, diente hierbei die MMP2 (Matrix-Metallo-Protease 2), da auch deren Expression über RhoA/ROCK reguliert wird. Matrix-Metallo-Proteasen sind für ein Remodelling der ECM sowie für den Abbau der Basalmembran verantwortlich. Wie zu erwarten, ist deren Aktivität auch bei der interstitiellen Fibrose erhöht. Die zitierte Arbeit postulierte, dass durch den PDE5-Inhibitor Sildenafil über cGK der RhoA/ROCK Signalweg gehemmt wird, was eine verringerte MMP2-Expression bewirkt (140). Der protektive Effekt von PDE5-Inhibitoren konnte auch anhand von Vardenafil belegt werden: Bei dieser durch Thy1 induzierten Glomerulonephritis (in Ratten) war die Mesangialzellproliferation und die glomeruläre Matrix-Expansion, gemessen an CollagenIV und Fibronectin, nach deren Verabreichung reduziert (59).

Somit werden erste Parallelen zwischen Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose erkennbar. Ein durch NO/cGMP vermittelter protektiver Effekt wurde bereits mehrfach in verschiedenen Zellkulturen und *in vivo* nachgewiesen (154). Die cGKs als mögliche Effektoren des NO/cGMP Signalweges könnten hierbei eine wichtige Funktion innehaben. Eine Involvierung der cGKI in fibrotische Vorgänge wurde schon in mehreren Arbeiten diskutiert, z.B. bei diabetischer Nephropathie (23, 154). Deswegen sollte im

Rahmen dieser Arbeit nach Darlegung der Expression der cGKs im Interstitium (siehe Kap. 6.1.2.1) deren funktionelle Bedeutung in Hinblick auf die renale Fibrose näher analysiert werden. Das Modell der UUL (unilateralen Ureter Ligation) eignet sich besonders gut zur Fibrose Induktion bei Mäusen (21). Durch das Abschnüren eines Ureters wird ein Harnrückstau hervorgerufen, die kontralaterale Niere bleibt dagegen unbeeinträchtigt. Deswegen dient sie zum einen als Kontrolle, zum anderen ermöglicht sie der Maus ein Weiterleben nach der Operation.

Bisher wurden Effekte der PKG auf fibrotische Prozesse nur anhand von PKG-Inhibitoren gezeigt, deren Spezifität nicht bewiesen ist (16). Wesentlich aussagekräftiger erscheinen dabei *in vivo* Untersuchungen an Gen-spezifischen Knock-out-Tieren beziehungsweise transgenen Mäusen. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien dargelegt werden.

#### **1.4 Verwendete Knock-out- bzw. transgene Mutanten**

Für die funktionelle Untersuchung der cGKI besonders geeignet ist die Analyse von cGKI-Knock-out-Mäusen. Jedoch versterben durchschnittlich 50 % der cGKI-Knock-out-Mäuse innerhalb der ersten 6 Wochen nach ihrer Geburt, vermutlich aufgrund schwerer vaskulärer und intestinaler Defekte (99). Deshalb wurden cGKI $\alpha$ -SM22-Rescue-Mäuse (bzw. cGKI $\beta$ -SM22-Rescue-Mäuse) generiert, bei denen die kodierende Sequenz der cGKI $\alpha$ -Isoform stabil in den SM22-Locus der Maus eingebracht wurde (Knock-in). Dadurch wurde cGKI $\alpha$  unter Kontrolle des SM22-Promotors exprimiert (157). SM22 wiederum ist ausschließlich in Glattmuskel (SM-) Zellen vorzufinden (80, 130). Durch Kreuzung von cGKI $\alpha$ -Knock-in- mit cGKI-Knock-out-Tieren werden Mäuse generiert, die nur die cGKI $\alpha$ -Isoform spezifisch im glatten Muskel exprimieren (cGKI $\alpha$ -SM22-Rescue, im Folgenden cGKI $\alpha$ -Rescue genannt). Verglichen mit den Total-Knock-out-Tieren sind sie wesentlich widerstandsfähiger, was eine höhere Lebenserwartung zur Folge hat (157). Immunhistochemisch überprüft exprimieren die cGKI $\alpha$ -SM22-Rescue-Mäuse cGKI nur in den renalen Arteriolen der Niere, erstaunlicherweise nicht im JGA. Besonderes Augenmerk galt im Rahmen dieser Arbeit dem Glomerulus und dem Interstitium: Auch hier war in den cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäusen keine cGKI-Expression detektierbar. Somit eignete sich dieses Mausmodell ideal, um die Funktion der cGKI in diesen Strukturen zu analysieren. Untersuchungen an den cGKI-KO-Tieren ließen makroskopisch bzgl. Größe und Integrität der Nieren keinen Unterschied erkennen (99). Ebenso wenig konnte ein offensichtlicher renaler Phänotyp festgestellt werden (149), allerdings waren die cGKI-KO-Mäuse wie bereits erwähnt, aufgrund ihres Gesundheitszustandes nur bedingt für

Versuche geeignet. Ein Nachteil der cGKI $\alpha$ -Rescue-Linie ist, dass keine funktionelle Differenzierung zwischen den beiden Isoformen möglich ist.

Dieses Problem kann umgangen werden durch die Untersuchung Isoform spezifischer Substrate. So bieten die zur Verfügung stehenden IRAG-KO-Tiere eine Möglichkeit, die Rolle des cGKI $\beta$ /IRAG Signalweges zu untersuchen (30).

### ***1.5 Ziele und Fragestellung: Funktion des NO/cGMP/PKG Signalweges in Mesangium und Interstitium***

Die Existenz von NO/cGMP-abhängigen Effekten in der Niere ist unbestritten. Eine natriuretische/diuretische Wirkung, sowie eine regulatorische Funktion für die mesangiale Zellkontraktilität wird bereits diskutiert (49, 66, 114). Jedoch ist immer noch unklar, ob die durch NO/cGMP induzierten Effekte über cGKI vermittelt werden. Bevor funktionelle Aussagen getroffen werden, sollte hier zuerst deren Expressionsmuster in der Niere geklärt werden. Immunhistochemische Vorarbeiten zeigten eine auffallend starke Expression der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in den afferenten und efferenten Arteriolen, sowie im Mesangium und eine schwache Expression im cortikalen Interstitium (siehe Kap. 6.1.2.1). Im Gegensatz zur  $\beta$ -Isoform war cGKI $\alpha$  auch im medullären Interstitium und im JGA zu finden.

Über die Weit- bzw. Engstellung des Vas afferens und Vas efferens wird die GFR reguliert. Durch die Expression der cGKI im Vas afferens/Vas efferens und deren Fähigkeit Kontraktions- bzw. Relaxationsvorgänge zu steuern, wäre eine Beeinflussung der GFR durchaus vorstellbar.

Zudem wird der tubuloglomeruläre Feedback der Macula densa an den JGA über das extraglomeruläre Mesangium weitergeleitet. Folglich könnte die cGKI Expression im extraglomerulären Mesangium für die Informationsübertragung eine Rolle spielen. Außerdem wurde cGKI in den Mesangialzellen des intraglomerulären Mesangiums sowohl immunhistochemisch als auch immunocytochemisch nachgewiesen. Aufgrund ihrer Kontraktionsfähigkeit wird den Mesangialzellen ebenso ein möglicher Effekt auf die GFR zugesprochen (136). Denkbar wäre eine cGKI-abhängige Regulierung der Kontraktion und somit auch der GFR. Die Untersuchung der GFR von WT- im Vergleich zu cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäusen war deshalb ein Ansatzpunkt. Zusätzlich zur Normal-Salz-Diät wurden durch Hoch- bzw. Niedrig-Salz-Diäten verschiedene Bedingungen nachgeahmt. Je nach Diät werden unter Kontrolle des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems) unterschiedliche Hormone ausgeschüttet, deren Wirkung an den

verschiedenen Nierenparametern ablesbar ist. Neben der GFR wird außerdem die Salz- und Wasserbilanzierung verändert, die an der aufgenommenen Wassermenge im Vergleich zur abgegebenen Urinmenge sowie den Natrium- bzw. Kaliumkonzentrationen gemessen wurde.

Nicht nur für physiologische, auch für pathophysiologische Prozesse kann eine funktionelle Bedeutung der cGKI nicht ausgeschlossen werden. Interessensschwerpunkt war hier die renale Fibrose, die sich sowohl im Glomerulus (Glomerulosklerose), als auch im Interstitium (interstitielle Fibrose) bzw. in beiden Strukturen manifestieren kann. Die Untersuchung eines möglichen Effektes von cGMP bzw. cGKI erschien auch hier angebracht, nachdem sowohl im Mesangium, als auch im Interstitium cGKI nachgewiesen wurde. In den Mesangialzellen wurde die Wirkung von cGMP auf deren Proliferation analysiert.

Zudem wurde mittels UUL in den verschiedenen Mauslinien eine renale Fibrose induziert. Erster Ansatzpunkt war die Untersuchung fibrosebedingter Expressionsveränderungen. Dabei dienten die Fibrosemarker TGF $\beta$  und FSP1 zur Beurteilung des Krankheitsstadiums. Durch die Applikation eines NO-Donors bzw. sGC-Aktivators konnten NO/cGMP-abhängige Effekte ermittelt werden. Eine Involvierung der cGKI selbst sollten die zur Verfügung stehenden Rescue-Mäuse zeigen. Ob und wenn ja inwieweit die cGKI einen Einfluss auf einen dieser Signalwege ausübt, war eine Zielsetzung dieser Arbeit, wozu am Modell der UUL in der Maus mRNA- und Protein-Analysen durchgeführt wurden.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasst sich primär mit der Funktion des cGKI $\beta$  Substrates IRAG in den Thrombozyten, worauf im nächsten Kapitel eingegangen werden soll.

## **1.6 Die Thrombozyten**

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (KHK) stellen in den westlichen Industrieländern immer noch eine der Haupttodesursachen dar, obwohl zahlreiche Pharmaka für dessen Therapie zur Verfügung stehen. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression der KHK nehmen die Thrombozyten ein. Durch den präventiven Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern sowie durch NO freisetzende Pharmaka sollen thrombotische Ereignisse unterbunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird IRAG als essentielles Effektorprotein für die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaktivierung vorgestellt.

Vorerst soll jedoch in den kommenden Abschnitten auf den Aufbau der Thrombozyten, die Signalwege der Aktivierung, aber auch der Hemmung eingegangen werden.

### **1.6.1 Morphologie der Thrombozyten**

Mit ihrem 2-4  $\mu\text{m}$  stellen die zellkernlosen Thrombozyten die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes dar. Unter physiologischen Bedingungen circulieren 150000 - 400000 Blutplättchen pro  $\mu\text{l}$  Blut mit einer Lebensdauer von 7 bis 10 Tagen. Deren Bildung erfolgt im Knochenmark durch Zytoplasma – Abschnürung ihrer Vorläuferzellen, den Megakaryozyten. Diese wiederum formen sogenannte „proplatelets“, an deren Enden schließlich die Blutplättchen abgeschnürt werden (64, 69). Für deren Speicherung bzw. Abbau dient die Milz und Leber.

Die Ultrastruktur der Thrombozyten lässt sich unterteilen in die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen und das Membransystem:

- Die **periphere Zone** besteht aus der Glykokalyx und aus der Zytoplasmamembran (Phospholipiddoppelschicht, Bilayer), die wiederum aus verschiedenen Glycoproteinen aufgebaut ist. In diese Zone sind die für die Adhäsion und Aktivierung entscheidenden Oberflächenrezeptoren integriert. Das sogenannte „outside in signaling“, d.h. die Signalübertragung in die Plättchen findet hier ihren Ursprung (40).
- Unterhalb der Plasmamembran befindet sich die **strukturelle Zone** bestehend aus dem Zytoskelett, das von den Strukturproteinen, Actin, Myosin und Tubulin gebildet wird. Über Linkermoleküle sind die Glycoproteinrezeptoren der Plasmamembran an das Zytoskelett gebunden.

Diese Verbrückung stabilisiert die Zelle, verhindert die Fusion sekretorischer Organellen mit dem Plasmalemm und bedingt die im Ruhezustand vorliegende diskoide Form der Thrombozyten. Nach Zellaktivierung dissoziieren die Membranrezeptoren vom Zytoskelett, wodurch die Exocytosebarriere aufgehoben wird, resultierend in einer Verschmelzung der Granula mit dem Plasmalemm. Das kontraktile Zytoskelett ermöglicht nicht nur die Exocytosevorgänge, sondern ist auch für die Gestaltsänderung der Thrombozyten, dem sog. „shape change“, verantwortlich (40).

- Im Zytoplasma, die **Zone der Organellen** sind die verschiedenen Speichergranula zu finden, unterteilt in „dense“ (elektronendichte) Granula, „alpha“ Granula und Lysosomen.
- Das **Membransystem** setzt sich dagegen aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System, dem Hauptspeicherort für Calciumionen zusammen. Charakteristisch für das offene kanalikuläre System sind seine weit ins Zellinnere reichenden Kanäle, die gleichzeitig mit der Plasmamembran verbunden sind. Daraus resultiert eine enorme Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten (40).

Zum besseren Verständnis werden im anschließenden Abschnitt verschiedene Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten vorgestellt.

### **Thrombozytenoberflächenrezeptoren**

Rezeptoren sind definiert als an der Oberfläche intakter Zellen nach außen orientierte Membranglycoproteine, die einen Liganden oder Agonisten reversibel und spezifisch binden und dadurch eine (intra)zelluläre Reaktion auslösen (11). Diese GP (Glycoproteine) vermitteln die Interaktion der Thrombozyten untereinander, mit dem Endothel, mit anderen zirkulierenden Zellen und mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Die thrombozytären Membranglycoproteine werden entsprechend ihrer Strukturmerkmale den Selektinen, Integrinen oder leucinreichen Proteinen zugeordnet.

## **Selektine**

Selektine dienen als Oberflächenrezeptoren allgemein der Interaktion und Kooperation von Zellen. Sie werden deshalb auch als Adhäsionsrezeptoren bezeichnet.

### **P-Selektin**

P-Selektin stellt einen Rezeptor dar, genannt CD62P, der sowohl auf der Oberfläche von Endothelzellen als auch Thrombozyten exprimiert wird. Als Adhäsionsmolekül - aufgebaut aus einer langen extrazellulären Domäne, gefolgt von einer dem EGF (epidermalen growth factor) ähnelnden Domäne und einer kurzen intrazellulären Domäne - vermittelt es die Anlagerung von Thrombozyten an Endothelzellen. Zur Mobilisierung des P-Selektins aus den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen werden Minuten benötigt, hingegen zur Membranexposition und Aktivierung des CD62P aus den „alpha“ Granula der Thrombozyten nur wenige Sekunden. Durch die rasche aktivierungsabhängige Rezeptorexposition kann P-Selektin auch als Marker dienen, um den Aktivierungsgrad der Thrombozyten zu quantifizieren (90).

## **Integrine**

Integrine sind heterodimere Membranproteine, bestehend aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, die sich wiederum aus einer großen extrazellulären, einer transmembranären und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne zusammensetzen. Für die Gruppe der Integrin-Rezeptoren charakteristisch, ist die Verbindung von Liganden der extrazellulären Matrix mit dem Zytoplasma, wodurch eine strukturelle Anordnung ermöglicht wird. Als Liganden fungieren Adhäsionsproteine und extrazelluläre Glycoproteine. Viele Integrine erkennen die in den Adhäsionsproteinen enthaltene AS-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Eine besondere Rolle unter den Integrinen nimmt der GPIIb/IIIa Rezeptor ein (47).

### **GPIIb/IIIa Rezeptor**

Der Rezeptor GPIIb/IIIa (Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) gehört zur Superfamilie der Integrine und stellt das am häufigsten und trotzdem selektiv auf Thrombozyten vorkommende Membranpeptid dar. Neben der Plasmamembran und dem offenen kanalikulären System ist es auch in den „alpha“ Granula zu finden (26, 158). Voraussetzung für eine optimale Ligandenbindung, bevorzugt Fibrinogen, ist die nach Aktivierung auftretende Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptors (2). Die erhöhte Fibrinogenbindung induziert eine erneute Aktivierungsverstärkung ins Zellinnere („outside in signaling“) (27, 125) und ermöglicht die Verbrückung der einzelnen Thrombozyten unter Ausbildung eines

Netzwerkes. Fibrinogen besitzt zwar die höchste Affinität zu GPIIb/IIIa, trotzdem wird GPIIb/IIIa als ein multifaktorieller Rezeptor betrachtet, da er auch zur Bindung anderer Moleküle befähigt ist. So wird die Adhäsion zusätzlich über die Bindung des vWF (von Willebrand Faktors) vermittelt (87). Demzufolge übernimmt GPIIb/IIIa eine Schlüsselrolle, indem es für die Adhäsion, Aggregation und Interaktion mit anderen Zellpopulationen verantwortlich ist. Primär dient GPIIb/IIIa jedoch der Aggregation, da sie fast ausschließlich über diesen Rezeptor reguliert wird (124).

#### GPIa/IIa Rezeptor

Integrin  $\alpha 2\beta 1$ , als Ligand dient Collagen (134).

#### Leucinreiche Glycoproteine

Wie der Name bereits vermuten lässt, ist für diese Rezeptor-Gruppe der hohe Anteil der AS Leucin charakteristisch. Wichtige Vertreter stellen GPIV mit Collagen als Ligand dar, sowie GPIb-V-IX, das als Rezeptor für den vWF dient. Beide Komplexe sind am Prozess der Zelladhäsion beteiligt (31).

#### GPVI

GPVI hingegen gehört zur Gruppe der Immunglobuline und dient als thrombozytärer Rezeptor für Collagen zur Thrombozytenaktivierung (72, 92).

Die hier dargestellten Oberflächenrezeptoren sind - wie im nächsten Abschnitt gezeigt - essentiell für den Ablauf der Thrombozytenaktivierung.

### **1.6.2 Molekulare Mechanismen der Thrombozytenaktivierung bzw. Hemmung**

Die Aktivierung der zirkulierenden Thrombozyten kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden: Zum einen durch die Adhäsion an subendotheliale Matrixstrukturen, durch hohe Scherkräfte im Blut oder direkt durch Rezeptorbindung löslicher Plasmaproteine wie Thrombin. Bei Verletzung des Endothels werden subendotheliale Matrixstrukturen - primär Collagenfasern - freigelegt. Aufgrund deren Fähigkeit mit den Thrombozyten zu interagieren, werden sie für das Abfangen („tethering“), das initiale Anhaften („rolling“) sowie die stabile Adhäsion der Blutplättchen verantwortlich gemacht.



Während die initiale Anhaftung über den vWF (GPIb-V-IX mit P-Selektin) vermittelt wird, dient für die stabile Adhäsion Fibrinogen (GPIIb/IIIa mit endothelialen  $\alpha V\beta 3$ ) als Brückenmolekül zwischen Endothel und Thrombozyt (86, 113). Zusätzlich ist Collagen maßgeblich durch GPIa/IIa und über GPVI an der Stabilisierung der Adhäsion beteiligt. Sowohl durch die Adhäsion an Collagen als auch über die direkte Bindung löslicher Agonisten an membranständige Rezeptoren werden intrazelluläre Signalwege („outside in signaling“) stimuliert, was sich in der resultierenden Thrombozytenaktivierung widerspiegelt. Dieses sog. „outside in signaling“ induziert eine morphologische Änderung, im Sinne einer Umlagerung des Zytoskeletts von einer flachen, „diskoiden Linsenform“ in eine „sphärische Kugelform“. Die Ausstülpung von Pseudopodien vergrößert die Thrombozyten – Oberfläche zusätzlich um ein Mehrfaches (shape change), wodurch die Interaktionswahrscheinlichkeit immens erhöht wird. Zudem begünstigt die anschließende Sekretion von Plättchenaktivatoren aus intrazellulären Speicherorganellen die Anlagerung und Aggregation weiterer Thrombozyten. Während aus den „alpha“ Granula Gerinnungsfaktoren, Adhäsionsmoleküle (vWF, Fibronectin, P-Selektin) und Wachstumsfaktoren sezerniert werden, beinhalten die „dense“ Granula unter anderem Calciumionen, ATP und Serotonin. Auch für diese freigesetzten Botenstoffe besitzen die Thrombozyten Rezeptoren, wodurch deren aggregationsfördernde Wirkung erklärbar ist. Die Aktivierungsverstärkung bewirkt außerdem, dass der membranständige Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa eine Konformationsänderung erfährt („inside out signaling“), was die erhöhte Bindungsaffinität zu Fibrinogen erklärt. Im nächsten Abschnitt wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Thrombozytenaktivatoren und deren Signalwege eingegangen.

### **Thrombozytenaktivatoren**

Ein Netzwerk biochemischer Signalwege insbesondere G-Protein gekoppelter Rezeptoren steuert die Physiologie der Thrombozytenaktivierung. Nach Bindung eines Liganden ändert der Rezeptor seine Konformation unter Aktivierung des G-Proteins. Die G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Entscheidend ist die  $\alpha$ -Untereinheit, die im inaktiven Zustand GDP bindet, das nach deren Aktivierung durch GTP ersetzt wird. Dadurch ändert die  $\alpha$ -Untereinheit seine Konformation und dissoziiert zusammen mit GTP vom  $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex steuern verschiedene Effektoren an. Die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert GTP. Folglich bindet die  $\alpha$ -Untereinheit im inaktiven GDP-Grundzustand wieder an den  $\beta\gamma$ -Komplex.

Thrombin und Thromboxan sind Agonisten, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Aktivierung von Thrombozyten beitragen. Durch Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) wird der Thromboxanrezeptor TPα und durch Thrombin der Thrombinrezeptor PAR (human PAR1+PAR4, Maus PAR3+PAR4) (Protease activated receptor) aktiviert (24). Die Thrombinbindung führt zur Abspaltung eines 41 AS Peptids. Das freigelegte aminoternale Rezeptorende (TRAP) bindet intramolekular an eine zentrale Proteindomäne und aktiviert infolgedessen den G-Protein gekoppelten Rezeptor. Thrombin- und Thromboxanrezeptoren sind Gαq (im Folgenden Gq bezeichnet) und Gα12/13 (im Folgenden G12/13 bezeichnet) gekoppelt und leiten im Zusammenspiel eine Formveränderung (shape change) und Aggregation ein (43, 91). Über Gq wird die Phospholipase Cβ aktiviert unter Bildung von IP<sub>3</sub> (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerol). IP<sub>3</sub> induziert die Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher, während DAG zunächst die PKC (Proteinkinase C) aktiviert. Der erhöhte Calcium-Spiegel trägt maßgeblich zur Stimulierung des GPIIb/IIIa Rezeptors bei. Hingegen der PKC vermittelte Signalweg bietet eine Möglichkeit, den GPIIb/IIIa Rezeptor Calcium-unabhängig zu aktivieren. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte spezifische cGKIβ Substrat IRAG hemmt nach bisherigem Stand die intrazelluläre Calciumfreisetzung (4). Auf diesem Mechanismus beruht vermutlich die NO/cGMP induzierte Hemmung der Thrombozytenaggregation. Ausgehend von dieser Hypothese würde IRAG die Calcium-unabhängigen Signalwege der Thrombozytenaktivierung nicht beeinflussen. Deswegen werden im Folgenden sowohl Calcium-abhängige als auch Calcium-unabhängige Kaskaden dargestellt. Beide Signalwege werden durch Gq gekoppelte Rezeptoren vermittelt und besitzen als „down stream“ Effektor die kleine GTPase Rap1, das für die GPIIb/IIIa Aktivierung verantwortlich gemacht wird. Wie für alle GTPase Proteine charakteristisch, existiert auch das Rap Protein aus einem GDP gebundenen inaktiven und GTP gebundenen aktiven Zustand, der durch den GEF (Guanin-nucleotid-exchange-factor) reguliert wird (71). Ca-DAG-GEFI enthält eine Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup> und DAG sowie eine GEF Domäne, die Rab1 aktiviert. Ca-DAG-GEFI und PKC können somit unabhängig voneinander zu einer Aktivierung von Rab1 und dadurch auch von GPIIb/IIIa beitragen (24). Während Ca-DAG-GEFI Rap1 reversibel aktiviert, wird durch PKC eine anhaltende Rap1 Aktivierung induziert. Jedoch wirkt PKC nur indirekt auf Rap aktivierend, indem es die ADP-Freisetzung initiiert, die eigentlich für die Rap Aktivierung über Gi gekoppelte Rezeptoren verantwortlich ist (24). Folglich kann die Aggregation entweder Calcium-abhängig oder Calcium-unabhängig ausgelöst werden (100, 109). Für eine unbeeinträchtigte Sekretion hingegen ist der Ablauf beider Signalwege (Ca-DAG-GEFI und PKC) unerlässlich (100, 109). Wie bereits erwähnt werden durch Thrombin und Thromboxan nicht nur Gq gekoppelte Rezeptoren aktiviert, sondern auch G12/13

gekoppelte. Die Aktivierung der G12/13-Proteine induziert über den RhoKinase Signalweg die Ausbildung des „shape change“. Im Gegensatz zur Aggregation setzt die Sekretion den „shape change“ voraus. Folglich ist die G12/13 Aktivierung für die Sekretion bedeutender als für die Aggregation (97). Die Klasse der G<sub>i</sub> (im Folgenden G<sub>i</sub> bezeichnet) gekoppelten Rezeptoren wird durch Thrombin und TXA<sub>2</sub> nicht aktiviert. G<sub>i</sub> gekoppelte Rezeptoren sind als einzige nicht in der Lage ohne Costimulierung der anderen G-Proteine einen Effekt zu erzielen. Stattdessen dient G<sub>i</sub> vorwiegend der Potenzierung der G<sub>q</sub> Signalwege (29, 123). Trotzdem sind die durch G<sub>i</sub> induzierten Effekte unabdingbar, denn die alleinige G<sub>q</sub> Aktivierung löst nur eine reversible Aggregation aus. Erst durch die simultane Stimulation G<sub>i</sub> gekoppelter Rezeptoren wird die vollständige, irreversible Aggregation eingeleitet. Nachdem Thrombin und Thromboxan keine G<sub>i</sub> gekoppelten Rezeptoren aktivieren können, übernimmt dies ADP, das nach Aktivierung der Thrombozyten sezerniert wird. Vor allem durch Thromboxan (Analagon U46619) bzw. durch niedrige Thrombin-Konzentrationen wird nur eine schwache Sekretion induziert, das dabei sezernierte ADP reicht jedoch trotzdem aus, über den G<sub>i</sub> gekoppelten P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> Rezeptor die Sekretion aufrecht zu erhalten und dadurch eine irreversible Aggregation einzuleiten (38). Durch Coinkubation mit Apyrase, einer löslichen Ectonukleotidase würde also die Sekretion aufgrund des abgebauten ADPs vermindert bzw. gehemmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich Collagen als Thrombozytenaktivator verwendet. Auch Collagen induziert eine intrazelluläre Calciumfreisetzung, die jedoch nicht auf der Stimulierung G Protein gekoppelter Rezeptoren beruht, sondern über den GPVI Rezeptor vermittelt wird, der nachfolgend PLC $\gamma$ /Syk aktiviert. Demzufolge ist die Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors durch Collagen, Thrombin und Thromboxan primär auf einen erhöhten intrazellulären Calcium-Spiegel zurückzuführen.

### **Thrombozyteninhibitoren**

Mittels Inkubation der Thrombozyten mit NO oder Prostacyclinderivaten wird der Calciumanstieg (41), die Fibrinogenbindung (60), die Adhäsion (162) und die Aggregation (121) gehemmt. NO aktiviert die NO sensitive sGC resultierend in einer verstärkten cGMP-Synthese. Die cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation wird primär über die cGMP-abhängige Proteinkinase vermittelt. Während humane Thrombozyten nur cGKI $\beta$  exprimieren, sind in murinen Thrombozyten beide Isoformen zu finden. Durch eine cGK induzierte Phosphorylierung von TP $\alpha$ , des IP<sub>3</sub>-Rezeptors oder der Phospholipase C $\beta$  können verschiedene Signalwege der Plättchenaktivierung gehemmt werden (18, 121, 152). Wie bereits

erwähnt stellt IRAG ein spezifisches cGKI $\beta$  Substrat dar, das in Thrombozyten hoch exprimiert wird. In Kap. 1.7 werden die Ansätze beschrieben, die mittels IRAG defizienter Thrombozyten in dieser Arbeit untersucht wurden.

### ***1.7 Ziele und Fragestellung: Funktion von IRAG in den Thrombozyten***

Antl et. al konnte bereits anhand der IRAG $\Delta$ 12-Mauslinie, bei denen die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor I deletiert wurde, die Bedeutung von IRAG für die Hemmung der Thrombozytenaggregation zeigen (4). Verantwortlich hierfür wurde die durch IRAG induzierte Hemmung des Calciumausstroms aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gemacht. Im Gegensatz zu den IRAG $\Delta$ 12-Mäusen wird bei den IRAG-knock-out-Mäusen kein Protein mehr synthetisiert. Somit bietet dieses Mausmodell eine Möglichkeit zur Untersuchung des NO/cGMP/cGKI/IRAG Signalweges in den Thrombozyten. Ziele dieser Arbeit waren die bisherigen Ergebnisse bzgl. der Aggregation auszuweiten und zudem noch die Rolle von IRAG für die Sekretion der verschiedenen Granula sowie für die Adhäsion zu ermitteln. Die dadurch erlangten Kenntnisse könnten einen Weg aufzeigen, pharmakologisch in den Verlauf arteriosklerotischer Vorgänge zu intervenieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Mausmutanten

Die Generierung der cGKI $\alpha$ -Rescue-Mauslinie wurde von Silke Weber (157), die der IRAG-KO-Mauslinie von Katja Sigl (30) vorgenommen. Im zentralen Tierlabor der Universität Regensburg wurden die Mäuse in einem 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus mit ad libito Zugang zu Wasser und Futter gehalten (Alleinfutter für Ratten und Mäuse-Haltung; ssniff, Soest). Für die Zucht wurden jeweils 2 Weibchen (ab 5 Wochen) mit einem Männchen (ab 6 Wochen) verpaart. Nachkommen wurden mittels PCR von Pfotenbiopsien genotypisiert, nach 4 Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Die für die Experimente verwendeten WT (Wildtyp)-, cGKI $\alpha$ -Rescue-, bzw. IRAG-KO-Mäuse waren 8-14 Wochen alt und besaßen alle den genetischen Hintergrund 129/Sv.

Falls im Rahmen eines Tierversuches eine Anästhesie angebracht war, wurden die Tiere durch Inhalations-Anästhesie mit Isofluran (2,5 % Isofluran in Sauerstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) narkotisiert.

Für die Niedrig- bzw. Hoch-Salz-Diäten wurden die Experimental-Futtermittel von ssniff (Soest) verwendet (Normal-Salz: Alleinfutter für Ratten- und Mäuse-Haltung mit 0,24 % Natrium, Pellets AN: V1534-300; Niedrig-Salz: Natriumarm mit 0,03 % Natrium, Pellets AN: E15430-24; Hoch-Salz: Natrium Exzess mit 4 % Natrium, Pellets AN: E15432-44).

### 2.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer 10x	30 g/l Tris; 144g/l Glycin; 10 g/l SDS; pH 8,3
Laemmli Proben-Puffer 2x (27 ml)	28,8 g Urea; 1,5 g SDS; 1,8 g Dithiothreitol(DTT); 1,5 ml 1M Tris pH 8,0; 6,0 ml Glycerol 50 %; 6,0 mg Bromphenol Blue, a.d. 27ml MQ-H <sub>2</sub> O
Lubrol Puffer 2 %	20 mM Tris; 140 mM NaCl, 2 % Lubrol (Nonaethylenglycol-Monododecyl-Ether); pH 8
TBS 10x	24,2 g/l Tris; 80 g/l NaCl; pH 7,6
TBST	TBS; 0,05 % Tween-20
Tris-HCl Puffer 0,6 M	60 g/l Tris; 40 ml 10 % SDS; a.d. 1 l MQ-H <sub>2</sub> O; pH 6,8
Tris-HCl Puffer 1,8 M	182 g/l Tris; 40 ml 10 % SDS; a.d. 1 l MQ-H <sub>2</sub> O; pH 8,8
Blotting Puffer A1	36,3 g/l Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Blotting Puffer A2	3,6 g/l Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Blotting Puffer K	3 g/l Tris; 5,8 g/l E-Aminocaprinsäure; 20 % Methanol; pH 7,6
PBS	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Fixierlösung	5,37 g/l NaCl; 3,42 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,38 g/l EGTA; 0,41 g/l MgCl <sub>2</sub> ; 34,2 g

Immunhistochemie	Glucose; 30 g/l Paraformaldehyd; pH 7,4
Tris/EDTA	1,2 g/l Tris; 0,372/l EDTA; pH 8,5
Waschpuffer Glomeruli-Isolierung	2,62 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 14,4g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 8,0
HBBS-Puffer	118 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 10 mM Glucose; 20 mM HEPES; pH 7,2

Tab. 1: Puffer und Lösungen

### 2.3 Antikörper für Western-Blots, Immunhisto- und Immunocytochemie

Antikörper gegen	Art	Tier	Verdünnung		Herkunft
			WB	IH	
cGKI $\alpha$	primär	rabbit	1:80	1:25	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKI $\beta$	primär	rabbit	1:1000	1:50	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKI $\gamma$	primär	rabbit		1:40	Lehrstuhlinterne Herstellung
cGKI $\delta$	primär	rabbit	1:800	1:40	Lehrstuhlinterne Herstellung
IRAG	primär	rabbit	1:500		Lehrstuhlinterne Herstellung
VASP allgemein	primär	rabbit	1:2500		Alexis
P-VASP (Ser239)	primär	mouse	1:200		Alexis
IP <sub>3</sub> RI	primär	rabbit	1:1000		abr bioreagents
Desmin	primär	goat	1:800	1:100	Santa Cruz
MYPT1	primär	sheep	1:1000		Santa Cruz
CollagenI	primär	rabbit	1:800	1:100	Abcam
sGC $\beta$ 1	primär	rabbit	1:1000	1:100	Santa Cruz
$\alpha$ -SM-Aktin	primär	mouse	1:1000	1:100	Beckman Coulter
Renin	primär	chicken		1:200	LS Prof. Kurtz
CD31	primär	goat		1:100	Santa Cruz
CLC-KA	primär	rabbit		1:100	Santa Cruz
NHE-3	primär	rabbit		1:100	Santa Cruz
ROMK	primär	goat		1:50	Prof. Warth
Cubilin	primär	goat		1:100	Santa Cruz
Megalín	primär	goat		1:100	Santa Cruz
NCCT	primär	goat		1:40	Santa Cruz
NKCC	primär	rabbit		1:40	Santa Cruz
Podocin	primär	rabbit		1:100	Prof. Witzgall
Podocalyxin	primär	chicken		1:75	Prof. Witzgall
Synaptopodin	primär	mouse		1:40	Prof. Witzgall
AQP2	primär	goat		1:100	Santa Cruz
SM22	primär	goat		1:200	Santa Cruz
Mouse IgG HRP-conjugated	sekundär	goat	1:10000		Sigma Aldrich
Rabbit IgG HRP-conjugated	sekundär	goat	1:50000		dianova
Sheep IgG HRP-conjugated	sekundär	goat	1:50000		dianova
Goat IgG HRP-conjugated	sekundär	rabbit	1:5000		Santa Cruz
Rabbit IgG Alexa 647-conjugated	sekundär	goat	1:400		Invitrogen
Mouse IgG Alexa 488-conjugated	sekundär	donkey	1:400		Invitrogen
Goat IgG TRITC-conjugated	sekundär	donkey	1:400		Dianova
Chicken IgG TRITC-conjugated	sekundär	donkey	1:400		Dianova

Goat IgG Alexa 488-conjugated	sekundär	donkey	1:400	Dianova
Mouse IgG TRITC-conjugated	sekundär	donkey	1:400	Dianova

Tab. 2: Liste der verwendeten Antikörper: WB = WesternBlot; IH = Immunhistochemie

	Adsorption [nm]	Emission [nm]
Alexa 647	647	666
Alexa 488	495, 492	519, 520
TRITC	550	573

Tab. 3: Adsorptions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenz-Farbstoffe

## 2.4 Zellkulturmedium und Stimulantien

Zellkulturmedium: RPMI 1640 without L-Gln, with 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Pan Biotech GmbH, Aidenbach)

Zusätze (Konz. im Medium):  
 330 U Insulin (I6634 Sigma)  
 1 mM Na-Pyruvat (P5280 Sigma)  
 1 mM L-Glutamin (Invitrogen 200 mM)  
 1 % Pen/Strep (Biochrom 10000 U/ml)  
 10 % FCS (Biotech GmbH, 3302-P261412)

Stimulantien:  
 8-Br-cGMP (BioLog, Bremen)  
 PDGF (BB-Homodimer; Calbiochem by Merck, Darmstadt)

## 2.5 Primer (jeweils von *mus musculus*) für RT-PCR mit Light Cycler

### cGKI $\alpha$ :

F: 5' – CGC CAG GCG TTC CGG AAG TT – 3'

R: 5' – GTG CAG AGC TTC ACG CCT T – 3'

### cGKI $\beta$ :

F: 5' – GGA GAA GAT CGA GGA GCT GA – 3'

R: 5' – TTC GTC CTT CTG ATC CAA CTC – 3'

### sGC $\beta$ 1:

F: 5' – AGG TGT GGG AAG ACA TCA AAA - 3'

R: 5' – TCT GAC AAG AAA CTG GCC TTC – 3'

### FSP1:

F: 5' – GAG GAG GCC CTG GAT GTA AT – 3'

R: 5' – CTT CAT TGT CCC TGT TGC TG – 3'

**TGF $\beta$ :**

F: 5' – GGC CAG GTC ATC CAC AGA CA – 3'

R: 5' – CGC TTC GCC GAG GTC TAC AA – 3'

**RhoA:**

F: 5' – GTC GTT CCA GTG AGG AGG AC – 3'

R: 5' – GCC ATG GGC TTT GTC TTA TC – 3'

**ROCK:**

F: 5' – GAT CCC AAA TCG GAA GTG AA – 3'

R: 5' – TCA TAA ACC AGG GCA TCC A – 3'

**18s-rRNA:**

F: 5' – AAA TCA GTT ATG GTT CCT TTG GTC – 3'

R: 5' – GCT CTA GAA TTA CCA CAG TTA TCC AA – 3'

**2.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterial**

Chemikalien und Verbrauchsmaterial wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), BioChrom AG (Berlin); BioLog (Bremen), BioRad, Brand GmbH & Co.KG (Melsungen), Fermentas (St. Leon-Rot), Eppendorf AG (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching), peqLab (Erlangen), Promega (Madison,USA), Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), USB (Staufen), VWR International GmbH (Darmstadt), Whatman plc (Maidstone, UK). Das chirurgische Besteck wurde von Fine science Tools (Heidelberg, Deutschland), das Nahtmaterial von Ethicon (Norderstedt, Deutschland) bezogen.

**2.7 Statistische Auswertung**

Alle Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) dargestellt. Statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's unpaired t-test berechnet. Ein Stern (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten an, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant erachtet wurde. Dementsprechend wurden mit zwei Sternen (\*\*) hoch signifikante Unterschiede mit  $p < 0,001$  und mit drei Sternen (\*\*\*) höchst signifikante Unterschiede mit  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Zur Erstellung der Graphen und dessen Auswertung wurde GraphPad Prism (Version 5.01) verwendet.



## 2.8 Stoffwechselversuche

Metabolismus-Käfige der Firma Tecniplast (Casale Litta, Italien) ermöglichen eine saubere Trennung und zugleich Sammlung von Urin und Faeces. Wie Abb. 6 zeigt, können sich die Tiere im oberen Teil des Käfigs frei auf einem Gitternetz-Rost bewegen, während im unteren Teil über einen konusförmigen Trichter der Urin separat in ein Auffanggefäß abfließen kann. Den Mäusen (4 WT, 4 cGKI $\alpha$ -Rescue) ließ man jeweils 5 Tage Zeit zur Eingewöhnung an den Stoffwechselkäfig bzw. zur Umstellung auf die jeweilige Diät (Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz), währenddessen keine Urin- und Blutabnahme erfolgte. Für die 24 h Sammlung wurden die Käfige gereinigt, das Gewicht der Mäuse



Abb. 6: Stoffwechselkäfig

bestimmt, das Trinkwasser aufgefüllt und gewogen und 2-3 Pellets (der jeweiligen Diät) zugegeben. Nach einem Messzeitraum von 24 h wurden das abgegebene Urin- und das getrunkene Wasservolumen gemessen. Bis zur Bestimmung des Kreatinin-Gehalts bzw. der Elektrolytkonzentrationen wurden die Urinproben bei -20°C aufbewahrt. Zur Berechnung der GFR (glomerulären Filtrationsrate) musste auch die Kreatininkonzentration im Serum bekannt sein. Deswegen wurde den Mäusen unter Isofluran-Anästhesie mithilfe einer Kapillare retrobulbär ca. 40  $\mu$ l Blut entnommen. Zur Gewinnung des Serums ließ man das Blut zunächst 20 min auf Eis gerinnen, um das Serum in einen anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min bei 4°C und 4000 g) abtrennen zu können. Bis zur weiteren Verwendung wurden auch die Serumproben bei -20°C aufbewahrt.

### 2.8.1 Kreatininbestimmung mittels HPLC

Die HPLC-basierte Konzentrationsbestimmung von Kreatinin wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Frieder Kees (Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Regensburg) übernommen.

Die Probenvorbereitung des Serums erfolgte nach folgendem Protokoll:

- je 25  $\mu$ l + 100  $\mu$ l 99,5 % Acetonitril 0,5 % Essigsäure für die Enteiweißung (in einem 0,5 ml-Eppendorf-Cup), gut vortexen und 15 min bei 4°C inkubieren
- Pelletieren der ausgefallenen Proteine durch 1-2 minütige Zentrifugation (10000 rpm)
- Überführen des Überstands in ein neues Cup, im Vakuum eindampfen

- Aufnahme in 50 µl 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 6.8 (Eluent)
- Für die Sedimentation eines eventuellen Niederschlages Wiederholung des Zentrifugations-Schrittes
- Überstand in Mini-Vials überführen
- Injektion von 25 µl auf die Säule

Analog wurden die Urinproben aufbereitet. Die Aufnahme der Pellets nach dem Eindampfen erfolgte dagegen in 500 µl Eluent und injiziert wurden 10 µl.

Für Kreatinin wurde eine Retentionszeit 2,7-3,1 Minuten ermittelt. Zur Kalibrierung wurde eine bekannte, absteigende Konzentrations-Reihe eines externen Kreatinin-Standards (50, 25, 10, 5, 2,5, 1 µg/ml) vermessen. Als zusätzliche Kontrolle stand verdünnter Human-Urin mit bekannter, von einem unabhängigen Institut vermessener Kreatininkonzentration zu Verfügung. Die Chromatogramme wurden anhand der Peakhöhen ausgewertet und daraus die Kreatininkonzentration berechnet. In Tab. 4 sind sowohl die Bedingungen für den HPLC-Lauf als auch Informationen zur verwendeten HPLC-Apparatur zusammengefasst.

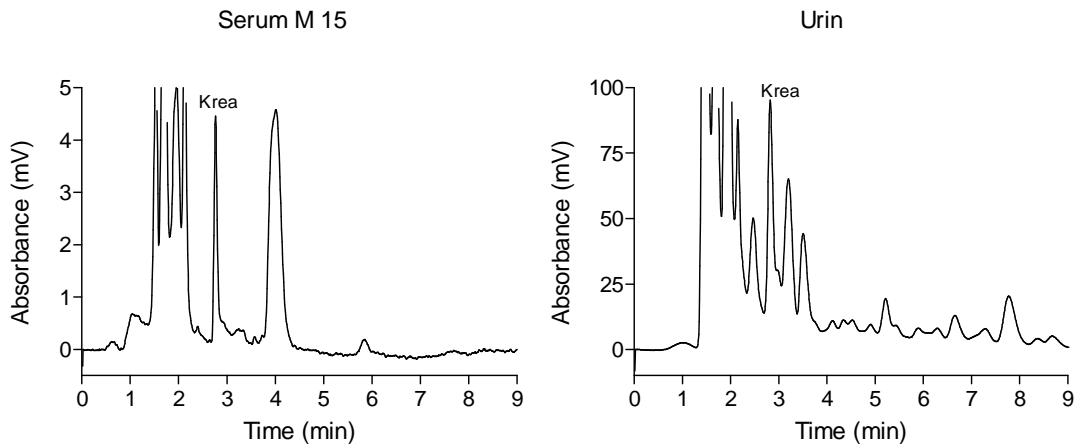
Degasser	DGU 20A3	Säulentemp.	35°C
Pumpe	LC-20AT	Software	LC-Solution
Autosampler	SIL 20AC HAT	Säule	Gemini NX 3 µm, 150x4,6 mm
Säulenofen	CTO 10AS VP	Eluent	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8
UV-Detektor	SPD-20A	Fluss	1,0 ml/min; 122-145 bar
Steuereinheit	CGM 20A	Geräte: Shimadzu (Duisburg)	

**Tab. 4: Bezeichnung der Geräte und technische Daten des HPLC-Laufs**

Die GFR wurde nach Erhalt der Konzentrationen gemäß folgender

$$\text{Formel: } \text{GFR (ml/24h)} = \frac{c(\text{Kreatinin})_{\text{Urin}} \times V(\text{Urin})}{c(\text{Kreatinin})_{\text{Serum}} \times 24\text{h}}$$

berechnet (angegeben in [µl/min]) und durch Division des Körpergewichts normiert. In Abb. 7 ist exemplarisch je ein erhaltenes Chromatogramm für Maus-Serum und -Urin gezeigt.



**Abb. 7: HPLC-Chromatogramme** von Maus-Serum und -Urin: Injektionsvolumen: Serum: 25  $\mu$ l; Urin: 10  $\mu$ l; Retentionszeit Kreatinin: 2,8 min; aus Standard errechnete Kreatininkonzentrationen: Serum: 0,058 mg/dl; Urin: 17 mg/dl.

### 2.8.2 Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen im Urin

Das Prinzip der flammenphotometrischen Elektrolytbestimmung (Gerät: Jenway Flame Photometer PFP 7) beruht darauf, dass der Übergang thermisch angeregter Elektronen in den Grundzustand unter Emission von charakteristischer Strahlung (Natrium: 589 nm, gelb; Kalium: 766 nm, violett) erfolgt. Die hierbei emittierte Lichtintensität ist direkt proportional zur Konzentration des jeweiligen Ions in der Probe. Nach Ansaugen der Lösung, wird sie vor der Flamme vernebelt, das emittierte Licht über optische Filter aufgetrennt und deren Intensität über einen Photo-Detektor in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Vor Messbeginn wurde das Gerät mittels Lösungen bekannter Konzentration (Natrium: 50 mmol/l; Kalium: 50 mmol/l sowie  $H_2O_{bidest}$ , jeweils 1:1000 verdünnt) geeicht. Die Urinproben wurden zuvor mit MQ- $H_2O$  verdünnt (siehe Tab. 5) und in Doppelbestimmung vermessen. Nach jeweils 3-4 Proben war eine erneute Kalibrierung angebracht.

	Natrium	Kalium
Normal-Salz	1:5000	1:10000
Niedrig-Salz	1:1000	1:20000
Hoch-Salz	1:50000	1: 5000

**Tab. 5: Urin-Verdünnungen für Flammenphotometer**

## **2.9 Mesangialzell-Versuche**

### **2.9.1 Glomeruli-Isolierung**

Für die Isolierung der Glomeruli wurden die Mäuse mit PBS perfundiert, der fein suspendierte „MagneticBeads“ (Dynabeads M-450 Epoxy, Dynal Invitrogen Cooperation, Hamburg) enthielt. Die Größe der Beads bedingte, dass sie in den engen Kapillarschlingen der Glomeruli zurückblieben, worauf das Prinzip der Glomeruli-Isolierung beruht. Die Nieren wurden entnommen, klein geschnitten und anschließend durch Collagenase A verdaut. Die Abtrennung unverdauter grober Zellbestandteile erfolgte durch Passage eines Siebfilters.

Für die eigentliche Abtrennung wurde die magnetische Eigenschaft der Beads genutzt. Dadurch wurden nur die an den Beads haftenden Glomeruli unter Zuhilfenahme eines Magneten zurückgehalten, während die restlichen Nierenbestandteile durch zahlreiche Waschschrte entfernt werden konnten.

#### Vorbereitung der Beads

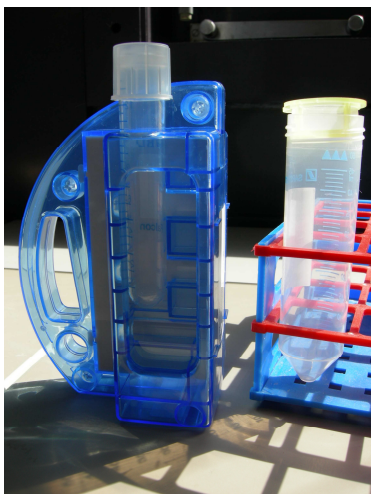
Zunächst wurden die Beads mit einem Puffer am Magneten (BDI Magnet™ Cell Separation Magnet, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gewaschen. Das Waschprinzip der zuvor resuspendierten Beads (200 µl) beruhte darauf, dass sich die Beads im Cup immer der dem Magneten zugewandten Seite anlagerten. Dadurch konnte die klare Pufferlösung abpipettiert werden und die Prozedur mit 1 ml frischem Waschpuffer (siehe Kap. 2.2) wiederholt werden. Nach 4 Waschschrten wurden 200 µl Blockierlösung (5 mg BSA/ml Waschpuffer für Glomeruli-Isolierung) zugegeben und die Beads über Nacht bei RT im Überkopfschüttler blockiert, was der Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen diente. Am folgenden Tag wusch man die Beads mit PBS und lagerte sie bis zur Verwendung in 200 µl PBS bei 4°C. Für die Isolierung der Glomeruli wurde je 1 Aliquot (200 µl) der zuvor blockierten Beads mit 40 ml 40°C-vorgewärmten PBS verdünnt, gut resuspendiert und schließlich die Versuchstiere mit dieser Suspension retrograd arteriell perfundiert.

### Perfusion

Hierzu wurden die Mäuse zunächst durch Isoflurananästhesie narkotisiert und das Abdomen geöffnet, um die Bauchorta frei zu präparieren. Nach Abklemmen der Aorta unterhalb der Abgänge der Arteriae renales konnte durch einen kleinen Schnitt distal zur Klemme der Perfusionskatheter in die Aorta eingeführt und mit einer zusätzlichen Klemme fixiert werden. Als Abfluss für die Perfusionslösung wurde die Vena cava inferior angeschnitten. Nach Entfernen der proximalen Aortenklemme wurden der Maus über den Katheter zunächst ca. 15 ml isotone NaCl-Lösung (Braun, Melsungen) mit 10 I.E./ml Heparin (Ratiopharm, Ulm) infundiert, um einen gerinnungsfreien Blutausstrom zu gewährleisten. Erst dann erfolgte die retrograde Perfusion mit der Dynabeads-Lösung. Über eine Pumpe konnte die Flussrate hierbei konstant auf 15 ml/min eingestellt werden. Nach abgeschlossener Perfusion wurden die Nieren herauspräpariert, deren Kapsel entfernt und mit einem Skalpell auf ca. 1 mm<sup>3</sup> große Würfel zerkleinert, um deren „Verdau“ zu erleichtern.

### Nieren-Lyse und Glomeruli-Isolierung

Hierfür wurden die zerkleinerten Nieren jeweils mit 1 mg/ml Collagenase A (Roche, Mannheim; gelöst in HBBS-Puffer, invitrogen, Hamburg) für 30 min, bei 37°C inkubiert, wobei das Cup alle 5 min einmal geschwenkt wurde, um eine gleichmäßige Lyse zu gewährleisten. Die anschließenden Schritte erfolgten auf Eis. Durch die Passage eines



**Abb. 8: Magnet für die Glomeruli-Isolierung**

100 µm Siebes (Schubert & Weiss GmbH, München) wurden unverdaute grobe Nierenstücke abgetrennt (siehe Abb. 8). Nach Überführen der Nierensuspension in ein entsprechend für den Magneten passendes Röhrchen wurde mit PBS auf die Höhe des Magneten verdünnt, um die volle Länge zur Anlagerung der Beads auszunutzen (siehe Abb. 8). Sie hafteten zusammen mit den Glomeruli an der dem Magneten zugewandten Gefäßwandseite, während die restlichen Nierenbestandteile im PBS verblieben. Durch wiederholtes „Abpipettieren“ des Puffers zusammen mit dem nicht am Magneten haftenden Bestandteilen und

anschließender Wiederaufnahme in frischem PBS wurden die Glomeruli „gereinigt“. Sobald der abpipettierte Puffer unter dem Mikroskop klar erschien, war die Waschprozedur beendet, was nach ca. 8-10 Waschschrinen der Fall war. Die so

gewonnenen Glomeruli wurden anschließend in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in 15 ml Medium aufgenommen und bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die anfangs schneller wachsenden Epithelzellen und Endothelzellen werden nach ca. 3 Wochen von den Mesangialzellen überwuchert (48, 127). Innerhalb dieser Zeit erfolgte der Mediumwechsel in Abhängigkeit vom Verbrauch. Nach dem Verstreichen der 3 Wochen waren die Zellen konfluent und bestanden vorwiegend aus Mesangialzellen, so dass sie passagiert und für die anschließenden Versuche verwendet werden konnten.

### Passagieren der Zellen

Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit Trypsin (5 ml) 3 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Dabei werden die Oberflächenproteine durch das Trypsin verdaut, was ein Ablösen der Zellen von der Flaschenoberfläche bedingt. Zum Schutz der Zellen wurde die Zell-Trypsin-Suspension mit 10 ml Medium verdünnt und in einem Falcon-Röhrchen für 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes, wurde das Pellet je nach Größe in 2 bzw. 4 ml frischem Medium resuspendiert; ein Teil davon in eine neue Zellkulturflasche mit 15 ml vorgelegtem Medium passagiert und ein Teil für das jeweilige Experiment (in Loch-Platten) ausgesät. Die Verwendung einer definierten Zellzahl für die im Anschluss aufgeführten Versuche, wurde durch das Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gewährleistet. Nach jeweils 3 Passagen verwarf man die Zellen.

### **2.9.2 Immunocytochemie**

Immunhistochemische Techniken wurden angewandt, um die Lokalisation von Proteinen in Zellen (Immunocytochemie) und Gewebeschnitten (Immunhistologie) nachzuweisen. Die Detektion basiert auf der Verwendung spezifischer AK (Antikörper), die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, partikulärem Material oder radioaktiven Isotopen gekoppelt sind. Voraussetzungen für die Aussagekraft der Methode sind die Spezifität der verwendeten AK und die Stabilität der antigenen Determinante.

Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz-Markierung bindet der primäre, unkonjugierte AK an das jeweilige Antigen der fixierten Zellen. Anschließend wird mit dem sekundären AK, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären AKs gerichtet ist, inkubiert. Durch Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge kann der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex im Mikroskop betrachtet werden.

Zur immuncytochemischen Untersuchung der Mesangialzellen wurden 10000 Zellen/Loch mit je 250 µl Medium in speziellen 8-Loch-Platten (BD bioscience falcon culture slides, REF354108; Becton-Dickinson, Heidelberg) ausgesät und anschließend 48 h im Wärmeschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Wiesen die Zellen nach zwei Tagen Konfluenz auf, wurden sie nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS für 15 min bei 4°C fixiert. Zur Entfernung des PFAs wurde dreimal mit PBS für je 5 min gewaschen. Um den Antikörpern die Diffusion in das Cytosol der Zelle zu erleichtern, wurden die Zellmembranen mit einem Detergens (0,2 % Triton-X100 in PBS, 10 min) permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen blockierte man 1-2 h bei RT am Feuchtkammerschüttler mit 250 µl 10 % HS (Horse Serum)/1 % BSA in PBS. Nach Absaugen der Blockierlösung wurden die Zellen mit den jeweiligen Primär-AK (in 2,5 % HS/1 % BSA/PBS, 100 µl/Loch) über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 % BSA/PBS wurde der Sekundär-AK (in 1 % BSA/PBS) zugegeben, der bei RT unter Lichtabschluss nach 2 h an den Primär-AK gebunden war. Zum Entfernen ungebundener AK-Reste wurden die Objektträger dreimal je 5 min in eine Küvette mit PBS eingetaucht. Zum Schluss wurden die Zellen mit Glycergel (Dako Glycergel Mounting Medium; Dako, Hamburg) konserviert und am Axiovision oder am konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (LSM 510; Carl Zeiss, Jena) betrachtet. Bei den verwendeten Lasermodulen handelte es sich um einen Argon-Laser mit der ausgesandten Anregungswellenlänge von 488 nm (für Alexa 488), einen 1 mW HeNe-Laser (543 nm, für TRITC) und einen 5 mW HeNe-Laser (633 nm, für Alexa 647).

### **2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot**

#### Probenvorbereitung

Zur Überprüfung der Kinasen-Aktivität wurden jeweils 100000 Zellen/Loch in zwei 6-Loch-Platten mit je 3 ml Medium ausgesät und 7 Tage im Wärmeschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Der Mediumwechsel richtete sich nach deren Verbrauch, erkennbar am Farbumschlag von rosa auf gelb aufgrund des veränderten pH-Wertes. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie nach Absaugen des Mediums unter drei verschiedenen Bedingungen (1. Kontrolle: PBS; 2. Bedingung: 0,5 mM 8-Br-cGMP in PBS; 3. Bedingung: 1 mM 8-Br-cGMP in PBS) 30 min bei 37°C inkubiert. Pro Loch wurden 120 µl Lösung verwendet und pro Bedingung eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Durch die Zugabe von SDS (2 %)/β-Mercaptoethanol (10 %) wurde die

Reaktion abgestoppt, indem die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert wurden. Die Zellen mit der gleichen cGMP-Konzentration bzw. die Kontroll-Zellen wurden jeweils in einem Eppendorf-Cup vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aufgrund der Zugabe des  $\beta$ -Mercaptoethanols war eine Proteinbestimmung mit Lowry bzw. Bradford nicht möglich, da dieser die Farbreaktion in beiden Fällen störte. Es wurden zwar äquivalente Zellzahlen pro Loch ausgesät, trotzdem war ein gleich schnelles Anwachsen der Zellen nicht garantiert. Um diese Fehlerquelle so gut wie möglich zu minimieren, wurden die Zellen mehrmals ausgesät und anschließend gepoolt. Als zusätzliche Kontrolle für gleiche Protein-Mengen im SDS-Page/Western-Blot diente der Vergleich der Bandenintensität entweder der cGKI oder des IP<sub>3</sub> Rezeptors I zwischen unbehandelter und stimulierter Probe.

Für den SDS-Page/Western-Blot wurden jeweils 16  $\mu$ l Probe und 4  $\mu$ l 6 fach-Laemmli verwendet. Nach Denaturierung der Proteine (3 min, 95°C) wurden die Proben möglichst heiß aufgetragen, um die Ausbildung von „Schlieren“ und eine dadurch bedingte ungleichmäßige Taschenbefüllung zu verhindern.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Trenngel (11,5 %) wurde im Mini-Protean-System (von BioRad) bis ca. 2 cm unterhalb des Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet (Inhaltsangaben vgl. Tab. 6, die Angaben beziehen sich auf die benötigten Mengen für zwei Gele). Nach deren Aushärtung wurde der Isopropanol entfernt, mit Wasser nachgespült, das Sammelgel (5 %) aufgegossen und der Kamm eingesetzt. Wenn das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte der Kamm entfernt, die gebildeten Taschen gespült, die Glasplatten mit dem Gel in die Apparatur eingebaut und mit Elektrophorese-Puffer befüllt werden. Die Auftrennung der Proteine (plus Proteinstandard, Fermentas PageRuler™, Prestained Protein Ladder, #SM0671) erfolgt bei 150 V für ca. 90 min.

	Trenngel 11,5 %	Sammelgel 5 %
H <sub>2</sub> O	6,5 ml	3,6 ml
30 % Acrylamid/0,2 % Bisacrylamid	6,5 ml	0,83 ml
Tris-HCl Puffer 1,8 M, pH 8,8	3,6 ml	/
Tris-HCl Puffer 0,6 M, pH 6,8	/	0,5 ml
10 % SDS	167 $\mu$ l	50 $\mu$ l
10 % APS	200 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Temed	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tab. 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele**



### Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran mittels Semidry-Verfahren übertragen (76). Nach Zuschneiden und Tränken der Filterpapiere (Whatman Chromatography Paper, Whatman, Maidstone, UK) und der PVDF-Membran (Millipore Immobilon®, PVDF, 0,45 µm; Carl Roth, Karlsruhe) wurde in folgender Reihenfolge luftblasenfrei von unten (Anode) nach oben (Kathode) zwischen zwei Graphit-Platten in der Blotting Apparatur (semi DRY, SD 20 Semi Dry Maxi, 20\*20 cm System) aufgebaut:

- 3 Lagen Filterpapier mit Blotting Puffer A1
- 2 Lagen Filterpapier mit Blotting Puffer A2
- Membran (zuvor in Methanol getränkt)
- Gel (zuvor in Blotting Puffer A2 getränkt)
- 5 Lagen Filterpapier mit Blotting Puffer K

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 60 mA (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) pro Gel für 60 min

### Antikörper-Färbung und Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotten für mindestens 2 h in 5 % Magermilchpulver (Saliter)/TBST bei RT geschwenkt. Nach Abgießen der Blockier-Lösung, wusch man dreimal je 5 min mit TBST. Um parallel die Anwesenheit verschiedener Proteine detektieren zu können, wurde die Membran je nach Molekulargewicht des Proteins in einzelne Streifen geschnitten und diese über Nacht bei 4°C am Schwenker mit den gewünschten Primär-AK (Verdünnungen erfolgten in Lösungen entsprechend Herstellerangaben) inkubiert. Ungebundener Primär-AK wurde am darauffolgenden Tag durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit TBST entfernt, um anschließend die spezifische Bindung des jeweiligen Sekundär-AKs (verdünnt in 2 % Milchpulver in TBST) zu optimieren. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde auch überschüssiger Sekundär-AK mit TBST abgewaschen (viermal, je 5 min). Das Prinzip der Detektionsmethode beruht darauf, dass der Sekundär-AK mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Dieses HRP ermöglicht eine Chemilumineszenz-Reaktion, indem es als Katalysator für die Oxidation des Luminols dient. Dabei entstehende Lichtquanten können photochemisch auf einem Film detektiert werden.

Dazu wurde die Membran mit je 0,5 ml Luminol und Oxidator (Thermo Scientific, Rockford, USA) für ca. 2-3 min inkubiert. In der Dunkelkammer (bei Rotlicht in einer Entwicklerkassette) wurde der Film (Amersham Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence film; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) belichtet, die dafür benötigte Expositionszeit variierte je nach Sensitivität des verwendeten Antikörpers. Mit einer Entwicklermaschine wurde der Film (CAWOMAT 2000 IR Typ 9462/306; Cavo, Schrobenehausen) schließlich entwickelt.

#### **2.9.4 Proliferationsversuche**

In einer 96-Loch-Platte (Nunc, Roskilde, DK) wurden je 5000 Mesangialzellen/Loch unter Abwesenheit bzw. Anwesenheit von 0,5 mM bzw. 1 mM 8-Br-cGMP ausgesät, um die Wirkung von cGMP auf proliferierende Zellen untersuchen zu können. Zur Gewährleistung einer optimalen homogenen Verteilung wurden Zellen und Reagenz in einem größeren, sterilen Gefäß vorgemischt und anschließend per Multipipette in die einzelnen Löcher verteilt (je 100 µl). Um Schwankungen zu minimieren wurden zudem jeweils 12 mal Zellen mit den gleichen Bedingungen ausgesät, d.h. je 12 Löcher enthielten die gleiche cGMP-Konzentration bzw. kein cGMP als Negativ-Kontrolle. Zusätzlich diente PDGF (0,01 µg/ml) als Kontrolle zur Stimulierung des Wachstums. Aufgrund der Existenz verschiedener PDGF-Isoformen, die sich wiederum zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern können, sei besonders auf die exakte Bezeichnung des in dieser Arbeit verwendeten PDGF-BB-Homodimers hingewiesen (34). Die Wahl fiel auf diese Isoform, weil laut Wallmon das PDGF-BB-Homodimer in Ratten-Mesangialzellen die potenteste mitogene Wirkung besaß (151). Auch das Proliferationsverhalten PDGF stimulierter Zellen wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von cGMP untersucht. Nach 72 h Inkubation im Wärmeschrank wurden die Zellen einmal mit FCS-freiem Medium gewaschen und die Zellproliferation schließlich mit dem Promega CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Mannheim) gemessen. Hierfür wurde jeweils ein homogen vermischter Ansatz (9 Teile FCS freies Medium und 1 Teil Assay-Reagenz) hergestellt und mittels Multipipette in die Löcher (je 100 µl) verteilt. Die Farbentwicklung fand im Wärmeschrank statt. Nach ca. einer Stunde beginnend wurde die Extinktion am Zellplatten-Photometer vermessen und zwar solange bis sie für die Kontroll-Zellen bei ca. 0,4 lag. Aus drei Extinktionswerten des Medium/Assay-Reagenzes ohne Zellen wurde der „Blank“-Wert ermittelt und von den Extinktionswerten der behandelten Zellen abgezogen.

## **2.10 Fibrose Induktion und –Analyse**

### **2.10.1 Unilaterale Ureter Ligation (UUL)**

Das Modell der unilateralen Ureter Ligation ist sehr gut etabliert, um bei Mäusen eine renale Fibrose zu induzieren (21). Dabei wird unter Isoflurananästhesie die Bauchdecke lateral mit einem kleinen Schnitt geöffnet, mit Klammern aufgespannt und nach Beiseiteschieben der Gedärme ein Ureter freigelegt. Diesen schnürt man zweimal mit je einem Doppel-Knoten fest ab, wodurch der Harn aus dieser Niere nicht mehr abfließen kann. Zum Nähen der Bauchdecke wurde ein resorbierbarer (Vicryl, 3-0 (2 Ph. Eur.), V393), zum Nähen des Oberfells ein nicht-resorbierbarer Faden (Polypropylen, 4-0 (1.5 Ph. Eur.), EH7692; beide Fäden Ethicon, Norderstedt) verwendet. Bis zur Perfusion wurden die Mäuse ausreichend mit Trinkwasser und Futter versorgt. Als Kontrolle für die Versuche diente jeweils die kontralaterale Niere.

### **2.10.2 Immunhistochemie**

Unter Immunhistochemie versteht man im Gegensatz zur Immuncytochemie das Detektieren von Antigenen in Gewebeschnitten. Das Prinzip ähnelt sehr dem der Immuncytochemie, wenngleich die Vorbereitung hierbei aufwendiger ist, da zunächst das jeweilige Gewebe perfundiert, fixiert, dehydriert, für Paraffin-Schnitte in Paraffin eingebettet, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen werden muss, bevor die eigentlichen Antikörper-Reaktionen erfolgen können.

#### Perfusion

Analog Kap. 2.9.1 erfolgte die Perfusion, jedoch ist für immunhistochemische Zwecke eine zusätzliche Fixierung der Proteinstruktur angebracht. Die Quervernetzungen verhindern autokatalytische Prozesse, wodurch die Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand erhalten bleibt. Zudem wird das Gewebe steifer und dadurch leichter schneidbar. Nach Entnahme und Entfernen der Nierenkapsel können die Nieren bis zur weiteren Verwendung in 70 % Methanol aufbewahrt werden.

#### Dehydrierung und Paraffineinbettung

Durch eine Methanolreihe zunehmender Konzentration wurden die fixierten Nieren (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, je zweimal 30 min) schrittweise dehydriert. Anschließend wurde

mit 100 % Isopropanol (je dreimal 30 min) gespült, wobei das letzte Isopropanolbad bei 45°C stattfand. Das im Anschluss auf 55°C temperierte Isopropanol/Paraffin (1:1) - Gemisch sollte die Diffusion des Paraffins in das Gewebe erleichtern, bevor die Nieren für mind. 24 h bei 60°C in reinem Paraffin (Paraplast X-tra P3808, Sigma-Aldrich, Steinheim) getränkt wurden. Zuletzt bettete man die Gewebe in „Förmchen“ in flüssiges Paraffin ein; bis zum Schneiden, mindestens jedoch 24 h, ließ man das Paraffin bei 4°C aushärten.

### Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S; Thermo Scientific; Waltham, USA) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Polysine™; Meinel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und ü.N. bei 37°C getrocknet. Für die anschließenden Färbungen wurden die Schnitte zweimal 10 min in 100 % Xylol, dreimal 5 min in 100 % Isopropanol und schließlich zweimal 5 min in 100 % Methanol getaucht und dadurch entparaffiniert und rehydriert.

### Immunhistochemische Färbung

Wie bereits erwähnt, verläuft die Färbung von Gewebeschnitten ähnlich der von Zellen. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> getaucht und dann zur Demaskierung 1 h in Tris/EDTA (siehe Kap. 2.2) gekocht. Hierbei werden die Quervernetzungen der Proteine durch die Fixierung zum Teil wieder rückgängig gemacht, so dass die Immunreaktivität dieser Proteine wieder hergestellt wird. Nach ca. 15 min Abkühlen der Schnitte auf RT wurden die Präparate zunächst 20 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol bei RT blockiert, zweimal 5 min mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungen mit 10 % HS und 1 % BSA in PBS (1-2 h, RT) abgesättigt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen Primär-AK (in 2,5 % HS, 1 % BSA) im Feuchtkammerschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 % BSA in PBS (je 5 min) konnte die Bindung des fluoreszenzgekoppelten Sekundär-AKs (verdünnt in 1 % BSA/PBS, 2 h bei RT) unter Lichtausschluss erfolgen. Anschließend wurden die Schnitte in PBS getaucht (ca. 5-10 min). Auf Erfahrung basierend (Anna M'Bangui, LS Prof.Kurtz) konnte eine optimale Färbung mit möglichst wenig Fluoreszenz Hintergrund durch eine 10 minütige Inkubation der Schnitte im Wasserbad bei 37°C mit PBS/Phenylhydrazin (2 mg pro 100 ml) und nachfolgender Zugabe von 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Endkonzentration: 0,0006 %) für weitere 20 min erreicht werden. Zuletzt musste das

toxische Phenylhydrazin durch dreimaliges Waschen wieder entfernt werden, bis die Präparate schließlich mit einem Deckgläschen und mit Glycerin (Dako Glycergel Mounting Medium; Dako, Hamburg) versiegelt werden konnten. Die Software AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss, Jena) ermöglichte die Aufnahme von Übersichtsbildern an dem Axiovert 200M Mikroskop, indem die einzelnen Bildquadrate mittels AxioVision zu einem großen Bild zusammengefügt wurden.

### **2.10.3 Protein-Analyse mittels Western-Blot**

Für die Protein- und die RNA-Analyse wurden die Mäuse mit je 20 ml Spüllösung zur Entfernung des Blutes perfundiert, welches wiederum Kinasen bzw. Substrate enthält und somit die Analyse stören würde. Unmittelbar nach Entnahme und Abziehen der Kapsel wurden die Nieren halbiert (je eine Hälfte für RNA-Extraktion bzw. Protein-Analyse), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Mittels Ultraturrax (Typ TP 18\_10; Janke&Kunkel KG, IKA-Werk, Staufen i. Br.) wurden die halben Nieren in Lubrolpuffer (1 ml) + PI homogenisiert und anschließend ca. 1 min auf Eis inkubiert. Nach Absetzen des Schaums konnten unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugieren (13000 rpm für 5 min bei 4°C) entfernt werden. Anschließend wurde im Überstand die Proteinkonzentration mittels Lowry analog Herstellerangaben (DC Protein Assays; BioRad, München) bestimmt. Das Gel wurde mit 70 µg Protein pro Spur beladen, Anleitung für SDS-PAGE & Western-Blot vgl. 2.9.3.

### **2.10.4 RNA-Analyse am Light Cycler**

#### RNA-Extraktion

Zur RNA-Isolation wurde das PeqGOLD TriFast™ Reagenz (PeqLab, Erlangen) basierend auf der Phenol/Chloroform-Extraktion eingesetzt. Dabei wurde eine Nieren-Hälfte mit TriFast (1 ml) am UltraTurrax homogenisiert, 5 min bei RT inkubiert, Chloroform (200 µl) zugegeben, heftig geschüttelt und 3 min bei RT stehen gelassen. Für die Phasen-Trennung wurde 15 min bei 6000 g und 4°C zentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen, in ein neues Cup überführt und nach Zugabe von Isopropanol (500 µl) gemischt und erneut 10 min bei RT inkubiert. Die gefällte RNA erhielt man durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 6000 g und 4°C). Nach Abnahme des Überstandes, wusch man das Pellet mit 70 % Ethanol (1 ml),

zentrifugierte (5 min, 6000 g, 4°C) noch einmal, um den Ethanol so gut wie möglich abpipettieren zu können und ließ das Pellet ca. 5 - 10 min trocknen, bevor es je nach Größe in 500 – 800 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen wurde.

Zur Konzentrations- ( $A_{260}$ ) und Qualitätsbestimmung ( $A_{260}/A_{280}$  bzw.  $A_{260}/A_{230}$ ) wurde die RNA mit dem Eppendorf BioPhotometer C43/EG (Eppendorf, Hamburg) UV-photometrisch vermessen. Das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis spiegelt die Proteinverunreinigung wieder; ideal wären Werte zwischen 1,6 bis 2,0. Dagegen das  $A_{260}/A_{230}$  Verhältnis gibt die Phenolverunreinigung an, hier liegt der Norm-Bereich zwischen 2,0 und 2,2.

### Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription synthetisiert eine reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) cDNA (complementary DNA) als DNA-Kopien eines RNA-Moleküls.

Ausgegangen wurde von 2 µg RNA, das mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf ein Gesamtvolumen von 9 µl verdünnt wurde und mit 1 µl oligo dT-Primern (0,5 µg/µl, Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Das Primer-Annealing erfolgte für 5 min bei 65°C, währenddessen der Mastermix hergestellt wurde, bestehend aus:

Bestandteil	Menge [µl]	Herkunft
dNTP (2,5mM)	4,0	Fermentas
5x first strand Puffer	4,0	invitrogen
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,5	
RNAsin	0,5	Promega
RT (M-MLV)	1,0	invitrogen

**Tab. 7: Mastermix für Reverse Transkription**

Pro Probe wurden 12 µl des Mastermixes verwendet, gut gemischt, kurz anzentrifugiert und schließlich im Thermo-Cycler zunächst 1 h bei 37°C und abschließend 2 min bei 95°C inkubiert zur Inaktivierung des Enzyms. Die erhaltene cDNA dient als Template für die anschließende quantitative PCR und wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Quantitative RT-PCR

Die real time PCR beruht auf dem Vervielfältigungsprinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch eine zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR Produkte zu. Der DNA-Farbstoff SYBR Green (Absorptionswellenlänge: 498 nm, Emissionswellenlänge: 522 nm) bindet an die doppelsträngige DNA, wobei gebundenes SYBR Green wesentlich (ca. 1000-fach) stärker fluoresziert als freies. In der Elongationsphase erfolgt die Messung, um aus dem Verlauf der Emission über die Zyklenzahl auf die vorliegende Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA schließen zu können. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die DNA-Menge an spezifischem Produkt idealerweise mit jedem Zyklus. Später flacht die Kurve ab und geht in die Sättigung über (Verbrauch der Nukleotide). Die Zyklenzahl, die benötigt wird, bis ein Fluoreszenzsignal messbar ist, das über dem Hintergrund liegt, wird mit  $c_t$  (oder  $c_p$ ) bezeichnet. Man kann nicht voraussetzen, dass die eingesetzte RNA-Menge mit der erhaltenen cDNA-Menge absolut korreliert, weshalb auf die stabile Expression eines Referenzgens normalisiert wird. Eines der wenigen Gene, dessen Transkription durch die induzierte Fibrose unbeeinflusst blieb, war 18s-rRNA, weshalb es als Housekeeping-Gen verwendet wurde.

Für die Real Time PCR wurde das Roche Lightcycler<sup>®</sup> 480 System mit dem Roche Lightcycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master (2x) (Roche, Mannheim) verwendet. Der Reaktionsansatz in einer 96-Loch-Multi-Platte (zum Roche-System zugehörig) setzt sich zusammen aus 18 µl des SYBR Green-Mastermix (mit PCR-grade H<sub>2</sub>O auf 1x verdünnt), 2 µl cDNA und je 1 µl der forward- bzw. reverse-Primer in der Konzentration 5 µM (siehe 2.5)

Real Time PCR:

10 min	95°C	
15 sek	95°C	45 Zyklen
15 sek	58°C	
20 sek	72°C	

### Auswertung

Für die Auswertung wurde die  $\Delta\Delta C_T$ - Methode verwendet.

Der  $C_T$ - Wert gibt die Zyklenzahl an, ab dem das von SYBR Green emittierte Signal einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Der  $\Delta C_T$ - Wert einer Probe wird aus der Differenz des  $C_T$ - Werts des Zielgens (Z) und des Housekeeping-Gens (H) errechnet.

$$\Delta C_T = C_T(Z) - C_T(H)$$

Der  $\Delta\Delta C_T$ - Wert ergibt sich aus der Differenz der  $C_T$ - Werte der Kontrolle (K) und der Probe nach Fibrose Induktion (P).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(P) - \Delta C_T(K)$$

Das Expressionsverhältnis  $r$  ergibt sich aus der negativen Potenz des  $\Delta\Delta C_T$ - Wertes zur Basis 2.

$$r = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$



## **2.11 Thrombozytenanalyse**

### **2.11.1 Luminoaggregometer: Messung der Thrombozytenaggregation und ATP- Sekretion**

#### Präparation muriner Thrombozyten

Für die Blutentnahme wurde 200 µl Alsever's Lösung (Sigma) in 3 ml Spritzen mit Einmal-/Heparin-/ TBC Kanülen (0,5 x 16 mm) vorgelegt. Die Mäuse wurden mit Diethylether so betäubt, dass gerade noch ein Herzschlag wahrnehmbar war. Nachdem das Fell aufgeschnitten und der Thorax freigelegt war, wurde das Herz - zwischen zweiter und dritter Rippe liegend - punktiert. Eine möglichst „flache“ Atmung und ein „ruhiger“ Herzschlag waren die Voraussetzungen für eine optimale Blutabnahme. Auch beim Herausziehen der Spritze sollte der Aspirationszug so klein wie möglich sein, um eine unerwünschte, vorzeitige Stimulierung und dadurch bedingte Koagulationsreaktionen zu vermeiden. Der Inhalt der Spritze wurde durch Invertieren gemischt und in ein 4 ml Polypropylenröhrchen (Greiner) mit jeweils 500 µl vorgelegtem Puffer B (pH 6,2, siehe Tab. 9) überführt. Je nach Gewicht der Mäuse konnte auf diesem Weg 1 bis max. 2 ml Blut gewonnen werden. Die Probenröhrchen wurden 15 min bei 70 g und RT zentrifugiert (acceleration 9, deceleration 0; Zentrifuge: Heraeus Kendro), um anschließend das PRP (Plättchenreiche Plasma) abnehmen zu können und dieses erneut bei 600 g (5 min, RT, acceleration 9, deceleration 1) zu zentrifugieren. Die erhaltenen Thrombozytenpellets wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in je 1 ml Puffer B (siehe Tab. 9, pH 7,4) resuspendiert. Um die Thrombozytenzahl auf die gewünschte Konzentration einstellen zu können, wurde die Ausgangszahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, währenddessen die Thrombozyten ruhten.

#### Messprinzip des Luminoaggregometers

Mit Hilfe des Zwei-Kanal-Aggregometers von Chrono-Log (Model 490) erfolgte optisch die Messung der Thrombozytenaggregation. Die simultane Bestimmung der ATP-Sekretion und Aggregation ermöglichte das Luminoaggregometer (Chronolog) bei 37°C (1000 rpm) nach Zugabe des Luciferin-Luciferase Reagenzes (Chronolog). Durch das Ankleben von Distanzstückchen (Chronolog) an die Glasküvetten (Chronolog) reichte ein geringeres Probenvolumen von 250 µl anstelle von 500 µl aus. Es wurden jeweils zwei Proben parallel vermessen, im Kanal 1 die Kontrolle ohne Inhibitor, im Kanal 2 die Probe mit dem jeweiligen Inhibitor (siehe Tab. 8). Die Thrombozyten wurden vor der Messung 5 min bei 37°C äquilibriert, um sie anschließend mit dem jeweiligen Hemmstoff bzw.

dem gleichen Volumen an entsprechendem Lösungsmittel zu inkubieren. Für die Messung wurde die Küvette zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle platziert, die den Verlauf der Aggregation detektierten. Dieses Prinzip beruht darauf, dass die optische Dichte von der Partikelzahl und nicht von der Größe der Zellen abhängt. Zur Nachahmung der physiologischen Scherbedingungen wurde die Thrombozytensuspension während der Messung mit einem Rührstäbchen (1000 rpm) in Bewegung gehalten. Nachdem die Absorption auf 0 % abgeglichen war, konnte die Aggregation durch Zugabe eines Agonisten gestartet werden (siehe Tab. 8). Die durch die vielen fein verteilten Thrombozyten trübe Suspension besaß nur eine geringe Lichttransmission. Die Zugabe eines Agonisten aktivierte die Thrombozyten, wodurch ihre zuvor flache Gestalt eine Kugelform annahm („shape change“), was an der Abnahme der Lichtdurchlässigkeit zu Beginn der Messung erkennbar war. Anschließend lagerten sich die Thrombozyten zu immer größer werdenden Aggregaten zusammen, dadurch wurde die Lösung klarer, was sich in der Zunahme der Lichtdurchlässigkeit (Skalierung der y-Achse: 0-100 %) widerspiegelte. Die Veränderung des „Trübheitsgrades“ wurde photometrisch ermittelt und mit der entsprechenden Software kontinuierlich in Kurvenform dargestellt. Demzufolge war die Zunahme der Lichttransmission ein Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten.

Zur Quantifizierung der sezernierten ATP-Menge wurde die Lumineszenzmethode verwendet. Sie beruht darauf, dass das Glühwürmchenenzym Luciferase (neben Sauerstoff und Magnesiumionen) ATP benötigt, um Luciferin umzusetzen. Das dabei emittierte gelb-grüne Licht mit einem Emissionsmaximum von 562 nm wird vom Luminoaggregometer (Chronolog) detektiert. Da jedoch die Thrombozyten weder Luciferin noch Luciferase exprimieren, wurden diese mit einem Luciferin-Luciferase enthaltendem Reagenz vorinkubiert. Zusätzlich musste vor jeder Messung die Eigenabsorption der jeweiligen Thrombozytenlösung berücksichtigt werden, indem eine definierte ATP-Menge zugegeben wurde. Auch noch nach Vermessen des Standards konnte die Sensitivität durch das „Gain“ (Spannung) erhöht bzw. erniedrigt werden, was jedoch in der Berechnung der absoluten ATP-Menge berücksichtigt werden musste. Ein Vorteil des Luminoaggregometers bestand darin, dass simultan zur Sekretion die Aggregation aufgezeichnet werden konnte. Folglich erhielt man gleichzeitig auch eine Aussage über die zeitliche Kinetik bezüglich Aggregation und ATP-Sekretion.

In Tab. 8 sind die verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten der Agonisten und Inhibitoren aufgeführt.

### Auswertung und Statistik

Die Aufzeichnung der Aggregation erfolgte mit der Software Aggrolink (Aggro/Link control software für windows Version 5.2.2). Als zuverlässiger Parameter für die Aggregation wurde die maximale Steigung (slope) der Kurve verwendet. Sie spiegelte die Aggregationsgeschwindigkeit wider und diente als Maß für die Berechnung der maximalen Aggregationsrate. Alle Messwerte wurden im Verhältnis zur Kontrolle (ohne jeweiligen Hemmstoff), die als 100 % festgelegt wurde, berechnet und jeweils als Mittelwert ( $\pm$  SEM) dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mit dem Student t-Test ermittelt, wobei signifikant ( $p < 0,05$ ) durch „\*“, hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) durch „\*\*“ und höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) durch „\*\*\*“ angegeben wurde. „n“ steht für die Anzahl der Experimente.

<b>Agonist</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inhibitor (Lösemittel)</b>	<b>Konzentration/ Inkubationszeit</b>
<i>Thrombin (PBS) [Probe&amp;go]</i>	0,024 - 0,1 U/ml	<i>8-pCPT-cGMP (H<sub>2</sub>O)</i>	50-200 $\mu$ M, 10 min
<i>U46619 (100 % Ethanol) [Axxora]</i>	10 $\mu$ M	<i>SNP (H<sub>2</sub>O)</i>	2,5 $\mu$ M, 2 min
<i>Collagen [Probe&amp;go]</i>	2 – 5 $\mu$ g/ml	<i>DEA-NO (10 mM NaOH)</i>	0,1 $\mu$ M, 1 min

Tab. 8: Konzentration/Inkubationszeit der verwendeten Agonisten und Inhibitoren.

#### **2.11.2 FACS: Detektion der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung, Fibrinogenbindung und P-Selektin-Sekretion**

Mittels Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence activated cell sorting) wurden die Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors, die dadurch ermöglichte Fibrinogenbindung und die P-Selektin-Sekretion untersucht. Das FACS ermöglicht die Klassifizierung und Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Für die Messung wurde die stark verdünnte Thrombozytensuspension unter Druckluft in einem dünnen Strahl angesaugt, von einer Trägerflüssigkeit erfasst und die Zellen typisiert. Dabei sollte die Durchflussrate möglichst so eingestellt sein, dass die Zellen den Kreuzpunkt einzeln passieren. Ein Argonlaserstrahl (488 nm) regt die Zellen an, was zur Entstehung eines Streulichts führt. Dadurch kann die Beschaffenheit einer Zelle detektiert werden. Man unterscheidet zwischen FSC (Vorwärts-) und SSC (Seitwärtsstreulicht). Das FSC ist in erster Linie ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt von der Zellgröße (Volumen) ab. Es wird in Vorwärtsrichtung (Forward Scatter, Ablenkungswinkel  $< 2^\circ$ ) entlang des einfallenden Lichtstrahls gestreut.

Zudem wird noch das SSC, das in Seitwärtsrichtung (Sidewards Scatter) mit einem Ablenkungswinkel von 90° (rechter Winkel) streut, gemessen. Es ist ein Maß für die Brechung des Lichts und spiegelt die Zellgranularität wider. Mithilfe dieser beiden Komponenten erfolgt die Selektion in spezifische Zellpopulationen („Gating“). Zusätzlich zur Lichtstreuung kann beim FACS die Fluoreszenz von markierten Antikörpern gemessen werden. Besitzt eine Zelle eine Fluoreszenzmarkierung wird Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenbereich absorbiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Ein System von optischen Spiegeln und Filtern leitet das seitwärts emittierte Fluoreszenzlicht einer spezifischen Wellenlänge zu den entsprechenden Detektoren (FL). Zum Messen von Mehrfachfluoreszenzen müssen die Emissionsspektren der Fluorochrome verschieden sein, wobei kleinere Überlagerungen durch Kompensation ausgeglichen werden können.

Für die nachfolgenden Messungen wurden die Fluorochrome FITC mit einem Emissionsmaximum von 530 nm (FL1-Kanal) und PE mit einem Emissionsmaximum von 585 nm (FL2-Kanal) verwendet. Zur Aufzeichnung der verschiedenen Parameter jeder Zelle werden die Daten über Signalverstärker in elektronische Signale umgewandelt und einem angeschlossenen Computer zugesendet. Zum Auswerten wurde das Programm Winmdi 2.8 verwendet.

#### **2.11.2.1 Detektion der Fibrinogenbindung mittels Durchflußzytometrie**

Thrombozyten wurden aus WT- und IRAG-KO-Mäusen isoliert (nach Anleitung siehe 2.11.1) mit Puffer B (siehe Tab. 9, pH 7,4) resuspendiert und auf die Konzentration  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. Nach Vorinkubation mit 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M, 10 min) bei RT wurde Thrombin (0,1 U/ml) bzw. PBS zugegeben und mit Alexa 488 markiertem, humanen Fibrinogenkonjugat (12,5  $\mu$ g/ml) für 10 min im Dunklen inkubiert. Das Fluorescein markierte Fibrinogen bindet nur an aktivierte Thrombozyten aufgrund der dadurch bedingten Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptors. Für die FACS Messung wurden die Proben mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und die Fluoreszenz mit einem FACScalibur Durchflussscytometer (BD Bioscience) gemessen (Anregungswellenlänge: 488 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm).

### **2.11.2.2 Detektion der Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors und der P-Selektin-Sekretion mittels FACS**

#### Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors

Thrombozyten von WT- und IRAG-KO-Mäusen mit der Konzentration  $5 \times 10^7$ /ml in 25  $\mu$ l Puffer B (siehe Tab. 9, pH 7,4 zusätzlich 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) wurden mit DEA-NO (100 nM) bzw. Vehikel (10 mM NaOH) für 1 min bzw. mit 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M) für 10 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden sie mit Thrombin (0,1 U/ml) bzw. PBS und gleichzeitig mit dem PE labelled JON/A Antikörper (Emfret, Würzburg) für 15 min bei RT behandelt. Der JON/A Antikörper kann nur an den GPIIb/IIIa Rezeptor binden, wenn dieser (durch die Aktivierung) seine Konformation geändert hat. Die 25  $\mu$ l Proben wurden mit PBS auf 200  $\mu$ l aufgefüllt, mit 1 % PFA fixiert und die Fluoreszenz des gebundenen JON/A Antikörpers am FACS vermessen.

#### P-Selektin-Sekretion

Ein FITC markierter Wug.E9 Antikörper (Emfret, Würzburg) reagiert selektiv mit dem murinen P-Selektin Rezeptor, der nach Aktivierung der Thrombozyten auf der Membranoberfläche exprimiert wird. Die Detektion der P-Selektin-Sekretion wurde mit dem FITC rat anti mouse CD62P Antikörper (Wug.E9 - FITC) simultan mit der Detektion der GPIIb/IIIa Aktivierung mittels JON/A Antikörper (JON/A - PE) durchgeführt. Dadurch konnten in einer Probe parallel beide Vorgänge untersucht werden.

### **2.11.2.3 Auswertung und Kompensation**

Die Autofluoreszenz wurde ohne Stimulierung und ohne FITC/PE bestimmt, sie entspricht dem Fluoreszenzlicht, das die Zellen mittels zytoplasmatischer Fluorochrome emittieren. Hingegen die unspezifischen Bindungen der Fluoreszenz-AK wurden ohne Aktivierung durch Thrombin, sondern allein durch die Zugabe von JON/A-PE bzw. Wug.E9-FITC registriert. Die FITC-Emission ist auch bei der Wellenlänge hoch, bei der das PE Signal gemessen wird. Um ein durch das breite Emissionsspektrum von FITC bedingtes „Überstrahlen“ in den Fluoreszenzbereich von PE zu vermeiden, wurde eine Kompensation mit anti JON/A-PE und anti Wug.E9-FITC durchgeführt. Dabei wurde eine unstimulierte Thrombozytenlösung zur Bestimmung der Autofluoreszenz verwendet und mit einer mit Thrombin stimulierten und FITC markierten verglichen. Im PE-Kanal (FL2-Kanal) sollte dann die Fluoreszenzintensität der Autofluoreszenz entsprechen. Liegt die Fluoreszenzintensität höher, wird auch Fluoreszenz des FITC markierten Antikörpers detektiert. Das vom FITC-AK überstrahlende Signal muss vom PE Kanal abgezogen

werden, indem die Spannung und dadurch die Sensitivität des PE Kanals verändert wird (Kompensation):

Der Emissionsanteil von FITC (x% FL1), der im PE-Kanal (FL2) detektiert wird, wird subtrahiert:  $FL2 = FL2 - x\% FL1$

In der Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsdarstellung (FSC-SSC Dot plot) wurde ein Schwellenwert (von FSC) gesetzt, welche alle Impulse darunter ausschließt, damit Verunreinigungen, unstimulierte oder tote Zellen nicht erfasst werden.

Man spricht von einem „Dot plot“, wenn die Werte der x- bzw. y-Achse als Schnittstellen punktförmig aufgetragen sind. Für die Auswertung wurden die Messwerte für Vorwärts- und Seitwärtsstreuung, durch das Setzen von „Gates“ in Population eingegrenzt. Das „Gaten“ ermöglicht die selektive Auswahl der Thrombozyten, die von Interesse sind, nämlich aktivierte und dadurch Fluoreszenz markierte. Durch das „Gaten“ im FSC-SSC Dot plot werden im Fluoreszenz Dot plot nur noch die Zellen aus der gewählten Region angezeigt. In Zweiparameterdiagrammen, in denen die Fluoreszenz von FL1 gegen FL2 aufgetragen ist, kann die Gesamtfluoreszenz von FITC und PE positiven Thrombozyten bestimmt werden. Um den jeweiligen Anteil messen zu können, wurde die Einparameterdarstellung - auch Histogramm genannt - gewählt. Alle Ereignisse (Messwerte) wurden nach der Stärke ihres Signals registriert und in einer Verteilungskurve dargestellt. Der Mittelwert der Kurvenverläufe erlaubt anschließend eine quantitative Aussage über die Antikörperbindung und damit über die Expression der thrombozytären Membranglycoproteine. Es wurden mind. 10000 Ereignisse im gesetzten Gate gespeichert.

### **2.11.3 Adhäsions-Assay**

Die Adhäsion wurde kolorimetrisch nach Dangel und Bellavite et al. bestimmt (28). Für die Untersuchung der Fibrinogen bedingten Adhäsion wurden 96 Loch microtiter Platten über Nacht bei 4°C mit Fibrinogen (Sigma-Aldrich, Steinheim) (50 mg/ml, je 100 µl pro Loch) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde einmal mit PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 3 % BSA (1 h, 37°C) blockiert. Währenddessen wurde das Thrombozytenpellet mit Puffer B (pH 7,4, siehe Tab. 9), der zusätzlich  $CaCl_2$  und  $MgCl_2$  enthielt (finale Konz. jeweils 1 mM) resuspendiert und auf die optimale Konzentration von  $4 \times 10^6$  Thrombozyten pro ml eingestellt. Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die Loch microtiter Platten mit der Thrombozytensuspension (pro Loch 50 µl) befüllt. Durch Thrombin Zugabe (0,1 U/ml) und einer idealen

Inkubationszeit von 20 min konnte die Adhäsion initiiert werden. Für deren Hemmung wurde mit 8-pCPT-cGMP (200 µM) 10 min vorinkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Thrombozyten durch einmaliges, vorsichtiges Waschen mit 0,9 % NaCl entfernt. Hingegen die adhärenen Thrombozyten wurden anhand der Bestimmung der sauren Phosphatase-Aktivität quantifiziert. Hierfür mussten die adhärenen Thrombozyten durch 0,1 % Triton-X100 solubilisiert werden, um dem Enzym Zugang zu dessen Substrat p-Nitrophenylphosphat zu gewähren. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Umsetzung des hinzugefügten Substrats (5 mM in 0,1 M Citratpuffer, je 150 µl pro Loch) zu p-Nitrophenol durch Zugabe von 100 µl NaOH abgestoppt. Am Microplattenleser bei einer Wellenlänge von 405 nm erfolgte die Quantifizierung des erhaltenen Produkts. Anschließend ließ sich die prozentuale Zunahme der Adhäsion aus dem Verhältnis der Absorption unstimulierter versus stimulierte Thrombozyten berechnen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>Puffer B</i>	138 mM NaCl 2,9 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,2 bzw. pH 7,4

**Tab. 9: Zusammensetzung des verwendeten Puffers**

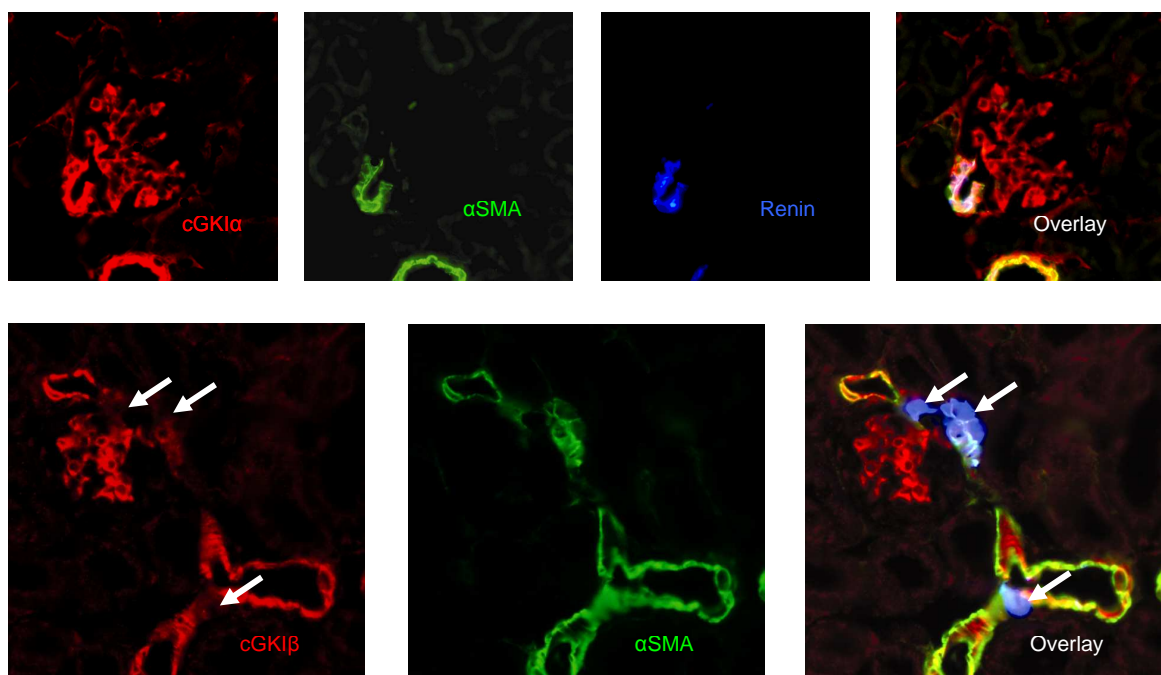
### 3. Ergebnisse Niere-Teil 1: Expression und physiologische Funktion der cGKI in der Niere

#### 3.1 Expression der cGMP-Kinase I im Glomerulus und angrenzendem JGA

Bevor die funktionelle Bedeutung der cGKI renal untersucht werden konnte, musste die exakte Lokalisation geklärt sein. Daher wurde die Expression der cGKI in der Niere analysiert (siehe Kap. 3.1 und 6.1). Im Folgenden wird zunächst die spezifische Lokalisation der cGKI $\alpha$  im JGA (juxtaglomerulärer Apparat) dargestellt und anschließend die Detektion beider Isoformen, nämlich der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ , in den Mesangialzellen.

##### 3.1.1 Immunhistochemischer Nachweis der cGKI im JGA

In den immunhistochemischen Aufnahmen war eine besonders starke Expression der cGKI $\alpha$  neben dem Glomerulus auch im angrenzenden JGA zu sehen. Die Cofärbung mit Renin diente der Identifizierung des JGAs, der zudem  $\alpha$ SMA enthält. Abb. 9 zeigt die Colokalisation von cGKI $\alpha$  mit den Renin produzierenden Zellen. Dagegen konnte keine Expression von cGKI $\beta$  in den juxtaglomerulären Zellen nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass cGKI $\beta$  mit  $\alpha$ SMA in den Gefäßen colokalisiert vorliegt, jedoch nicht in den JGA-Zellen, obwohl diese  $\alpha$ SMA exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden noch keine funktionellen Versuche bzgl. der Isoform spezifischen Rolle der cGKI $\alpha$  in den Renin produzierenden Zellen durchgeführt, so dass auch keine konkreten Aussagen über deren Funktion im JGA getroffen werden können.

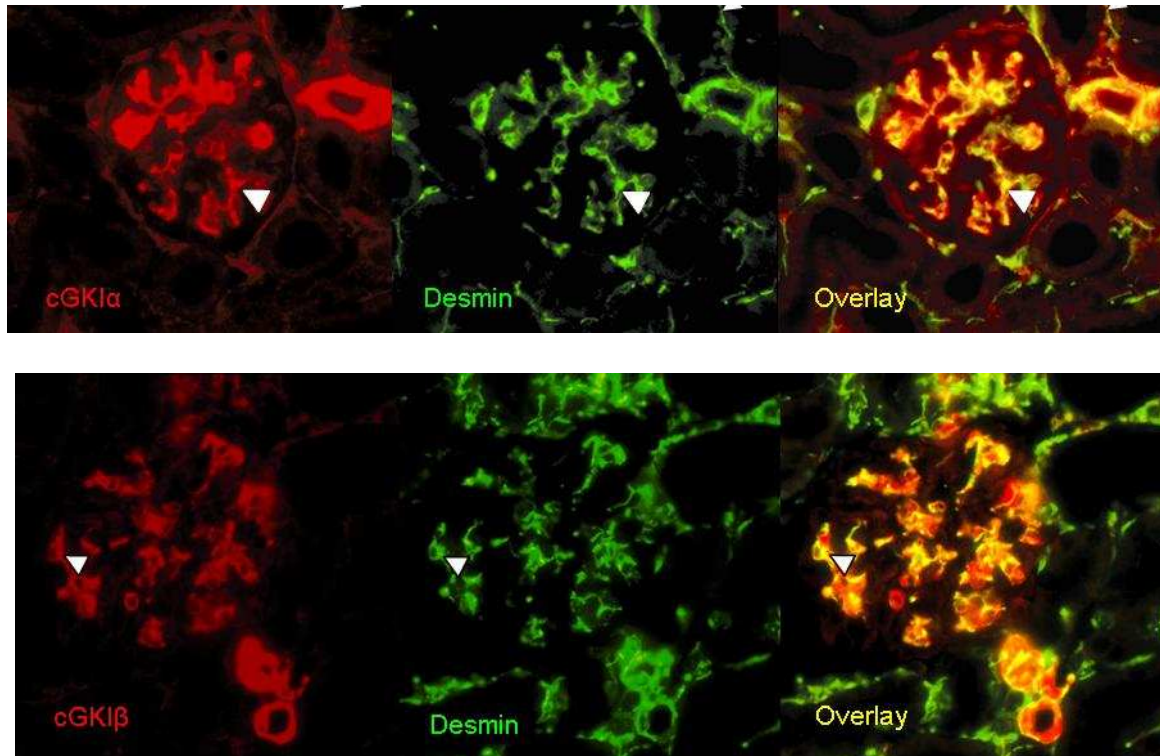


**Abb. 9: Analyse der Expression von cGKI im JGA:** Expression der cGKI $\alpha$  (rot), jedoch nicht der cGKI $\beta$  (rot) im JGA. Die Pfeile deuten auf die Renin produzierenden Zellen hin, in denen kein cGKI $\beta$  zu sehen ist. Renin (blau) als Marker für den JGA,  $\alpha$ SMA (grün) als Marker für Glatt-Muskel-Zellen.



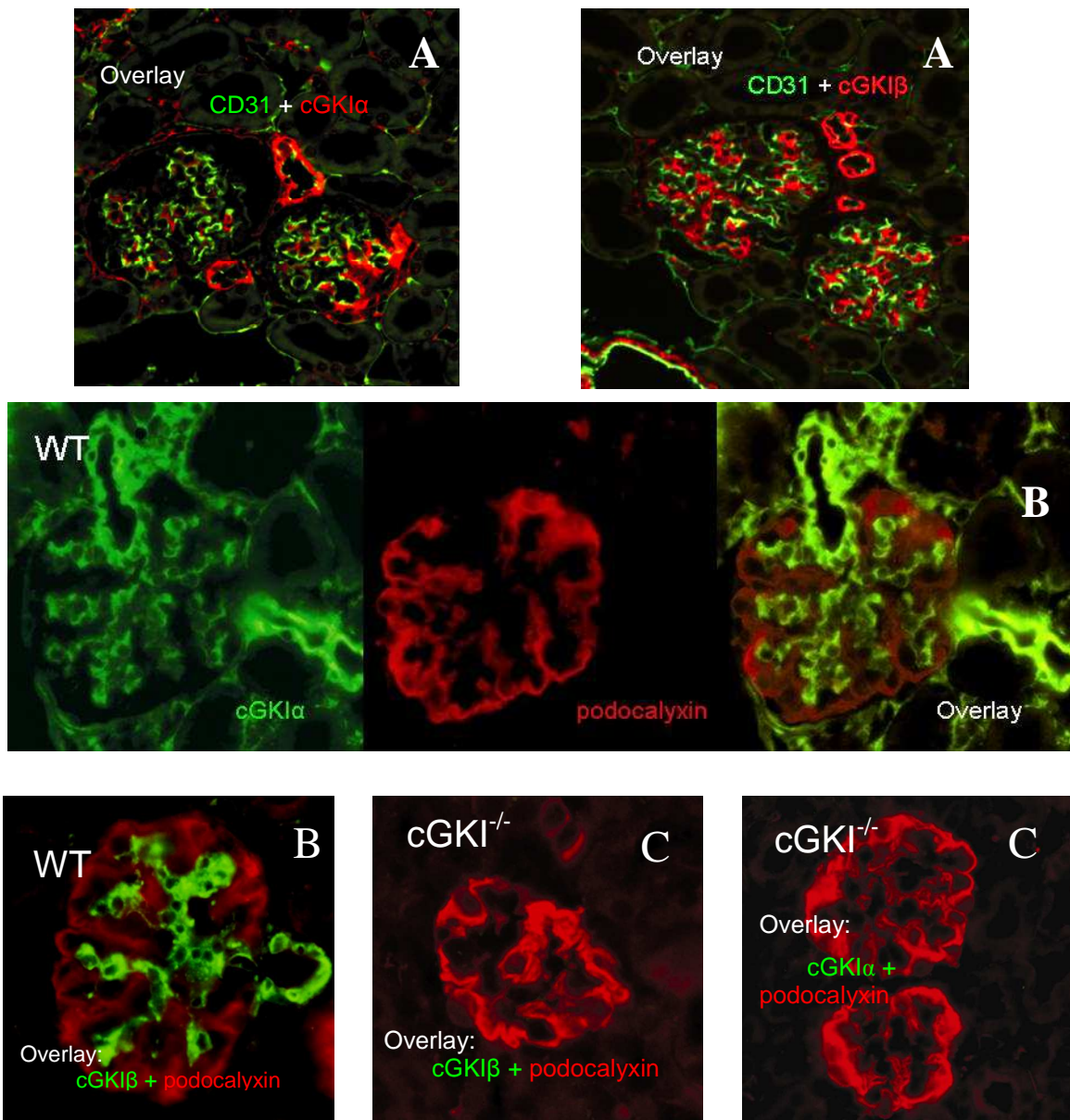
### 3.1.2 Immunhistochemischer und immunocytochemischer Nachweis der cGKI in Mesangialzellen

Anhand der immunhistochemischen Bilder sieht man, dass cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  sehr stark in den Glomeruli vorzufinden waren, colokalisierend mit Desmin (Abb. 10), dessen Existenz in Mesangialzellen bekannt ist (161) und somit als Marker verwendet werden konnte.



**Abb. 10: Expression der cGKI im Mesangium:** Colokalisation von cGKI $\alpha$  (rot) und cGKI $\beta$  (rot) mit Desmin (grün) im Mesangium (Pfeilspitze: intraglomeruläres Mesangium).

Neben der Colokalisation von cGKI $\alpha$  bzw. cGKI $\beta$  mit Desmin wurde eine zusätzliche Expression in anderen Strukturen des Glomerulus überprüft. So umfasst der Glomerulus nicht nur die Mesangialzellen, sondern auch die Kapillarschlingen mit dem angrenzenden Kapillarendothel sowie die Podocyten. Der Endothelmarker CD31 diente zur Identifizierung des Endothels, in dem jedoch weder cGKI $\alpha$  noch cGKI $\beta$  zu finden war (Abb. 11). Auch der Podocytenmarker Podocalyxin colokalisierte nicht mit den beiden cGKI-Isoformen (Abb. 11). Für die Spezifität des verwendeten cGKI $\alpha$ - bzw. cGKI $\beta$ -Antikörpers sprach die fehlende Färbung im cGKI-KO, zu sehen ist jeweils nur Podocalyxin (rot), jedoch keine Grün-Färbung durch cGKI $\alpha$  bzw. cGKI $\beta$  (Abb. 11).



**Abb. 11: Glomeruläre Strukturen ohne cGKI Expression**

Keine Colokalisation von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ :

A: mit dem Endothelmarker: CD31 (grün),

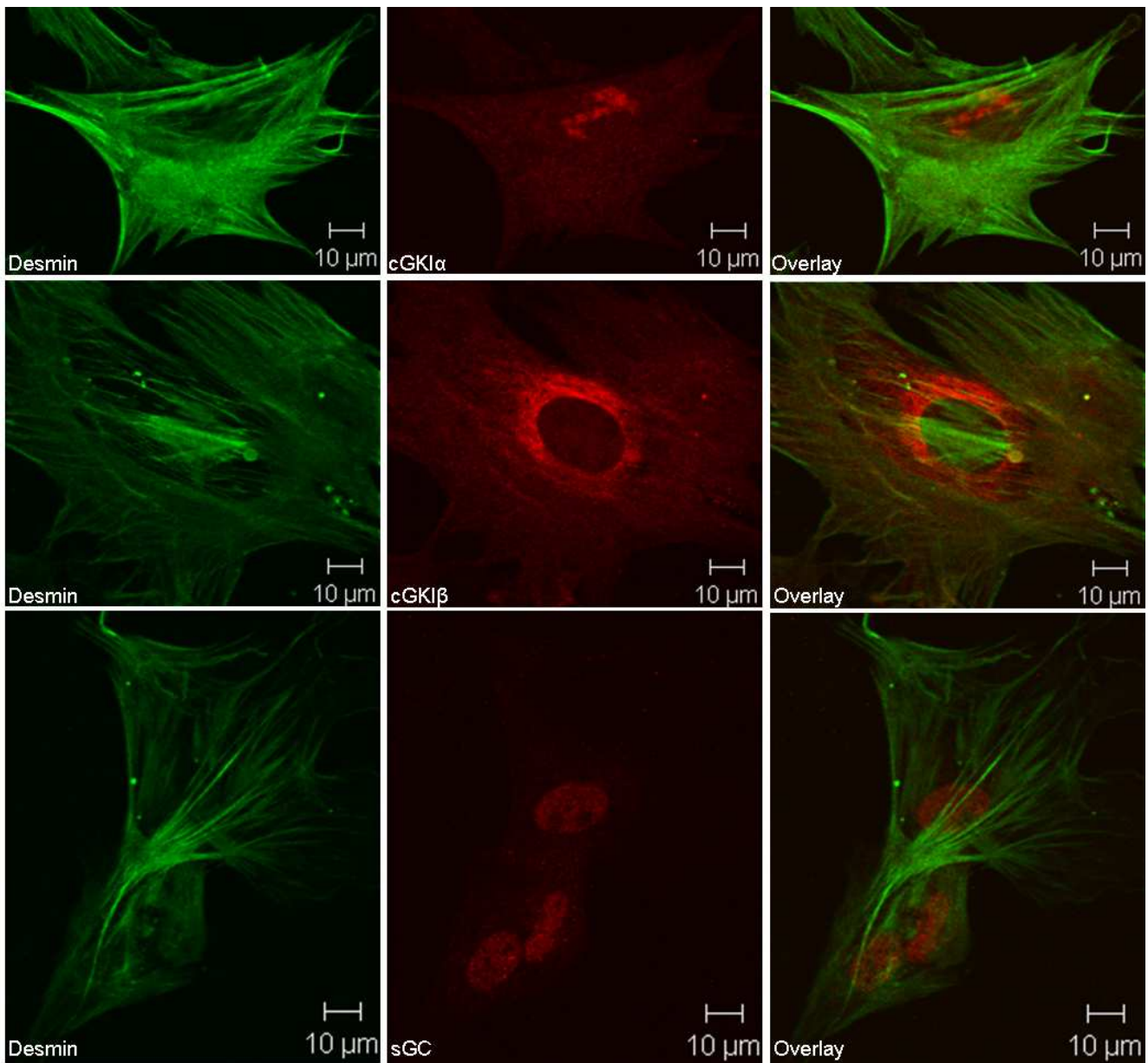
B: mit dem Podocytenmarker: Podocalyxin (rot);

Überprüfung der Spezifität der Antikörper anhand der cGKI $^{-/-}$  Niere:

C: cGKI $\alpha$  (grün) bzw. cGKI $\beta$  (grün), jeweils cogefärbt mit Podocalyxin (rot)

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Schnitten wurde auch deren Expression in kultivierten Mesangialzellen untersucht. Zum Nachweis der Reinheit der Mesangialzellkultur sollten die Zellen positiv für Desmin und negativ für  $\alpha$ SMA sein, um die Anwesenheit von Myofibroblasten ausschließen zu können. Für die anschließenden Versuche wurden Zellen der Passage 1 und 2 verwendet. Sie enthielten trotzdem noch ca. 15-20 %  $\alpha$ SMA exprimierende Zellen, was jedoch als Kompromiss akzeptiert werden musste; denn der Nachteil höherer Passagen war die unerwünschte Abnahme der cGKI-Expression (immuncytochemisch überprüft, Daten nicht gezeigt). Die immunhistochemischen Ergebnisse konnten immuncytochemisch in den kultivierten Mesangialzellen bestätigt werden. Zudem sieht man, dass innerhalb der Zelle sowohl

Desmin als auch die beiden Isoformen unterschiedlich angeordnet sind (siehe Abb. 12). Neben cGKI wurde auch die Existenz der sGC in den Mesangialzellen nachgewiesen (Abb. 12).



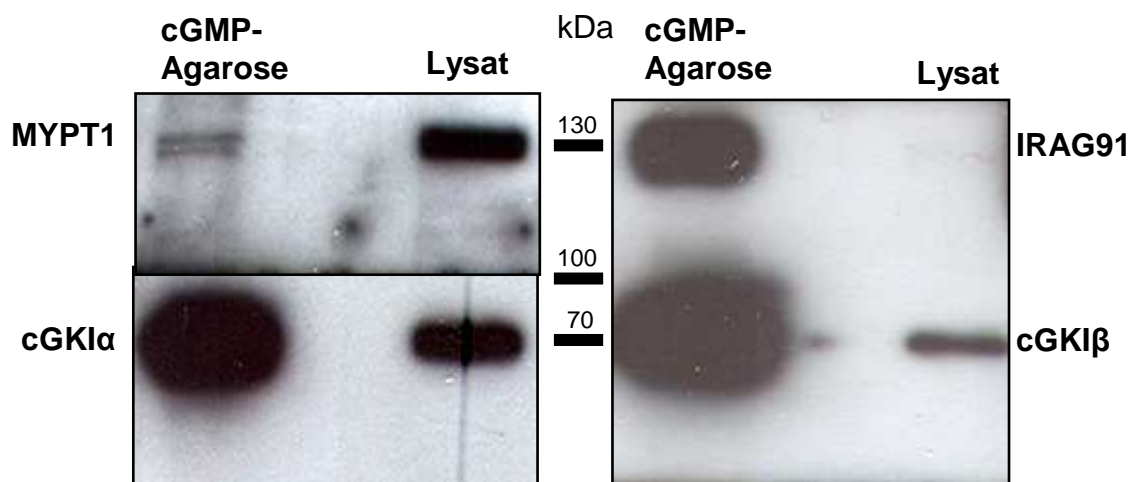
**Abb. 12: Verteilungsmuster von Desmin, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und sGC innerhalb der Mesangialzellen.** Gefärbt wurden kultivierte MC aus isolierten Glomeruli, (Passage 1); in grün gezeigt Desmin, in rot von oben nach unten cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und sGC, rechts jeweils das Overlay der Zweifach-Färbung.

Im nächsten Kapitel wird die Expression möglicher cGKI Substrate in den Glomeruli bzw. Mesangialzellen überprüft.

### 3.1.3 Substratproteine der cGKI in Mesangialzellen

Mittels Western-Blot wurde vorerst die Existenz von Substratproteinen im Proteinlysat isolierter Glomeruli untersucht, um anschließend deren Bindung an die cGKI über eine cGMP-abhängige Agarose-Fällung nachzuweisen. Wie man in Abb. 13 sieht, konnte die regulatorischen Untereinheit MYPT1 (myosin targeting subunit 1) der Myosinphosphatase mitgefällt werden, die durch cGKI $\alpha$  aktiviert, die Relaxation glatter Muskelzellen ermöglicht (141). Auffallend ist die - im Gegensatz zu cGKI $\alpha$  - nur sehr schwache Anreicherung von MYPT1 in der Fällung.

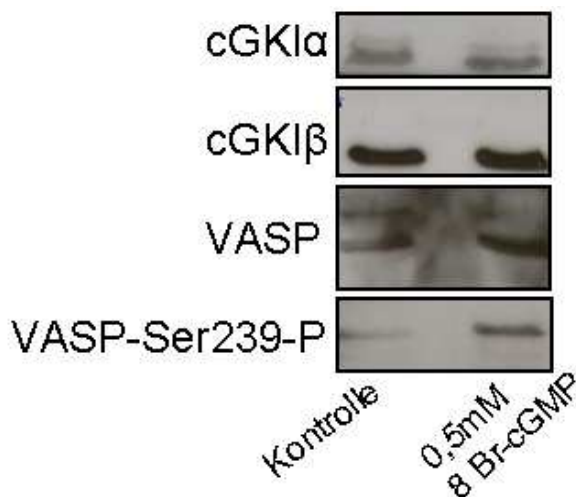
Als ein spezifisches Substratprotein der  $\beta$ -Isoform wurde IRAG nachgewiesen. Am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) verankert, wird durch dessen Aktivierung eine Relaxation induziert, indem es den IP<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelten Calciumausstrom aus dem SR hemmt (42, 119). Im Gegensatz zu MYPT1 wurde IRAG komplexiert an cGKI $\beta$  sehr stark angereichert (siehe Abb. 13). Zudem konnte IP<sub>3</sub>RI (IP<sub>3</sub>-Rezeptor Typ I, Banden nicht gezeigt) als Bestandteil des trimeren Komplexes (siehe Abb. 3) neben IRAG und cGKI $\beta$  detektiert werden.



**Abb. 13: Analyse möglicher Substratproteine der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  im Lysat isolierter Glomeruli.** MYPT1 bzw. IRAG als Komplex gebunden an die cGMP-Agarose (jeweils 1. Spur) im Vergleich mit Proteinlysat (4,5  $\mu$ g, jeweils 2. Spur).

Der Immuno-Blot in Abb. 14 diente primär zum Nachweis der Aktivität der cGKI in Mesangialzellen, worauf jedoch erst im nächsten Kapitel eingegangen werden soll. Er zeigt aber auch, dass VASP (Vasodilatatorisches Phosphoprotein) nach Stimulierung mit cGMP an der PKG-Phosphorylierungsstelle Ser239 phosphoryliert wird. Dadurch konnte

ein weiteres wichtiges cGKI Substrat in den Mesangialzellen identifiziert werden.



**Abb. 14: Immuno-Blot muriner Mesangialzellen** (Passage 1) 1. Spur: Kontrolle 2. Spur: 30 min Stimulierung mit 0,5 mM 8-Br-cGMP. Detektion von VASP-Ser239, Gesamt VASP und cGKI.

Während VASP unter anderem für Proliferationsvorgänge benötigt wird, deutet die Existenz von MYPT1 und IRAG auf Kontraktions- bzw. Relaxationsprozesse in Mesangialzellen hin.

Nach Darlegung der Expression der cGKI und möglicher Substrate in den Mesangialzellen, soll das nächste Kapitel Hinweise auf die Funktion der cGKI in Mesangialzellen liefern.

### **3.2 Physiologische Funktion der cGKI im Mesangium**

Wie bereits erwähnt, können intraglomeruläre Mesangialzellen aufgrund ihrer Kontraktionsfähigkeit den Oberflächenbereich der Filtrationsbarriere und dadurch auch die glomeruläre Filtrationsrate regulieren. cGKI wiederum ist über die Phosphorylierung verschiedener Substratproteine an vielen Kontraktions- bzw. Relaxationsvorgängen beteiligt, was sich möglicherweise auch in der GFR zeigen könnte. Hoch- und Niedrig-Salz-Diäten dagegen bieten eine Möglichkeit die GFR unter Involvement des extraglomerulären Mesangiums zu beeinflussen. Durch Extrembedingungen - wie sie Hoch- bzw. Niedrig-Salz-Diäten darstellen - wird eine Gegenregulation von der Macula densa provoziert, die sich in den ausgeschiedenen Ionenkonzentrationen, den Urinvolumina sowie der GFR als einer der aussagekräftigsten Nierenparameter widerspiegelt. Ziel dieser Arbeit war, anhand des Vergleichs verschiedener Nierenparameter zwischen cGKI $\alpha$ -Rescue- und WT-Mäusen Rückschlüsse auf die Funktion der cGKI treffen zu können.

Dazu wurden funktionelle Analysen mit Stoffwechselversuchen durchgeführt.

### 3.2.1 Urinabgabe und Trinkvolumina

Nach je 5 Tagen Gewöhnungsphase an den Stoffwechselkäfig (siehe Kap. 2.8) und an die jeweilige Diät wurde die nach 24 h aufgenommene Wassermenge und abgegebene Urinmenge bestimmt. Während Trink- und Urinvolumina alle 3-5 Tage gemessen wurden, ist die retrobulbäre Blutabnahme zur Bestimmung des Kreatinin-Gehalts im Serum tierschutzrechtlich nur 1x pro Woche erlaubt. Abb. 15 zeigt den signifikanten Unterschied der Trinkvolumina von cGKI $\alpha$ -Rescue- im Vergleich zu WT-Tieren unter Normal- bzw. Hoch-Salz-Bedingungen. Im Gegensatz dazu kann bei Niedrig-Salz-Diät beim Trinkverhalten kein Unterschied beobachtet werden. Bei den abgegebenen Urinmengen war die gleiche Tendenz wie bei den aufgenommenen Trinkvolumina erkennbar. So zeigten auch die Urinvolumina der cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen unter den verschiedenen Salz-Bedingungen leicht erhöhte Werte, jedoch nur auf Hoch-Salz-Diät statistisch signifikant (Abb. 15).

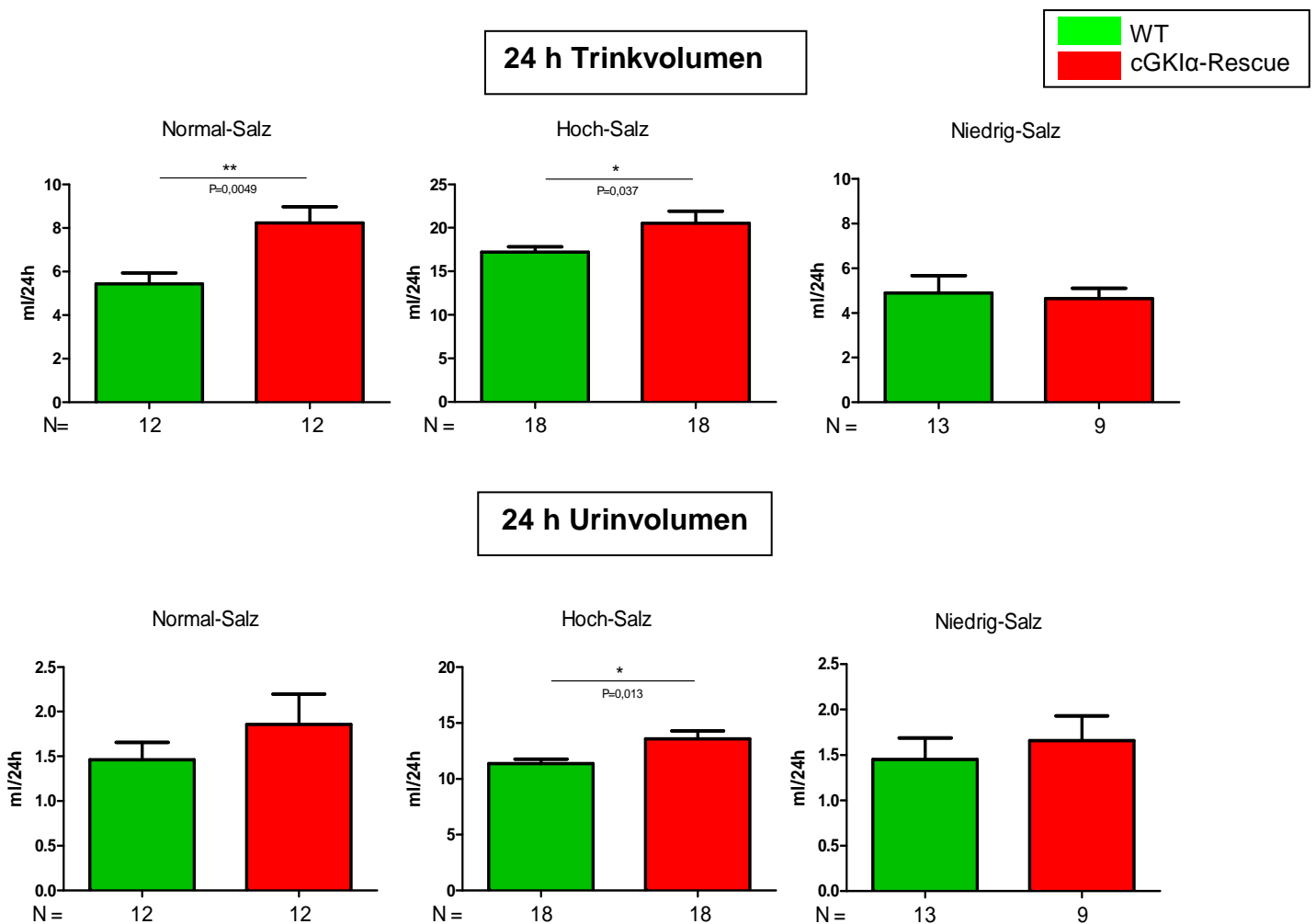


Abb. 15: 24 h Trink- und Urinvolumina bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät.

In Tab. 10 sind die durchschnittlich aufgenommenen Trinkvolumina und in Tab. 11 die durchschnittlich abgegebenen Urinmengen zusammengefasst. Wie man sieht, divergieren die Werte von aufgenommenem Wasser und abgegebenem Harn besonders bei kleinen Urinvolumina sehr stark, da hier vermutlich Fehlerquellen wesentlich stärker zum Tragen kommen. Unter Niedrig- und Normal-Salz-Bedingungen wurden jeweils nur ca. 30 % des getrunkenen Wassers messbar ausgeschieden, hingegen unter Hoch-Salz ca. 70 %.

	<b>WT</b> 24 h Trinkvolumen [ml]	<b>Erhöhtes (bzw. erniedrigtes) [%]</b> Trinkvolumen der cGKI $\alpha$ -Rescues	<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b> 24 h Trinkvolumen [ml]
<b>Normal-Salz</b>	<b>5,44</b> ( $\pm 0,49$ ) N=12	<b>+ 52,6%</b>	<b>8,23</b> ( $\pm 0,74$ ) N=12
<b>Hoch-Salz</b>	<b>17,22</b> ( $\pm 0,61$ ) N=18	<b>+ 19,2%</b>	<b>20,53</b> ( $\pm 1,39$ ) N=18
<b>Niedrig-Salz</b>	<b>4,90</b> ( $\pm 0,77$ ) N=13	<b>- 5,3%</b>	<b>4,64</b> ( $\pm 0,46$ ) N=9

Tab. 10: Vergleich der prozentualen Unterschiede zwischen Trinkvolumina von WT und cGKI $\alpha$ -Rescues.

	<b>WT</b> 24 h Urinvolumen [ml]	<b>Erhöhtes [%]</b> Urinvolumen der cGKI $\alpha$ -Rescues	<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b> 24 h Urinvolumen [ml]
<b>Normal-Salz</b>	<b>1,46</b> ( $\pm 0,20$ ) N=12	<b>+ 27,3%</b>	<b>1,86</b> ( $\pm 0,34$ ) N=12
<b>Hoch-Salz</b>	<b>11,35</b> ( $\pm 0,42$ ) N=18	<b>+ 19,6%</b>	<b>13,58</b> ( $\pm 0,74$ ) N=18
<b>Niedrig-Salz</b>	<b>1,45</b> ( $\pm 0,24$ ) N=13	<b>+ 13,8%</b>	<b>1,66</b> ( $\pm 0,28$ ) N=9

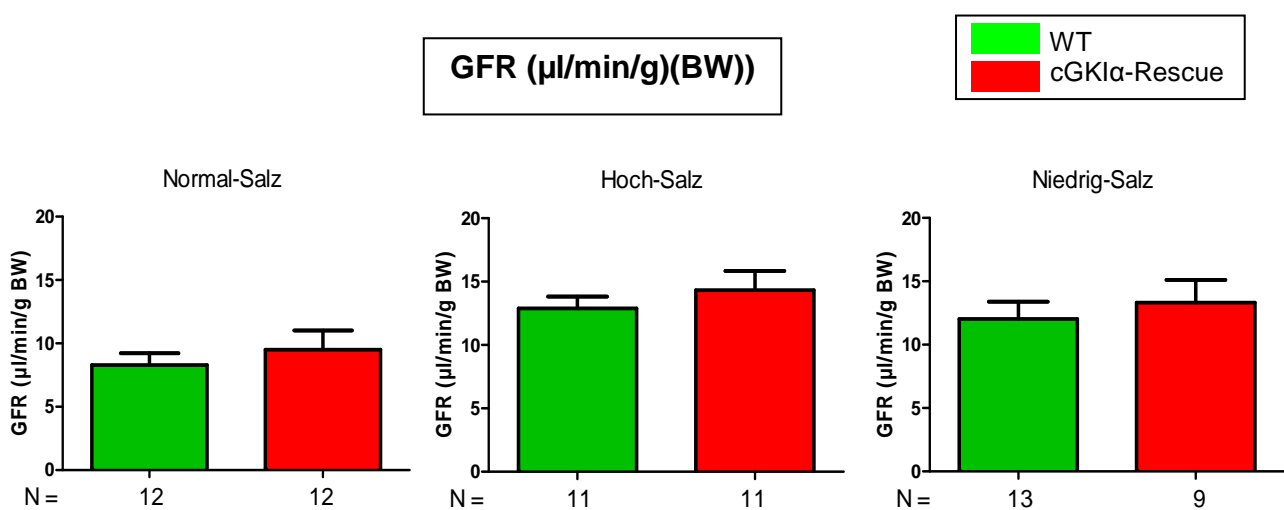
Tab. 11: Vergleich der prozentualen Unterschiede zwischen Urinvolumina von WT und cGKI $\alpha$ -Rescues.

Die von den WT abweichenden Urinvolumina der Rescues können auf vielen Ursachen beruhen. Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit der GFR (glomerulären Filtrationsrate) soll das anschließende Kapitel geben, indem die GFR im Vergleich WT versus Rescue unter verschiedenen Bedingungen bestimmt wurde.

### 3.2.2 Ermittlung der GFR

Die Kreatininclearance diente zur Bestimmung der GFR. Eine Einschränkung der Kreatininclearance als Marker für die GFR ist die Tatsache, dass Kreatinin - im Gegensatz zu Inulin – bei hohen Plasmakonzentrationen zusätzlich tubulär sezerniert werden kann (144), was zu einer Fehleinschätzung der GFR führen würde. Erhöhte Kreatinin-Plasmakonzentrationen treten jedoch nur bei eingeschränkter GFR auf, da Kreatinin selbst relativ konstant aus Phosphokreatinin im Muskelstoffwechsel gebildet wird. Dagegen entspricht die Inulin-clearance aufgrund ihrer tubulären Neutralität am exaktesten der tatsächlichen GFR. Allerdings muss Inulin, das im Gegensatz zu Kreatinin kein endogenes Abbauprodukt darstellt, erst unter Narkose intravenös infundiert werden, was wiederum eine Beeinträchtigung der physiologischen Verhältnisse bedeutet hätte. Daher wurde die Kreatininclearance als akzeptabler Mittelweg vorgezogen. Die Kreatininclearance wurde über die 24 h Urinsammlung ermittelt, während die Plasmawerte jeweils aus einer Blutabnahme stammten. Die retrobulbäre Blutabnahme erfolgte zwar bei allen Tieren zum gleichen Zeitpunkt, jedoch erschien sie nur begrenzt repräsentativ für den 24 h Plasmawert, da die Kreatininfreisetzung stark von der Bewegung der Mäuse abhängt, sich diese aber untertags in ihrer Ruhephase befanden (88).

Die Konzentrationen in Urin und Serum wurden mittels HPLC ermittelt, um die GFR berechnen zu können. Im Vergleich zu herkömmlichen Methoden, wie beispielsweise dem colorimetrisch basierten Jaffé-Test, liefert die Kreatinin-Bestimmung mittels HPLC wesentlich genauere Werte (32, 89).



**Abb. 16: Glomeruläre Filtrationsrate** in  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  (BW) bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät.



	<b>WT</b> GFR [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}(\text{BW})$ ]	<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b> GFR [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}(\text{BW})$ ]
<b>Normal-Salz</b>	8,30 ( $\pm$ 0,92, N=12)	9,50 ( $\pm$ 1,53, N=12)
<b>Hoch-Salz</b>	12,88 ( $\pm$ 0,93, N=11)	14,33 ( $\pm$ 1,49, N=11)
<b>Niedrig-Salz</b>	12,02 ( $\pm$ 1,39, N=13)	13,32 ( $\pm$ 1,81, N=9)

**Tab. 12:** GFR in [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}(\text{BW})$ ] von WT und cGKI $\alpha$ -Rescues bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät.

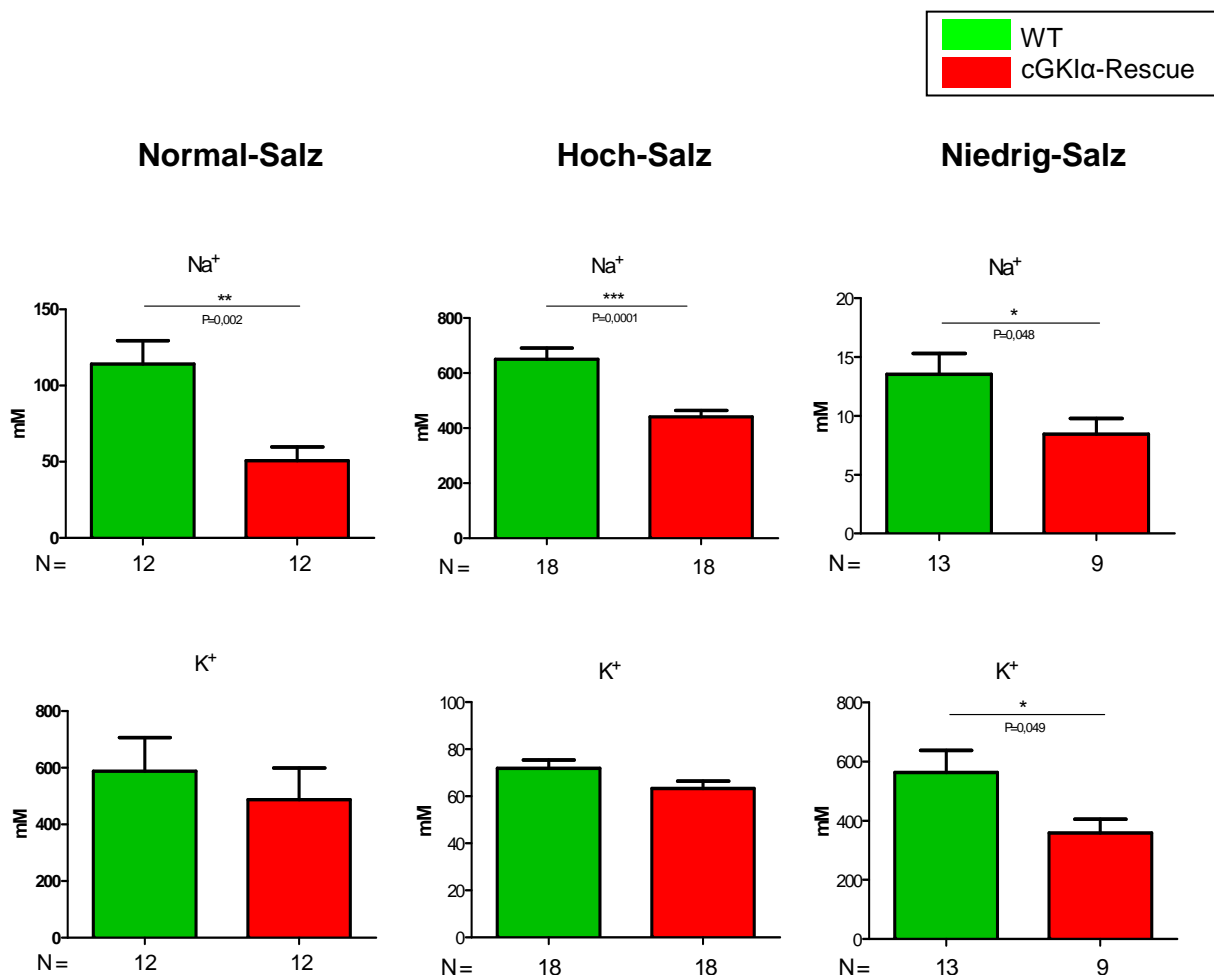
	<b>WT</b>		<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b>	
	c(Kreatinin) im Serum [mg/dl]	c(Kreatinin) im Urin [mg/dl]	c(Kreatinin) im Serum [mg/dl]	c(Kreatinin) im Urin [mg/dl]
<b>Normal-Salz</b>	0,069 ( $\pm$ 0,0036)	12,410 ( $\pm$ 1,168)	0,062 ( $\pm$ 0,0029)	9,593 ( $\pm$ 0,6110)
<b>Hoch-Salz</b>	0,051 ( $\pm$ 0,0028)	2,111 ( $\pm$ 0,3532)	0,053 ( $\pm$ 0,0045)	1,979 ( $\pm$ 0,3393)
<b>Niedrig-Salz</b>	0,063 ( $\pm$ 0,0014)	17,990 ( $\pm$ 1,4290)	0,052 ( $\pm$ 0,0031)	10,91 ( $\pm$ 0,8447)

**Tab. 13:** Kreatininkonzentrationen in mg/dl in Serum und Urin von WT und cGKI $\alpha$ -Rescues bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät.

Anhand der Graphen in Abb. 16 und den dazugehörigen Werten in Tab. 12 ist ersichtlich, dass kein signifikanter Unterschied besteht zwischen der GFR von WT- und Rescue-Mäusen. Während der Einfluss der Mesangialzellen auf die GFR immer noch Klärung bedarf, wird ein Effekt der Macula densa auf die GFR akzeptiert. Die Macula densa dient der Gegenregulation von Ionenverlusten bzw. Ionenüberschüssen. Nach Messung der Ionenkonzentrationen im distalen Tubulus erfolgt die Signalweiterleitung von der Macula densa über das extraglomeruläre Mesangium zum JGA. Nachdem in der GFR keine Unterschiede messbar waren, sollen im nächsten Kapitel die Ionenkonzentrationen im Urin untersucht werden, die unter anderem eine Aussage über eine intakte Signalübertragung der Macula densa zum JGA zulassen.

### 3.2.3 Ermittlung der Ionenkonzentrationen

Einer veränderten Ionenkonzentration im Urin können viele Ursachen zugrunde liegen. Vor allem die während der Tubulus Passage zahlreich ablaufenden Resorptions- und Sekretionsprozesse sowie Aufkonzentrierungsmechanismen tragen maßgeblich zur endgültig ausgeschiedenen Ionenkonzentration bei. Trotzdem sollte ein erster Ansatzpunkt sein, festzustellen, ob unter Normal-, aber auch unter Hoch- bzw. Niedrig-Salz-Diät unterschiedliche Ionenkonzentrationen von WT- und cGKI $\alpha$ -Rescue-Tieren ausgeschieden werden. Die Elektrolytkonzentrationen im Urin wurden am Flammenphotometer bestimmt. Wie Abb. 17 zeigt, tendieren diese bei den cGKI $\alpha$ -Rescue-Tieren grundsätzlich gegenüber den WT-Tieren zu niedrigeren Werten, besonders deutlich bei Natrium. Sowohl bei Normal- als auch unter Hoch- bzw. Niedrig-Salz-Diät wiesen die cGKI $\alpha$ -Rescues signifikant geringere Natriumkonzentrationen auf als die WT.



**Abb. 17: Analyse der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentrationen** im Urin bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät: Links Konzentrationen unter Normal-Salz-, mittig unter Hoch-Salz- und rechts unter Niedrig-Salz-Bedingungen, in grün gezeigt: WT, in rot: cGKI $\alpha$ -Rescue.

Tab. 14 zeigt, dass der Natrium-Unterschied unter Normal-Salz am deutlichsten ausgeprägt ist, genauer gesagt einer Verringerung von 55,4 % gegenüber den WT entspricht. Aber auch unter Hoch-Salz bzw. Niedrig-Salz weichen die cGKI $\alpha$ -Rescue-Werte um 32,2 % bzw. 37,8 % signifikant von den WT-Werten ab. Dagegen waren die Kaliumkonzentrationen zwar tendenziell auch niedriger bei den Rescue-Tieren, doch bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei Natrium. Nur unter Niedrig-Salz-Bedingungen war eine größere Differenz mit 36,3 % erkennbar und zudem signifikant, hingegen betrug die Abweichung bei Normal-Salz 17,1 % und bei Hoch-Salz 12,0 % (siehe Tab. 15).

	<b>WT</b> <i>Natrium [mM]</i>	<b>Erniedrigte [%] Na<sup>+</sup> - Konzentration der cGKI<math>\alpha</math>-Rescues</b>	<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b> <i>Natrium [mM]</i>
<b>Normal-Salz</b>	114,0 ( $\pm$ 15,5, N=12)	- 55,4%	50,8 ( $\pm$ 8,8, N=12)
<b>Hoch-Salz</b>	650,0 ( $\pm$ 41,3, N=18)	- 32,2%	441,0 ( $\pm$ 23,8, N=18)
<b>Niedrig-Salz</b>	13,5 ( $\pm$ 1,8, N=13)	- 37,8%	8,4 ( $\pm$ 1,3, N=9)

**Tab. 14: Na<sup>+</sup>-Konzentrationen [mM] im Urin bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät:**  
Links: WT, rechts: cGKI $\alpha$ -Rescue, mittlere Spalte: Prozentuale Erniedrigung der Na<sup>+</sup>-Konzentrationen bei den cGKI $\alpha$ -Rescues gegenüber den WT.

	<b>WT</b> <i>Kalium [mM]</i>	<b>Erniedrigte [%] K<sup>+</sup> - Konzentration der cGKI<math>\alpha</math>-Rescues</b>	<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b> <i>Kalium [mM]</i>
<b>Normal-Salz</b>	588,4 ( $\pm$ 118,8, N=12)	- 17,1%	487,9 ( $\pm$ 111,3, N=12)
<b>Hoch-Salz</b>	71,9 ( $\pm$ 3,6, N=18)	- 12,0%	63,3 ( $\pm$ 3,2, N=18)
<b>Niedrig-Salz</b>	563,5 ( $\pm$ 74,2, N=13)	- 36,3%	358,9 ( $\pm$ 46,7, N=9)

**Tab. 15: K<sup>+</sup>-Konzentrationen [mM] im Urin bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät:**  
Links: WT, rechts: cGKI $\alpha$ -Rescue, mittlere Spalte: Prozentuale Erniedrigung der K<sup>+</sup>-Konzentrationen bei den cGKI $\alpha$ -Rescues gegenüber den WT.

In Tab. 16 werden die prozentual erniedrigten Ionenkonzentrationen der cGKI $\alpha$ -Rescues deren prozentual erhöhten Urinvolumina gegenübergestellt.

	<b>Erniedrigte [%] Na<sup>+</sup>- Konzentration der cGK1<math>\alpha</math>-Rescues</b>	<b>Erhöhtes [%] Urinvolumen der cGK1<math>\alpha</math>-Rescues</b>	<b>Erniedrigte [%] K<sup>+</sup>- Konzentration der cGK1<math>\alpha</math>-Rescues</b>
<b>Normal-Salz</b>	- 55,4%	+ 27,3%	- 17,1%
<b>Hoch-Salz</b>	- 32,3%	+ 19,6%	- 12,0%
<b>Niedrig-Salz</b>	- 37,8%	+ 13,8%	- 36,3%

**Tab. 16: Vergleich der prozentualen Unterschiede von WT und cGK1 $\alpha$ -Rescues** bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät: Links: Na<sup>+</sup>-, rechts: K<sup>+</sup>- Konzentrationen, mittlere Spalte: Urinvolumina.

## **4. Diskussion Niere-Teil 1: Expression und physiologische Funktion der cGKI in der Niere**

### ***4.1 Funktion der cGKI im intra- und extraglomerulären Mesangium***

Die physiologischen Versuche in Stoffwechselläufigen dienten zur Bestimmung der renalen Grundparameter. Im Gegensatz zu den WT- tranken die cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäuse durchschnittlich mehr, resultierend in erhöhten Urinvolumina (siehe Kap. 3.2.1, Abb. 15). Grund für das gesteigerte Trinkverhalten der Rescues ist möglicherweise, dass sie auch mehr (ca. 35 %) Futter zu sich nahmen. Um dies abzuklären, wäre es angebracht den verschiedenen Maus-Genotypen zukünftig statt freiem Zugang zum Futter äquivalente Mengen zu zuteilen oder sie während des Messzeitraums nüchtern zu halten.

Außerdem schieden die Mäuse nur einen geringen Teil des aufgenommenen Wassers als Harn messbar aus. Aufgrund des gleich gebliebenen Gewichts konnte eine Wasseransammlung im Körper der Mäuse ausgeschlossen werden. Zudem war der prozentual fehlende Differenzbetrag von Wasseraufnahme und Abgabe zwischen Rescues und WT sehr ähnlich. Folglich könnte die Fehlerquelle auf dem Urinsammelprinzip der Stoffwechselläufige beruhen. Vor allem der Sammeltrichter bietet eine sehr große Verdunstungsfläche. Der Versuch, den Verdunstungseffekt durch mehrfache Urinabnahme untertags zu minimieren, scheiterte. Möglicherweise lag es daran, dass die Hauptmenge an Urin, aufgrund der Nachtaktivität der Nager auch in diesem Zeitraum ausgeschieden wurde. Aber auch die Wasserabgabe über die Haut muss berücksichtigt werden.

Anhand des gemessenen Urinvolumens und der ermittelten Kreatininkonzentrationen in Urin und Plasma wurde die GFR berechnet. In der GFR gab es trotz der erhöhten Urinvolumina (GFR-Formel siehe Kap. 2.8.1) keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Rescues.

Neben der GFR und dem Urin- bzw. Trinkvolumen wurden die Ionenkonzentrationen im Urin untersucht. Die Rescues schieden auch unter Berücksichtigung der erhöhten Urinvolumina geringere Natriummengen aus (siehe Kap. 3.2.3, Tab. 16). Folglich sind die erniedrigten Natriumkonzentrationen der Rescues im Vergleich zu den WT nicht nur durch die erhöhten Urinvolumina erklärbar. Zwar geben sie unter Normal-Bedingungen ca. 27 % mehr Urin ab, die Natriumkonzentration ist jedoch um vieles mehr, nämlich um 55 % verringert. Bei Hoch-Salz liefert eine Berücksichtigung der größeren Urinvolumina nur noch einen Unterschied von ca. 13 % und bei Niedrig-Salz von ca. 24 %. Bei Kalium

hingegen sind die prozentualen Abweichungen zwischen WT und Rescues niedriger als bei Natrium.

Im Folgenden werden weitere Aspekte diskutiert:

#### ***4.1.1 Beeinflussung der GFR durch die Expression der cGKI in intraglomerulären Mesangialzellen***

Die Regulation der GFR über Vasokonstriktoren erfolgt einerseits über die Kontraktion von Vas afferens und efferens und die dadurch induzierte Druckdifferenz andererseits über die Kapillaroberfläche (62). Die Mesangialzellen hingegen stehen nicht nur in direktem Kontakt zum Endothel, sondern bilden zudem „loops“ um die Kapillarschlingen aus. Demzufolge kann sich eine Kontraktion der Mesangialzellen bzw. dieser „loops“ auf den Blutfluss, die Filtrationsfläche und dadurch auch auf die GFR auswirken (62). Die Kontraktionsfähigkeit der Mesangialzellen wird in der Literatur diskutiert (167). Obwohl sie mit SMC (smooth-muscle-cells) verglichen werden (16), exprimieren sie dennoch kein  $\alpha$ SMA (Daten nicht gezeigt). Wie in Kap. 3.1.3 dargestellt, konnten verschiedene Substratproteine der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in isolierten Glomeruli bzw. kultivierten Mesangialzellen nachgewiesen werden:

In den Mesangialzellen wurde die Expression und die Phosphorylierung von VASP durch cGKI gezeigt (Abb. 14). Auch in der Literatur wird eine cGKI $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung von VASP beschrieben (156). Dadurch soll eine über TRPC4 (Transient-receptor-potential-cation-channel) vermittelte SOC (Store-operated-calcium-channel) Antwort unterbleiben und schließlich die Calciumfreisetzung gehemmt werden.

In Abb. 13 (Kap. 3.1.3) wurden mögliche Substratproteine im Lysat isolierter Glomeruli durch deren Komplexbildung mit cGKI nachgewiesen. Unter anderem wurde die Interaktion von cGKI mit MYPT1 detektiert, das nach Phosphorylierung durch cGKI $\alpha$  die MLCP in glatten Muskelzellen aktiviert (141). Auch in Mesangialzellen ist bereits eine cGMP-abhängige Stimulierung der MLCP beschrieben worden (146). Hingegen die Expression der MLCK in Mesangialzellen war lange Zeit nicht geklärt (63). Die durch die Hemmung der MLCK bedingte Relaxation glatter Muskelzellen (141) könnte auch auf Mesangialzellen übertragbar sein.

Ebenso könnte die durch NO/cGMP bedingte cGKI $\beta$  Stimulierung und nachfolgende IRAG Aktivierung einen möglichen Signalweg für die NO/cGMP induzierte Relaxation in Mesangialzellen darstellen (129). Zudem bestätigt es die bereits postulierte Annahme, dass das für die Kontraktion notwendige Calcium aus intrazellulären Speichern stammt (136).

Auch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle, die sich unter anderem nach Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration öffnen, können durch cGKI aktiviert werden, was zu einem erhöhten Kaliumausstrom führt. Die daraus resultierende Hyperpolarisation induziert ein Schließen spannungsabhängiger L-Typ-Calcium-Kanäle und nachfolgende Muskelrelaxation (115, 37). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des BKCa, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanal von hoher Leitfähigkeit, in Mesangialzellen nicht überprüft. Allerdings gibt es bereits Veröffentlichungen, die eine Erniedrigung des Calcium-Spiegels nach einer NO/cGMP/PKG-abhängigen Aktivierung des BKCa beschreiben (136).

Selbst wenn cGMP am Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschehen der Mesangialzellen beteiligt ist, bleibt zu klären, ob durch cGMP messbare Unterschiede in der GFR verursacht werden.

#### ***4.1.2 Beeinflussung des tubuloglomerulären Feedbacks durch die Expression der cGKI im extraglomerulären Mesangium***

Die GFR wird unter anderem durch die Macula densa reguliert, indem die Macula densa das Natriumangebot im distalen Tubulus kontrolliert. Nach Registrierung einer verminderten Natriumkonzentration wird das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) aktiviert, wodurch unter anderem AngII (AngiotensinII) gebildet wird. AngII erhöht als potenter Vasokonstriktor über die Kontraktion des Vas afferens und Vas efferens die GFR, wobei das Vas efferens stärker kontrahiert wird als das Vas afferens (14). Zusätzlich aktiviert AngII NHE3 (siehe Kap. 4.2.1) und erhöht dessen Expression resultierend in einer verstärkten proximalen Natriumresorption. Neben der direkten Aktivierung bewirkt AngII auch indirekt über die Ausschüttung von ADH (antidiuretisches Hormon) und Aldosteron eine verstärkte Wasser- (Aquaporin-Einbau) bzw. Natriumresorption (ENaC, siehe Kap. 4.2.1). Immunhistochemisch konnte jedoch keine der beiden cGKI-Isoformen in tubulären Abschnitten detektiert werden. Aus diesem Grund beschränken wir uns auch bei der Interpretation der Resultate vorerst auf die Strukturen, die eine starke cGKI-Färbung zeigten. Wie im Ergebnisteil dargelegt, tendierten die Rescue-Tiere prinzipiell zu niedrigeren Natriumkonzentrationen im Urin. Dies müsste von der Macula densa registriert und über die Gap-junctions des extraglomerulären Mesangiums zu den juxtaglomerulären Zellen weitergeleitet werden. Dort wiederum würde eine Aktivierung des RAAS eine Vasokonstriktion des Vas efferens induzieren und folglich die GFR erhöhen. Der Vergleich der GFR in Abb. 16 (siehe Kap. 3.2.3) zeigt aber keinen signifikanten Unterschied. Tendenziell ist eine leichte Erhöhung der GFR bei den Rescues zu beobachten. Jedoch nicht ausreichend, um die überschüssige Natriumresorption zu kompensieren.

Durch die Expression der cGKI im extraglomerulären Mesangium, wäre ein Einfluss auf den „tubuloglomerulären feedback“ möglich. Dies würde erklären, weshalb bei cGKI-Defizienz in den cGKI $\alpha$ -Rescues - nach Detektion der niedrigen Natriumkonzentration durch die Macula densa - die notwendige Gegenregulation durch Erhöhung der GFR weitgehend unterbleibt. Der hypoosmolare Harn der Rescues (Ausnahme: Hoch-Salz-Diät) hätte über die Ausschüttung von ADH kompensiert werden müssen. Aufgrund der erhöhten Urinvolumina der Rescues war auch diese Gegenregulation nicht erkennbar.

Die für die Informationsweiterleitung notwendige Zell-Kommunikation wird über Gap-junctions vermittelt, die wiederum von Connexinen (Transmembranproteinen) gebildet werden. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass für die Signalübertragung zwischen Macula densa und JGA das Connexin40 wichtig ist, nachdem in Connexin40-KO-Mäusen nach Schleifendiuretika-Gabe typische postantidiuretische Effekte ausblieben (75). Dies wurde auf eine unzureichende RAAS-Aktivierung, die an der fehlenden Zunahme der Reninsekretion gemessen wurde, zurückgeführt (75). Möglicherweise spielt cGKI ebenso für die Zell-Kommunikation eine Rolle.

Zur genaueren Aufklärung würde auch hier die Applikation verschiedener Diuretika bei WT- und Rescue-Mäusen weiterhelfen. Nach Gabe von Schleifendiuretika könnte wie in der zitierten Arbeit der verzögerte postantidiuretische Effekt anhand einer erhöhten Reninsekretion bzw. einer Abnahme der GFR detektiert werden.

Wären dagegen Resorptionsvorgänge von Natrium, die während der gesamten Tubulus-Passage stattfinden, für die geringe Natriumkonzentration der Rescues im Urin verantwortlich, müsste dies trotzdem von der Macula densa im distalen Tubulus erkannt und über das RAAS ausgeglichen werden. Dies setzt jedoch voraus, dass die Natriumresorption vor der Macula densa stattfindet. Deshalb wird im nächsten Kapitel auf cGMP-kontrollierte Transportmechanismen in der Niere eingegangen, deren Regulation durch cGKI postuliert wird.



## **4.2 cGMP/PKG-abhängige Regulation tubulärer Ionentransporter als Ursache für die abweichenden Ionenkonzentrationen in cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäusen**

### **4.2.1 Beeinflussung von Natriumtransportern**

#### **ENaC (Epithelialer Natriumkanal)**

Im vorhergehenden Kapitel wurde untersucht, ob eine Fehlfunktion des tubuloglomerulären feedbacks, der primär durch die Macula densa reguliert wird, der Grund für die geringeren Natriumkonzentrationen der Rescues ist. Im Folgenden werden die verschiedenen Natrium-Transportmechanismen diskutiert. Wie bereits erwähnt, können die luminalen Natriumkonzentrationen in den nach der Macula densa folgenden Tubuliabschnitten nicht mehr von ihr kontrolliert werden. Deshalb soll vorerst der dort relevante Natrium – Transporter ENaC (Epithelialer Natriumkanal) betrachtet werden. Der epitheliale Natriumkanal übernimmt die Natriumresorption im ASDN (Aldosteron sensiblen distalen Nephron), beginnend im pars convoluta des distalen Tubulus - wo noch die Macula densa ihre Kontrollfunktion innehat - über das Verbindungsstück bis hin zum Sammelrohr (83). Entscheidend ist die Natrium-abhängige Regulation des Expressionsmusters von ENaC im ASDN, indem hohe Natriumkonzentrationen mit einer geringen Expression des Natriumkanals einhergehen. Demzufolge wird bei salzreichen Diäten nahezu kein ENaC exprimiert. Dagegen ist unter Standard-Salz-Diät ENaC bevorzugt im spätdistalen Teil und proximalen Teil des Verbindungsstückes vorzufinden. Während bei salzarmer Diät die höchste ENaC-Expression, nämlich im gesamten ASDN vorliegt (82).

Nachdem die ausgeschiedenen Natriumkonzentrationen der Rescues im Vergleich zu den WT grundsätzlich niedriger waren, wäre es denkbar, dass eine verstärkte Natriumresorption aufgrund einer erhöhten ENaC-Expression stattfindet.

Postuliert wird jedoch, dass PKG an einer Aktivierung des ENaC beteiligt ist (93). Demzufolge müssten die Rescues aufgrund der verminderten ENaC Stimulierung tendenziell weniger Natrium rückresorbieren, das heißt mehr Natrium ausscheiden, das Gegenteil war jedoch zutreffend.

Außerdem müsste - bei einer cGKI regulierten ENaC-Aktivität - der Unterschied in der ausgeschiedenen Natriummenge zwischen Rescue und WT in der Reihenfolge Hoch-, Standard-, Niedrig-Salz, korrelierend mit der ENaC-Expression, immer deutlicher werden. Bei unseren Untersuchungen hingegen war die Differenz zwischen WT und Rescue für Hoch- und Niedrig-Salz annähernd gleich (32 % bzw. 38 %). Man kann also

nicht nur eine Aktivierung, sondern auch eine cGKI-abhängige Hemmung von ENaC ausschließen. Selbst wenn eine Aktivierung des Natriumkanals über cGMP möglich ist (93), so läuft die Signalübertragung wahrscheinlich unabhängig von cGKI ab.

### **NHE3 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger)**

Kurz werden die tubulären Abschnitte vor der Macula densa anhand bisheriger Literaturdaten diskutiert, ob eine cGKI-abhängige Regulation ausgeschlossen werden kann. Der hier wichtigste Natriumtransporter ist der NHE3 im proximalen Tubulus. Als Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher übernimmt er den Großteil der Natriumabsorption nicht nur in Hinblick auf den proximalen Tubulus, sondern auf das gesamte Nephron (112). Von NHE3 ist bereits beschrieben, dass er sowohl in der Niere als auch im Colon durch NO/cGMP unter Involvierung einer PKG gehemmt werden kann (46). Wäre es PKGI würde bei den Rescues die PKG-abhängige NHE3 Hemmung aufgehoben sein. Folglich würde Natrium verstärkt resorbiert werden, was mit den erniedrigten Natriumkonzentrationen der Rescue-Mäuse (im Vergleich zu den WT) konform wäre. Die Arbeitsgruppe geht jedoch davon aus, dass PKGII und nicht PKGI für die Hemmung verantwortlich ist, da eine Bindung an NHERF2, einem Cofaktor des NHE3, erfolgen muss, was aber aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation nur mit der membranständigen PKGII, jedoch nicht mit der cytosolisch vorliegenden PKGI vereinbar ist (19). Es bleibt also noch zu klären, ob die niedrigeren Natriumkonzentrationen bei den Rescues auf eine erhöhte Natriumresorption durch NHE3 zurückzuführen ist.

### **NKCC2 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Transporter)**

Dem proximalen Tubulus anschließend dient auch die Henle'sche Schleife der Natriumresorption, wenn auch zu einem geringeren Anteil. Von besonderer Bedeutung ist hier NKCC2, ein Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Cotransporter, der vor allem im dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife in der apikalen Membran von Epithelzellen und in der Macula densa exprimiert wird (70, 94). Es wird bereits diskutiert, dass erhöhte cGMP-Konzentrationen, die durch ANP bzw. NO induziert wurden, die NKCC2-Expression erniedrigen (9, 103). Zugleich wird eine Involvierung der PKG ausgeschlossen (6). Stattdessen sollen die cGMP vermittelten Effekte auf einer Stimulierung der PDE2 beruhen, wodurch vermehrt cAMP abgebaut wird. Die erniedrigten cAMP-Konzentrationen wiederum werden für die verminderte NKCC2-Expression verantwortlich gemacht (6). Folglich kann auch dieser Transporter nicht als Erklärung für die erniedrigten Natriumkonzentrationen in den Rescues dienen.

### **4.2.2 Beeinflussung von Kaliumtransportern**

Die Rescues tendierten zusätzlich zur Ausscheidung leicht erniedrigter Kaliumkonzentrationen im Vergleich zu den WT (siehe Kap. 3.2.3). Demnach könnte die Kaliumsekretion bei den Rescues eingeschränkt sein. Der größte Anteil an Kalium wird im Verbindungsstück des distalen Tubulus, sowie im cortikalen Sammelrohr sezerniert (44, 45, 96). Zudem ist die Kaliumsekretion eng an eine adäquate Natriumresorption gekoppelt. Dieser Natrium-Kalium Austausch ist in unserem Fall besonders relevant, denn sowohl die Kaliumkonzentrationen, als auch die Natriumkonzentrationen sind tendenziell bei den Rescues im Vergleich zu den WT niedriger gewesen.

Die ausgeschiedenen Kaliummengen wichen aber im Gegensatz zu den Natriummengen zwischen Rescues und WT nur geringfügig voneinander ab (siehe Kap. 3.2.3). Demnach ist anzunehmen, dass tubuläre Kaliumtransporter PKG-unabhängig reguliert werden.

Für die Kaliumsekretion werden jedoch auch cGMP-abhängige Mechanismen diskutiert (55, 155). Kalium kann einerseits basolateral vom Interstitium im Austausch gegen Natrium durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in die Zelle sezerniert werden. Andererseits gibt es spezifische Kaliumkanäle, die nach Überschreitung des Kalium-Gleichgewichtspotentials durch Hyperpolarisierung der Membran Kalium sezernieren. Ein solcher Vertreter ist der 18pS-Kanal, der vor allem deshalb erwähnenswert ist, weil zu seiner Aktivierung cGMP über PKG beiträgt (55, 155). Somit würde bei den Rescues (vorausgesetzt es wäre PKGI) die Aktivierung dieses Kanals und dadurch die Kaliumsekretion in den Tubuli unterbleiben. Jedoch wurde auch bei diesen Publikationen nicht konkret zwischen den PKGs differenziert.

Nennenswert ist ebenso ein luminaler Kaliumkanal im cortikalen Sammelrohr, der Calcium-abhängig reguliert wird. Vor allem in Hinblick auf die niedrigen sowohl Natrium- als auch Kaliumkonzentrationen der Rescues, ist dieser Kanal einer der wenigen, durch den Kalium nicht im Austausch gegen Natrium sezerniert wird. Er wird bei hypoosmolaren Stress unter Involvierung von cGMP/PKG zur Kaliumsekretion aktiviert (55, 56). Aufgrund der fehlenden cGKI würde in den Rescues die cGMP/cGKI-abhängige Kanalaktivierung trotz hypoosmolarer Bedingungen unterbleiben. Folglich wäre auch die sezernierte Kaliumkonzentration im Vergleich zu den WT kleiner. Tatsächlich lag ein signifikanter Kalium-Unterschied zwischen Rescues und WT nur bei Niedrig-Salz-Diät vor. Dies wäre mit der Hypothese konform, nach der unter hypoosmolaren Bedingungen – was unter „Niedrig-Salz“ zutrifft – der Kanal durch PKG aktiviert wird. Dagegen spricht, dass eine membranständige PKG für diesen Effekt diskutiert wird (56), was auf die PKGII hinweisen würde. Jedoch wurde auch hier der

bereits erwähnte PKG-Inhibitor (KT 5823) verwendet, dessen Spezifität nicht geklärt ist (16).

## 5. Zusammenfassung Niere-Teil 1: Expression und physiologische Funktion der cGKI in der Niere

Während für NO und cGMP bereits einige renale Funktionen identifiziert werden konnten, ist die Involvierung der cGKI noch relativ unerforscht. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche stand zum einen die cGKI-KO- zum anderen cGKI $\alpha$ -Rescue-Linie, die nach Total-Knock-out der cGKI lediglich die  $\alpha$ -Isoform der cGKI unter Kontrolle eines Glatt-Muskel-Promotors exprimiert, zur Verfügung. Bei der cGKI $\alpha$ -Rescue-Linie erfolgt die Expression von cGKI $\alpha$  mit Ausnahme der Arteriolen nicht in renalen Strukturen. Gegenüber Total-cGKI-KO-Tieren sind diese Mäuse widerstandsfähiger, verbunden mit einer längeren Lebensdauer, so dass die Durchführung von *in vivo*-Untersuchungen erheblich erleichtert wird. Im ersten Teil der Arbeit wurden grundlegende Nierenparameter unter verschiedenen Bedingungen in Form von Salz-Diäten bestimmt. Der Vergleich WT versus cGKI $\alpha$ -Rescue sollte bereits erste funktionelle Hinweise liefern. Sowohl cGKI als auch für die Kontraktilität bedeutende Substrate der cGKI konnten in Mesangialzellen nachgewiesen werden. Dabei war in der GFR, als einer der aussagekräftigsten Nierenparameter, kein Unterschied detektierbar, obwohl ein Effekt der Mesangialzellen auf die GFR postuliert wird. Auffallend war dagegen die signifikant erhöhte Wasseraufnahme, korrelierend mit einer erhöhten Urinabgabe der Rescues im Vergleich zu den WT. Zudem tendierten die Rescues grundsätzlich zur Ausscheidung niedrigerer Natriumkonzentrationen im Harn. Der Unterschied zu den WT blieb auch nach Berücksichtigung der erhöhten Urinvolumina erhalten.

Nachdem cGKI immunhistochemisch in tubulären Strukturen nicht nachweisbar war und auch in der Literatur keine konkreten Hinweise dazu vorliegen, scheiden wahrscheinlich cGKI regulierte Transportmechanismen als Ursache für die detektierten Unterschiede aus. Vielmehr spricht dafür, dass eine mangelnde Gegenregulation der Macula densa („tubuloglomerulärer feedback“) für die abweichenden Ionenmengen und Urinvolumen der Rescues verantwortlich ist. Ein Anhaltspunkt dafür wäre die Expression der cGMP-abhängigen Kinase im extraglomerulären Mesangium, welches an der Informationsübertragung der Macula densa beteiligt ist.

Eine weitere Möglichkeit die aufgestellten Hypothesen näher zu analysieren, wäre die Verabreichung verschiedener Diuretika mit bzw. ohne Einfluss auf den „tubuloglomerulären feedback“.

## 6. Ergebnisse Niere-Teil 2: Pathophysiologische Funktion der cGKI in der Niere

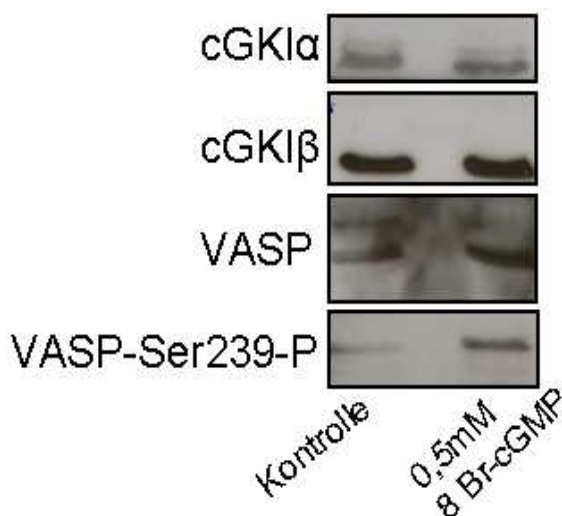
### 6.1 Rolle von cGMP/cGKI für Wachstums- bzw. Fibrose-Vorgänge

#### 6.1.1 Einfluss von cGMP/cGKI auf die Proliferation von Mesangialzellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, übernehmen die Mesangialzellen vielfältige Funktionen. Während sie sich unter physiologischen Bedingungen in der Ruhephase befinden, mit einem Zellwachstum kleiner 1 % (98), sind viele renale Erkrankungen gekennzeichnet durch eine unkontrollierte Proliferation der Mesangialzellen sowie eine überschüssige extrazelluläre Matrixbildung (25). Ein Beispiel hierfür ist die Glomerulosklerose, die meist in eine interstitielle Fibrose übergeht, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird. Beide Erkrankungen können bis hin zum progressiven Nierenversagen führen, was die Relevanz der Mesangialzellen und des Interstitiums betont. Folglich ist es von besonderem Interesse, Einflussfaktoren der Mesangialzellproliferation zu identifizieren, die möglicherweise zu therapeutischen Ansätzen führen können. Als eine Determinante für die Proliferation von Mesangialzellen wird auch cGMP diskutiert, was im Folgenden überprüft wird.

Die Expression der cGKI in den Mesangialzellen wurde bereits dargestellt (siehe Kap. 3.1.2). Im weiteren Verlauf wurden die cGKI-Aktivität und deren Funktion in Mesangialzellen analysiert.

#### Nachweis der cGKI-Aktivität in frisch kultivierten Mesangialzellen



**Abb. 18: Immuno-Blot muriner Mesangialzellen** (Passage 1) nach 30 min Stimulierung mit 0,5 mM 8-Br-cGMP. Detektion von VASP-Ser239-P, Gesamt-VASP, cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ .

Die Mesangialzellen wurden aus isolierten Glomeruli gewonnen (siehe Kap. 2.9.1). Zum Nachweis der cGKI-Aktivität wurden Zellen der Passage 1 verwendet und für 30 min mit 0,5 mM 8-Br-cGMP stimuliert.

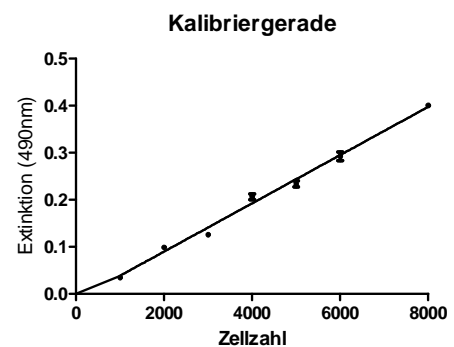
Anschließend wurde ein Immuno-Blot im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle durchgeführt. Abb. 18 bestätigt die Expression der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in den kultivierten Mesangialzellen. Die Bandenintensität der cGKI-Isoformen ist bei Kontrolle und stimulierter Probe

identisch. Des Weiteren sollte die Aktivität der Kinase überprüft werden, wozu der Nachweis der spezifischen Phosphorylierung des Substratproteins VASP (Vasodilatatorisches Phosphoprotein) an der cGKI-Phosphorylierungsstelle Ser239 diene. In der Zelle selbst reguliert VASP Vorgänge der Zelladhäsion, des Aktin-Cytoskeletts und des Vesikel-Transports (17, 52). In Abb. 18 ist nach Stimulierung mit 0,5 mM 8-Br-cGMP im Vergleich zu Gesamt-VASP eine verstärkte Bandenintensität von VASP Ser239 erkennbar, was schlussfolgern lässt, dass cGKI aktiv vorliegt.

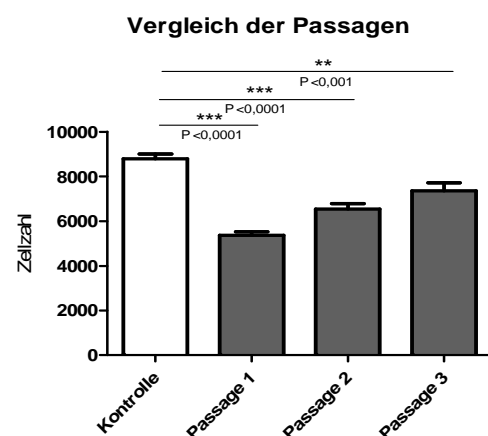
### Proliferationsversuche in frisch kultivierten Mesangialzellen

Nach Aufklärung der Expression und Nachweis der Aktivität der cGKI, wurde deren Funktion anhand frisch kultivierter Mesangialzellen untersucht.

Wie bereits erwähnt, ist das Proliferationsverhalten der Mesangialzellen entscheidend für die Pathogenese zahlreicher renaler Erkrankungen. In den nachfolgenden Versuchen wurde als Maß für die Proliferation die Zellzahl mit dem MTS-Test der Firma Promega bestimmt. Dieser nutzt aus, dass Zellen NADPH und NADH bilden, wodurch MTS (Dimethylthiazolcarboxymethoxyphenylsulfophenyl tetrazolium) zu Formazan reduziert wird. Die Menge an sezernierten NADPH und NADH (Nicotinamidadenindinucleotid) und dadurch gebildetes Formazan korreliert mit der Zellzahl. Das im Medium lösliche Formazan wird bei einer Wellenlänge von 490 nm vermessen. Zur Umrechnung der gemessenen Extinktion in die Zellzahl wurde im Doppelversuch mit je 12 Löcher/Zellzahl eine Standardkurve erstellt (vgl. Abb. 20). Nach linearer Regression erhält man folgende Geradengleichung:  $y = 5 \times 10^{-5}x$  ( $r^2 = 0,9502$ ). Bei den anschließenden Messungen lag die gemessene Extinktion der Kontroll-Zellen innerhalb der Kalibriergerade. Um zu überprüfen, ob die durch cGMP bedingte Hemmung unabhängig von der Passagenhöhe ist, wurden die Mesangialzellen aus 2 unterschiedlichen WT-



**Abb. 20: Kalibriergerade zur Bestimmung der Zellzahl** (Extinktion bei 490 nm)



**Abb. 19: cGMP-Effekt in Abhängigkeit von der Passagenzahl.**

Kontrolle: ohne cGMP-Zugabe  
Passage 1, 2 und 3: jeweils 72 h stimuliert mit 1 mM 8-Br-cGMP (grau)

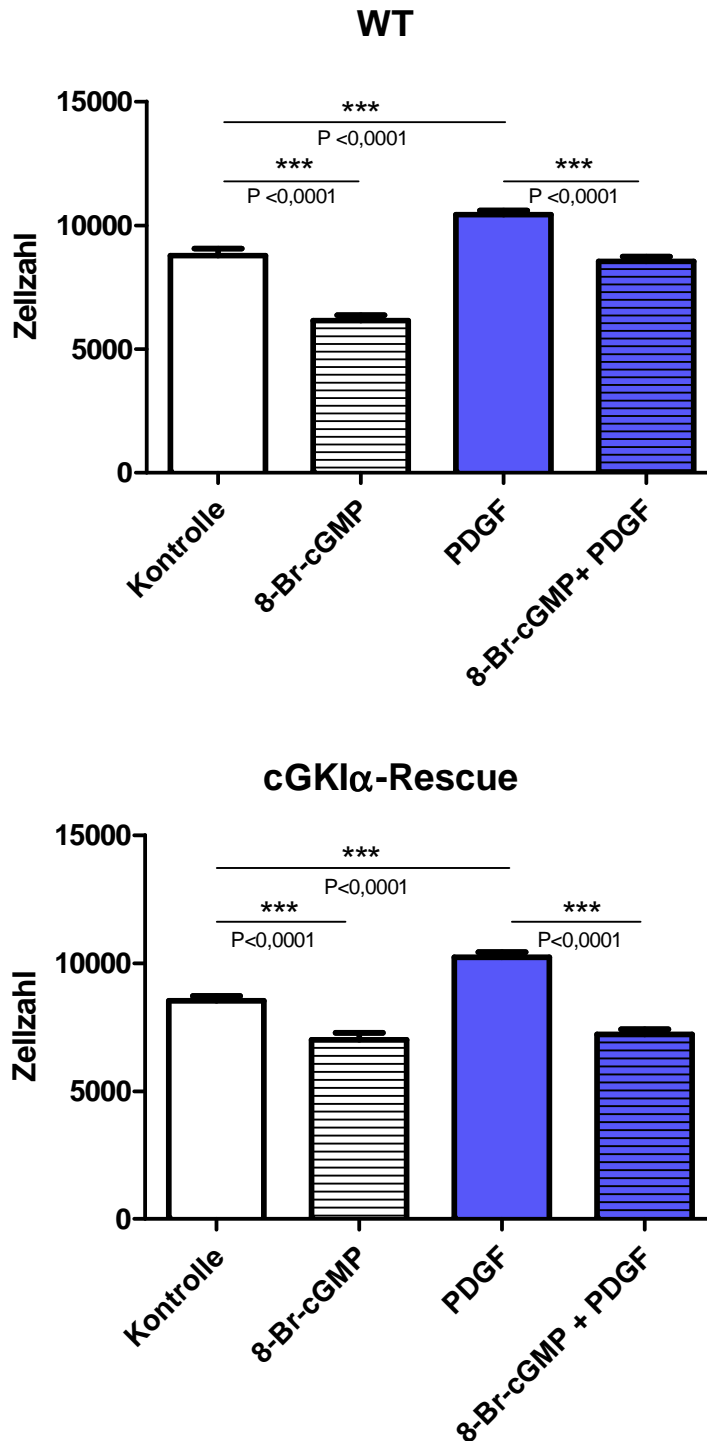
Mäusen isoliert (N = 2) und je 12 Löcher für Kontrolle bzw. Stimulation mit 1 mM 8-Br-cGMP ausgesät. Abb. 19 zeigt, dass der antiproliferative Effekt von 8-Br-cGMP mit fortschreitender Passage geringer wurde. So war die Hemmung bei Passage 1 am deutlichsten ausgeprägt, nahm jedoch bis Passage 3 zunehmend ab (Tab. 17).

	Passage 1	Passage 2	Passage 3
<b>Wachstums-Hemmung durch 8-Br-cGMP</b>	40 %	25 %	15 %

**Tab. 17: Übersicht über die prozentuale Hemmung der Mesangialzellproliferation durch 1 mM 8-Br-cGMP in Abhängigkeit von der Passagenzahl.**

Dies mag daran gelegen haben, dass die Zellen bei langer Kulturdauer bzw. durch wiederholtes Passagieren „dedifferenzieren“, d.h. sie verlieren die für sie typischen, charakteristischen Eigenschaften, z.B. bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Hierfür wird unter anderem die für das Passagieren notwendige Trypsin-Behandlung verantwortlich gemacht (13). Auch die mit der Passagenzahl korrelierende Abnahme der cGKI-Expression (Daten nicht gezeigt) war wahrscheinlich darauf zurückzuführen und bedingte wiederum den verringerten cGMP-Effekt. Deshalb beschränkten wir uns bei der weiteren Analyse auf die Passagen 1 und 2. Zur Überprüfung der Wirkung von cGMP ließen wir die Zellen drei Tage in Anwesenheit von 8-Br-cGMP anwachsen. Um auch die Rolle von IRAG bzw. cGKI zu untersuchen, wurden nicht nur Zellen aus WT-, sondern auch aus IRAG-KO- (N = 2) bzw. cGKI $\alpha$ -Rescue- (N = 1) und cGKI-KO-Mäusen (N = 2) isoliert. Die beiden Letztgenannten exprimieren keine cGKI in ihren Mesangialzellen. Für Kontrolle und Stimulation wurde jeweils eine 12 fach Bestimmung durchgeführt, d.h. je 12 Löcher ausgesät. Mittels PDGF (Platelet-derived-growth-factor) sollte die Zellteilung angeregt und dabei der Effekt einer Co-Gabe von cGMP wieder getestet werden. PDGF, von dem bekannt ist, dass es als potentes Mitogen von Mesangialzellen gebunden wird und die Proliferation anregt, existiert in 4 Isoformen (PDGF-A, -B, -C und -D), wobei die A- und B-Isoformen als Homo- oder Heterodimere sezerniert werden (1). Nach Wallmon et al. (151) soll das PDGF-BB-Homodimer die Isoform sein, die den stärksten Effekt auf die Proliferation von Mesangialzellen erzielt. Deshalb wurde ausschließlich diese Isoform mit der nach Herstellerangaben gewählten Konzentration von 0,01  $\mu$ g/ml verwendet. Wie in Abb. 21 und anhand der Tab. 18 ersichtlich, wurde durch die alleinige Gabe von 8-Br-cGMP bei den WT-Zellen die Proliferation um ca. 30 % gehemmt, während bei den cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen nur noch eine Hemmung um 18 % erreicht werden konnte. Dagegen wurde durch PDGF sowohl bei den WT- als auch bei den cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen die Proliferation um jeweils ca. 20 % stimuliert. Bei gleichzeitiger Gabe von PDGF und 8-Br-cGMP konnte in allen Zellen die durch PDGF induzierte Stimulierung durch 8-Br-cGMP wieder aufgehoben werden.





**Abb. 21: Übersicht über das Proliferationsverhalten von WT- und cGKI $\alpha$ -Rescue-Mesangialzellen nach 72 h Inkubation unter folgenden Bedingungen:**

Säule eins: Kontrolle

Säule zwei: Anwesenheit von 1 mM 8-Br-cGMP

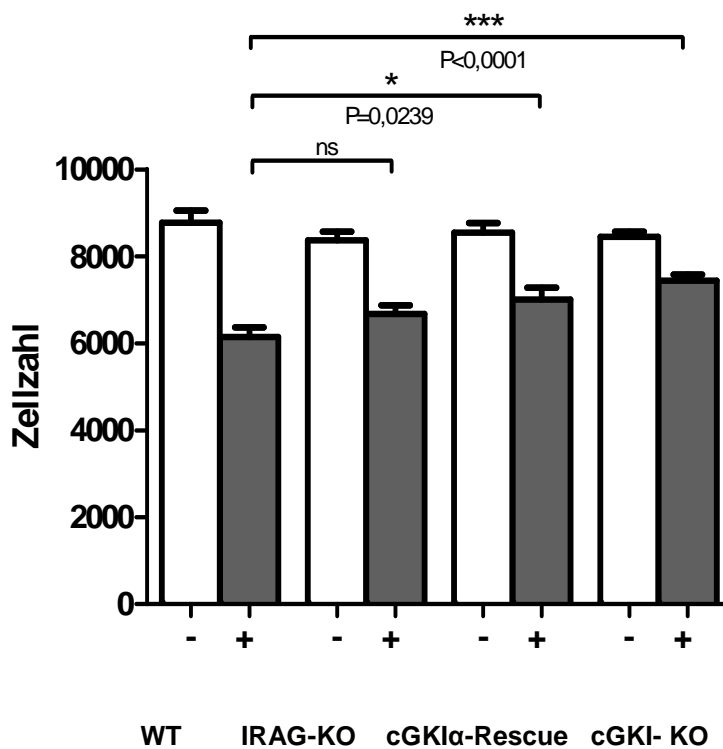
Säule drei: Anwesenheit von 0,01  $\mu$ g/ml PDGF

Säule vier: Anwesenheit von cGMP/PDGF

	<b>8-Br-cGMP</b> <i>Hemmung [%]</i>	<b>PDGF</b> <i>Stimulierung [%]</i>	<b>PDGF + 8-Br-cGMP</b> <i>Hemmung [%]</i>
<b>WT</b>	- 30%	+ 19%	- 18%
<b>cGKI<math>\alpha</math>-Rescue</b>	- 18%	+ 20%	- 15%

**Tab. 18: Zusammenfassung der Abb. 21** über die prozentuale Hemmung bzw. Stimulierung der Proliferation im Vergleich WT- mit cGKI $\alpha$ -Rescue-Mesangialzellen.

Die IRAG-KO-Zellen zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Zellen (siehe Abb. 22). Auch hier konnte die Proliferation der mit cGMP stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen um 25 % gehemmt werden. Folglich spielt IRAG als Substratprotein der cGKI $\beta$  wahrscheinlich nur eine geringe Rolle für die cGMP-abhängige Hemmung der Proliferation.



**Abb. 22: Effekt von 1 mM 8-Br-cGMP auf kultivierte Mesangialzellen** von WT, IRAG-KO, cGKI $\alpha$ -Rescue und cGKI-KO.

Abschließend zeigt Abb. 22, dass der Hemmeffekt von cGMP bei den cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen signifikant verringert ist. Zusätzlich wurden auch cGKI-KO-Zellen untersucht. Hier war die cGMP induzierte Hemmung noch stärker aufgehoben als bei den cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen und der Unterschied zu den WT höchst signifikant (siehe Abb. 22).

Dies lässt schlussfolgern, dass durch cGMP eine Wachstumshemmung erzielt wird, die wahrscheinlich durch cGKI vermittelt wird.

## 6.1.2 Einfluss von cGMP/cGKI auf die Progression der renalen Fibrose

### 6.1.2.1 Expression der cGKI $\alpha$ im medullären Interstitium

Neben der starken Expression der cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  in den Mesangialzellen, die im vorangehenden Kapitel untersucht wurden, zeigen die nachfolgenden Übersichtsbilder erste Unterschiede zwischen beiden Isoformen. Nur bei cGKI $\alpha$  (Abb. 23) ist eine auffallende Färbung in der Medulla der Niere zu erkennen, dagegen nicht bei cGKI $\beta$  (Abb.24).

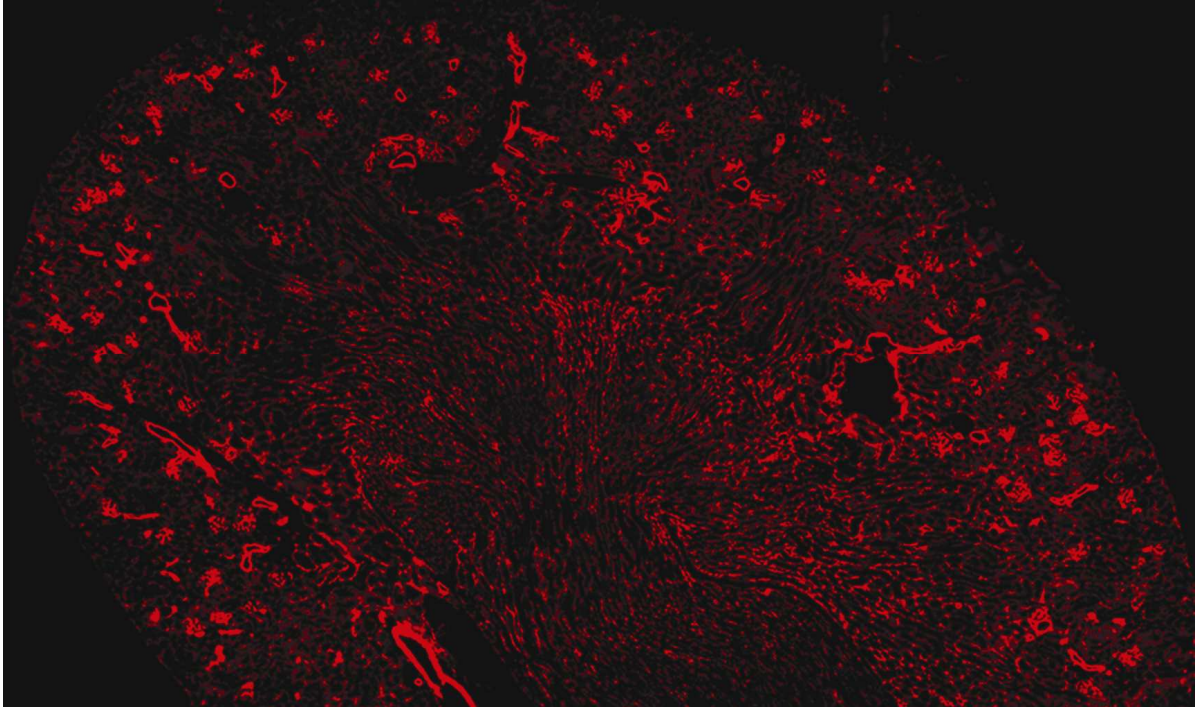


Abb. 23: Übersichtsbild einer mit cGKI $\alpha$ -AK (Alexa 647) gefärbten WT Niere

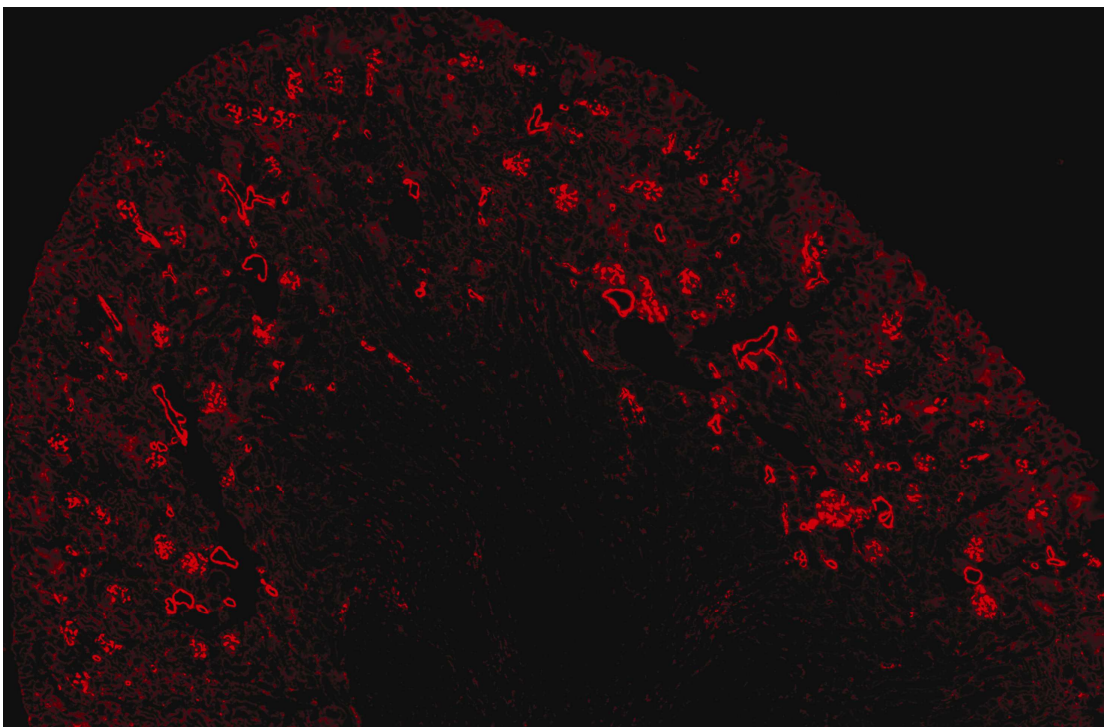
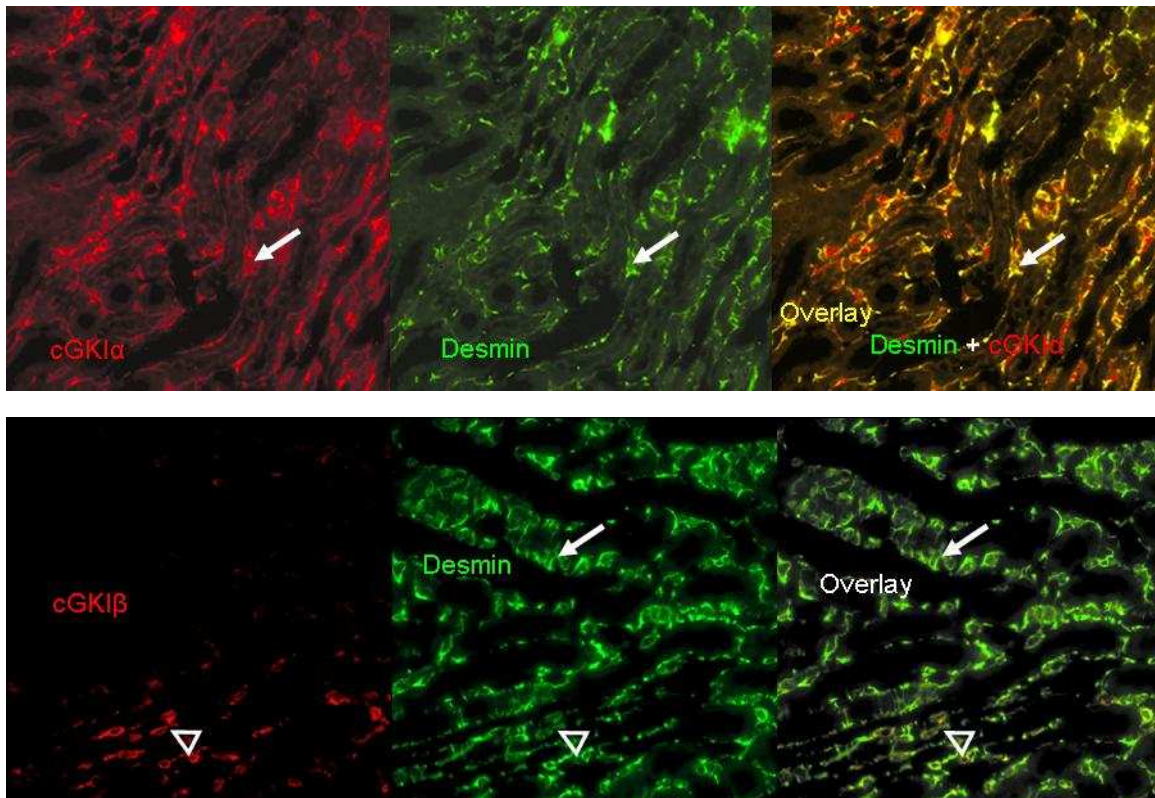


Abb. 24: Übersichtsbild einer mit cGKI $\beta$ -AK (Alexa 647) gefärbten WT Niere

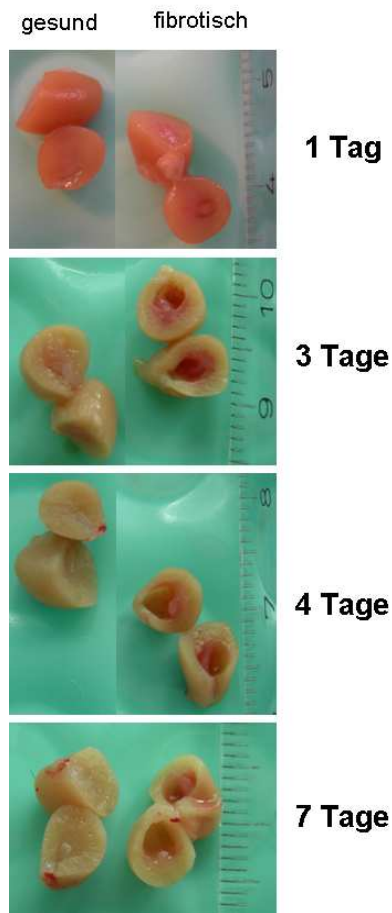
Vergrößert man einen Ausschnitt aus der Medulla, sieht man, dass cGKI $\alpha$  im Interstitium lokalisiert ist und dort mit Desmin colokalisiert (Abb. 25). cGKI $\beta$  ist dagegen nicht im medullären Interstitium zu finden, sondern nur in den Gefäßbündeln, die im Interstitium verlaufen (Abb. 25).



**Abb. 25: Analyse der cGKI-Expression im medullären Interstitium:** cGKI $\alpha$  (rot) colokalisiert mit Desmin (grün) im Interstitium der gesamten Medulla (siehe Pfeil). Im Gegensatz zu cGKI $\alpha$ , keine Colokalisation von cGKI $\beta$  mit Desmin im Interstitium (siehe Pfeil), sondern nur Expression in den Gefäßbündeln (siehe Pfeilkopf).

Auch im Interstitium ist die cGKI-Funktion noch ungeklärt. Deshalb war ein Ansatzpunkt die Rolle von cGKI für die interstitielle Fibrose zu untersuchen. Die typischen Kennzeichen der Fibrose, wie unkontrollierte Proliferation oder überschüssige Matrixbildung, wurden bereits in der Einleitung beschrieben (siehe Kap. 1.3.3). Um mögliche Effekte der cGKI auf die fibrotischen Vorgänge zu analysieren, dienten die cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäuse. Durch unilaterale Ureter Ligation (siehe Kap. 2.10.1) wurde die renale Fibrose bei den Mäusen induziert. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen fanden immunhistochemisch, sowie auf mRNA- und Protein-Ebene statt.

### 6.1.2.2 Makroskopische Befunde

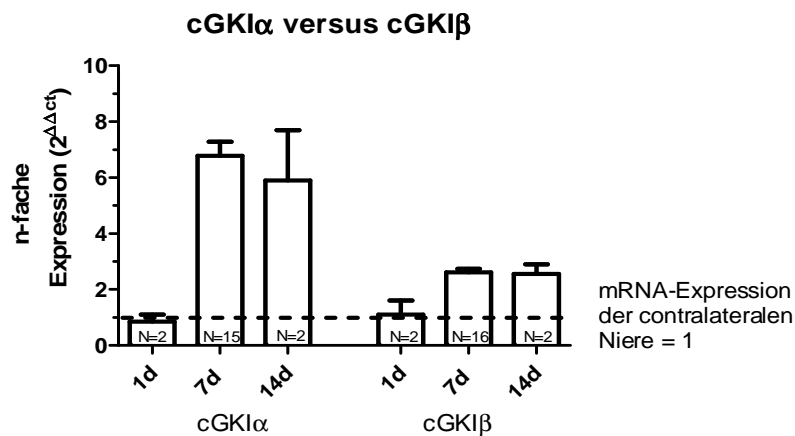


Um den Verlauf der Fibrose nach UUL verfolgen zu können, wurde der Harnrückstau unterschiedlich lange aufrechterhalten. Ein Tag, 3 Tage, 4 Tage, 7 Tage bzw. 14 Tage (Bild nicht gezeigt) nach der OP wurden die Tiere unter Isofluran-Anästhesie mit isotonischer NaCl-Lösung perfundiert. Abb. 26 zeigt die je nach Dauer der UUL ausgeprägte Fibrose im Vergleich mit der contralateralen, gesunden Niere. Je länger die UUL zurücklag, desto deutlicher war der Abbau der Medulla fortgeschritten; innerhalb einer Woche war jedoch die Fibrose bereits stark ausgeprägt.

**Abb. 26: Fibrose-Entwicklung im WT post UUL nach unterschiedlichen Progressionszeiten:**  
jeweils links im Bild: contralaterale gesunde Kontroll-Niere  
rechts im Bild: fibrotische Niere

### 6.1.2.3 Untersuchungen auf mRNA-Ebene mittels Light Cycler

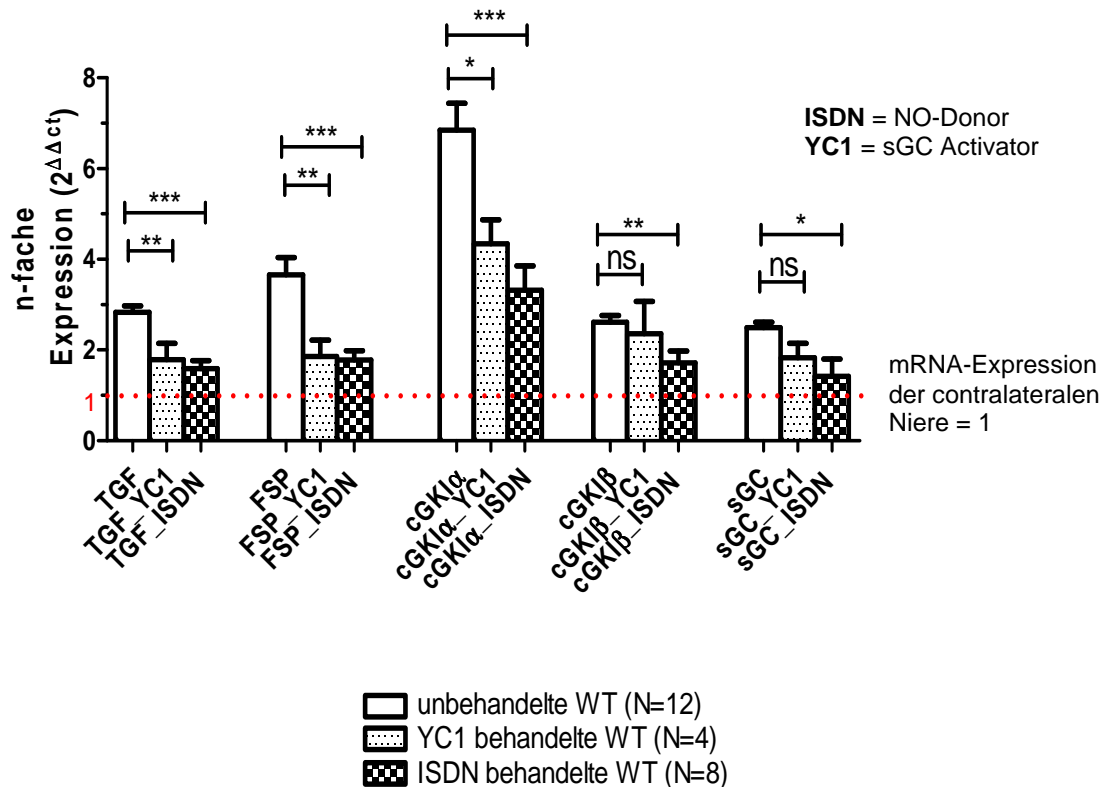
Die Real time PCR erlaubt den quantitativen Vergleich der mRNA-Mengen zwischen gesunder und fibrotischer Niere. Dafür wurden zum einen mittels der  $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode die erhaltenen ct-Werte auf die ct-Werte des Housekeepers 18s-rRNA normalisiert. Um die n-fache Expression zu ermitteln, wurden die jeweiligen ct-Werte der Kontrolle vom ct-Wert der fibrotischen Niere subtrahiert (vgl. Kap. 2.10.4). Während nach einem Tag die mRNA-Expression der cGKI $\alpha$  noch unverändert war, nahm sie nach 7 Tagen um das 6,8-fache ( $\pm 0,6$ ) und nach 14 Tagen um das 5,9-fache ( $\pm 1,8$ ) zu (Abb. 27). In Anbetracht der hohen Standardabweichung nach 14 Tagen, bedingt durch die kleinere Anzahl, kann man von einer etwa gleich starken Expressionszunahme nach 7 bzw. 14 Tagen ausgehen. Dagegen wird die mRNA der  $\beta$ -Isoform bei der Fibrose nur geringfügig hoch reguliert (7 Tage: 2,6-fach ( $\pm 0,2$ )); (14 Tage: 2,6-fach ( $\pm 0,4$ )) (Abb. 27). Diese im Vergleich zur  $\alpha$ -Isoform wesentlich schwächere Hochregulation der  $\beta$ -Isoform deutet auf eine geringere Rolle von cGKI $\beta$  gegenüber cGKI $\alpha$  hin.



**Abb. 27: Analyse der mRNA-Expression 1d/7d/14d post UUL.** Als Bezugspunkt wurden die mRNA-Mengen der gesunden, contralateralen Niere gewählt, normalisiert auf 18s-rRNA ( $\Delta\Delta$ ct-Methode).

Nachdem auf mRNA-Ebene zwischen 7 bzw. 14 Tagen kein deutlicher Unterschied bzgl. der cGKI $\alpha$ -Expression zu sehen war (siehe Abb. 27), beschränkte man sich für die nachfolgenden Versuche auf einen Zeitraum von einer Woche.

In der nachfolgenden Abb. 28 wurden die mRNA-Mengen unbehandelter WT-Mäuse (jeweils 1. Balken) mit denen von, mit dem sGC-Aktivator YC1 (jeweils 2. Balken) bzw. dem NO-Donor ISDN (jeweils 3. Balken) behandelten Mäusen verglichen. Zur Beurteilung der Fibrose-Progression dienten zum einen der Wachstumsfaktor TGF $\beta$ , sowie das Fibroblasten spezifische Protein FSP1. Deren mRNA-Mengen waren nach 7 Tagen UUL im Vergleich zur contralateralen gesunden Niere erhöht (siehe Abb. 28, Tab. 19). Wie bereits erwähnt, zeigte cGKI $\alpha$  (6,8-fach) die stärkste Expressionszunahme, im Gegensatz zu cGKI $\beta$  (2,6-fach) und sGC (2,5-fach) (siehe Tab. 19).



**Abb. 28: n-fache Zunahme der mRNA-Expression von TGF $\beta$ , FSP1, cGKI und sGC nach 7 Tagen UUL**, bezogen auf die kontralaterale gesunde Niere. Vergleich unbehandelter (N=12) mit YC1 (N=4) bzw. ISDN (N=8) behandelten WT-Nieren.

Um mögliche cGKI-abhängige Effekte untersuchen zu können, wurde täglich YC1 (15 mg/kg) bzw. ISDN (30 mg/kg) WT-Mäusen intraperitoneal injiziert. Beide Substanzen induzieren über eine Aktivierung der sGC erhöhte cGMP-Konzentrationen, die wiederum cGKI aktivieren können. Auch hier hielt man den Zeitraum von 7 Tagen bis zur Perfusion und Organentnahme ein, wobei mit der Injektion ein Tag nach der OP begonnen wurde. Wie in Abb. 28 dargestellt, bewirkte die sGC Aktivierung durch YC1 bzw. die NO-Gabe eine signifikante Abnahme der cGKI $\alpha$  mRNA gegenüber unbehandelten, Ureter ligierten Mäusen. Dagegen war bei der cGKI $\beta$  mRNA-Menge kein bzw. nur ein schwacher Effekt durch YC1 bzw. ISDN erkennbar. Die mRNA für sGC nahm nach Verabreichung von YC1 bzw. ISDN ab. Zudem konnte durch YC1 bzw. ISDN die mRNA-Expression der Fibrosemarker TGF $\beta$  und FSP1 signifikant erniedrigt werden.

ISDN wurde zusätzlich in einer doppelt so hohen Dosis (60 mg/kg Körpergewicht, N = 12) verabreicht. Wie in Tab. 19 und Tab. 20 zu erkennen ist, unterschied sich jedoch die „down-regulation“ der Fibrosemarker nur geringfügig, weswegen man sich bei den anschließenden Rescue-Versuchen auf die niedrigere ISDN-Dosis (30 mg/kg Körpergewicht) beschränkte.



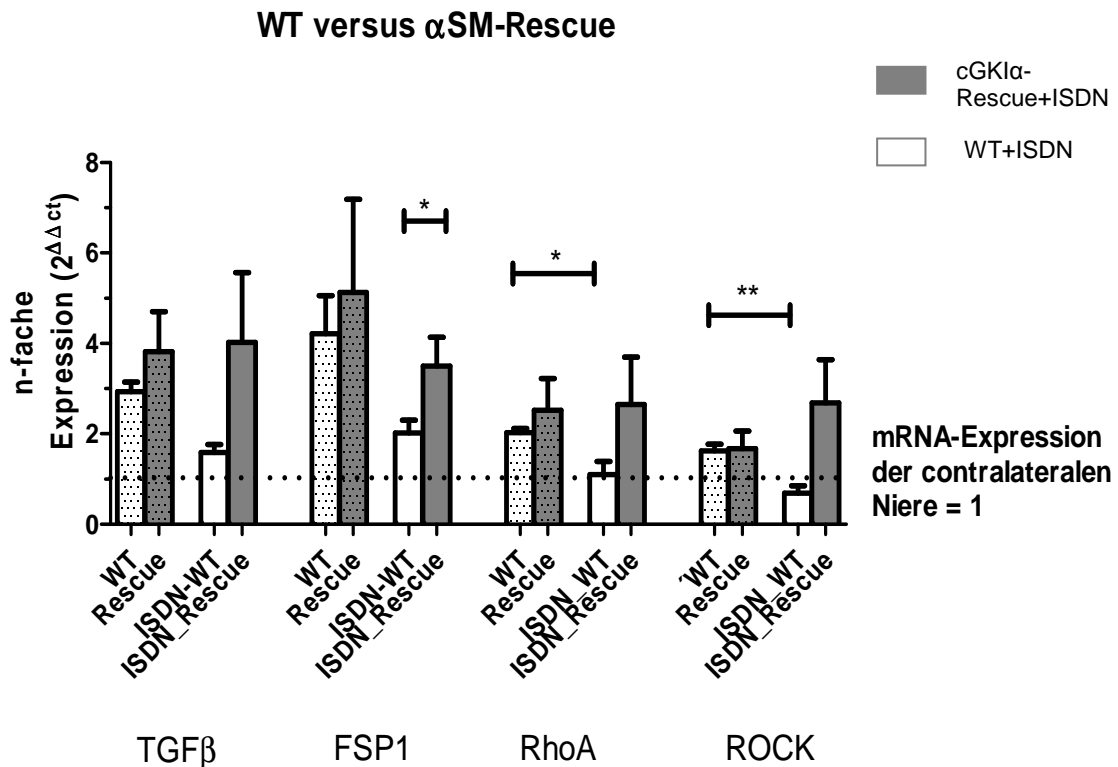
WT	unbehandelt	ISDN 30 mg/kg KG	ISDN 60 mg/kg KG	YC1 15 mg/kg KG
TGF $\beta$	2,8 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,4
FSP1	3,6 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,4
cGKI $\alpha$	6,8 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,5
cGKI $\beta$	2,6 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,7
sGC	2,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,3

**Tab. 19: n-fache Expressionszunahme der mRNA-Mengen** (WT-Nieren 7d post UUL). Gegenübergestellt wurden die mRNA-Mengen unbehandelter Tiere mit denen nach Verabreichung von ISDN (30 bzw. 60 mg/kg) und YC1. Die mRNA-Mengen wurden relativ zu den nicht-fibrotischen berechnet und normalisiert auf 18s-rRNA ( $\Delta\Delta$ ct-Methode).

WT	ISDN 30 mg/kg KG	ISDN 60 mg/kg KG	YC1 15 mg/kg KG
TGF $\beta$ (Abnahme in %)	- 24 %	- 31 %	- 32 %
FSP1 (Abnahme in%)	- 62 %	- 69 %	- 69 %

**Tab. 20: Prozentuale Abnahme der mRNA-Mengen profibrotischer Marker nach Verabreichung von ISDN (30 bzw. 60 mg/kg) bzw. YC1.**

Nachdem in WT-Mäusen YC1 bzw. ISDN eine signifikante „down-regulation“ der profibrotischen Marker induzierte, sollte die Rolle von cGKI bei der Fibrose untersucht werden. Für dessen Aufklärung wurden die Rescue-Mäuse analysiert, bei denen cGKI vermittelte Effekte in der Niere ausgeschlossen werden konnten. Wie Abb. 29 zeigt, unterschieden sich zwar die mRNA-Mengen der Fibrosemarker nicht signifikant zwischen WT- und Rescue-Mäusen, tendierten aber zu einer leicht erhöhten Expression. Deutliche Unterschiede zwischen beiden Mauslinien waren erst nach Verabreichung von ISDN erkennbar. Während die mRNA-Mengen von TGF $\beta$  und FSP1 in WT-Nieren signifikant erniedrigt wurden (siehe auch Abb. 28), blieben die der Rescue-Mäuse nahezu unbeeinflusst (siehe Abb. 29, Tab. 21).



**Abb. 29:** n-fache Expressionszunahme der mRNA-Mengen von TGF $\beta$ , FSP1, RhoA und ROCK. Gegenübergestellt wurden zum einen die mRNA-Mengen WT versus Rescue, sowie unbehandelt versus ISDN (30 mg/kg) behandelt (7 Tage post UUL).

	WT <i>unbehandelt</i>	Rescue <i>unbehandelt</i>	WT <i>ISDN 30 mg/kg KG</i>	Rescue <i>ISDN 30 mg/kg KG</i>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	2,9 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 1,5
<b>FSP1</b>	5,8 $\pm$ 1,7	5,1 $\pm$ 2,1	2,0 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,6
<b>RhoA</b>	2,0 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 1,0
<b>ROCK</b>	1,6 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 1,0

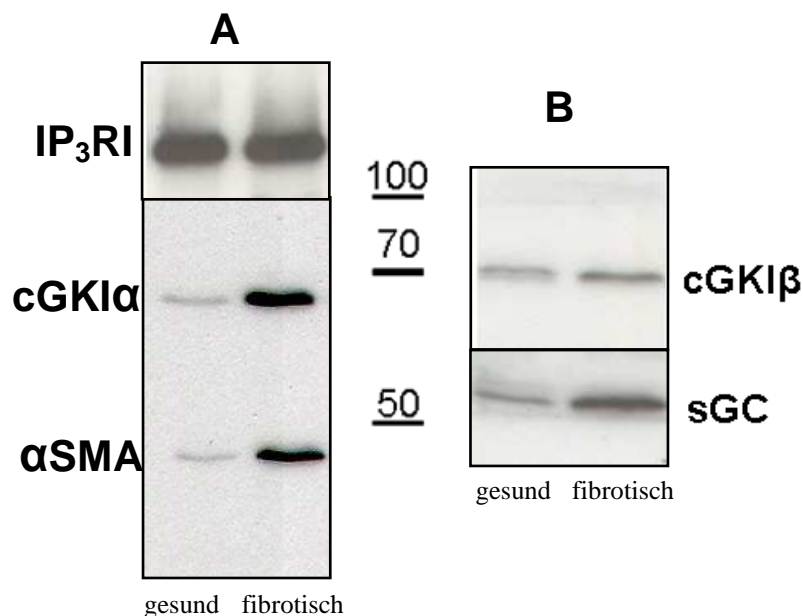
**Tab. 21:** Zusammenfassung der mRNA-Mengen aus Abb. 29.

Zusätzlich sollten die Effekte auf die Expression der von cGKI induzierten Signalkaskade untersucht werden. RhoA stellt das cGKI Substrat dar, das im Zusammenhang mit Fibrose am häufigsten diskutiert wird (116, 117, 140). Die Ureter ligierten Nieren wiesen nur schwach erhöhte mRNA-Mengen für RhoA auf, die jedoch in WT-Mäusen signifikant durch YC1 bzw. ISDN erniedrigt wurden. Ebenso verhielt sich das Expressionsmuster der ROCK (Rho-assoziierte Kinase). Bei den Rescues hingegen war durch ISDN kein

Effekt auf die mRNA-Expression von RhoA/ROCK detektierbar (Abb. 29, Tab. 21). Eine Veränderung auf mRNA-Ebene bedeutet aber nicht, dass auch die Protein-Expression davon betroffen sein muss. Deshalb werden im nächsten Kapitel Western-Blots bzw. immunhistochemische Analysen gezeigt.

#### 6.1.2.4 Untersuchungen auf Protein-Ebene mittels Western-Blot und immunhistochemischer Analysen

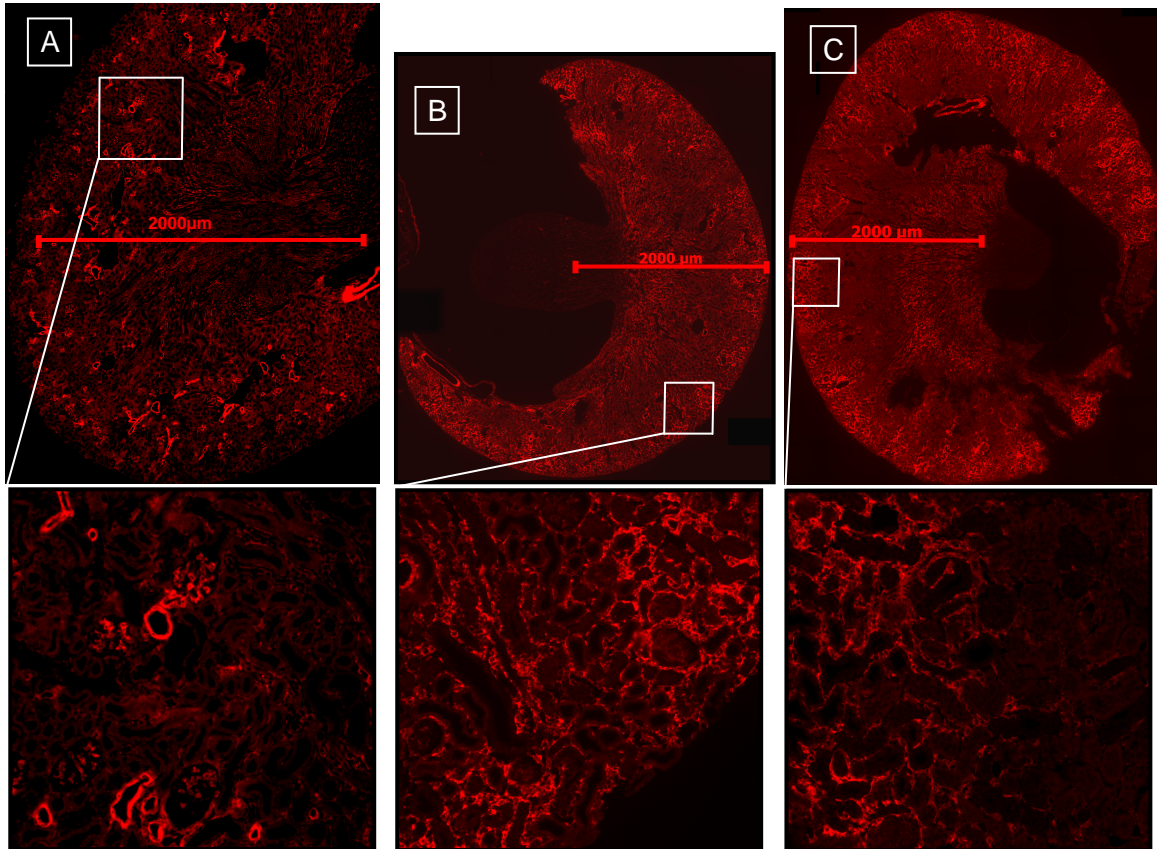
In diesem Kapitel wurden die fibrotischen Nieren bzgl. ihrer Protein-Expression untersucht. Abb. 30 zeigt einen Western-Blot, bei dem die Protein-Mengen von  $\alpha$ SMA, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$  und sGC einer fibrotischen Niere mit denen einer gesunden Kontroll-Niere verglichen werden. Auffallend ist vor allem die vermehrte  $\alpha$ SMA- und cGKI $\alpha$ -Bildung (Abb. 30 A). Im Gegensatz dazu veränderte sich die Protein-Mengen der  $\beta$ -Isoform nur geringfügig, während die Bandenintensität der löslichen sGC, das im Signalweg der cGKI proximale Enzym, in der fibrotischen Niere zunimmt (Abb. 30 B). Als Ladungskontrolle diente das Substratprotein IP<sub>3</sub>RI, da dessen Expression nach Ureter Ligation unverändert blieb (Abb. 30 A).



**Abb. 30: Analyse der Protein-Expression von WT-Nieren 7d post UUL mittels Western-Blot.** Es wurden je 60  $\mu$ g Protein aufgetragen:  $\alpha$ SMA, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$ , sGC und IP<sub>3</sub>RI. Als Ladungskontrolle diente IP<sub>3</sub>RI.

Um Aussagen über das Verteilungsmuster der Proteine in der Niere treffen zu können, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Übersichtsaufnahmen zeigten noch einmal, dass die Medulla nach 7 Tagen UUL weitgehend aufgelöst war. Durch Färbungen mit CollagenI und Desmin konnte die Fibrose bedingte Bindegewebsvermehrung nachgewiesen werden (Bilder nicht gezeigt). Zudem war die  $\alpha$ SMA- (Abb. 33 A/B) und die cGKI $\alpha$ -Färbung (Abb. 31 A/B) in der fibrotischen Niere großflächiger verteilt als in der Kontroll-Niere. Dabei war in der gesunden Niere die  $\alpha$ SMA-Expression ausschließlich auf die Gefäße beschränkt (Abb. 33 A). Wie in Abb. 32 A/B erkennbar, beruht die erhöhte cGKI $\alpha$ -Menge auf einer stärkeren Expression von cGKI $\alpha$  im kortikalen Interstitium im Vergleich zur gesunden Niere. Ebenso bestätigten die immunhistochemischen Färbungen mit cGKI $\beta$  die bereits gezeigten Ergebnisse des Western-Blots; denn in beiden Fällen war nur eine geringe Expressionszunahme zu sehen (Abb. 32 D/E).

In Abb. 31 B/C sieht man außerdem, dass durch die Behandlung mit ISDN die Fibrose geringer ausgeprägt ist: Im Gegensatz zur unbehandelten Niere (Abb. 31 B) ist bei der behandelten (Abb. 31 C) zumindest der äußere Bereich der Medulla noch vorhanden.

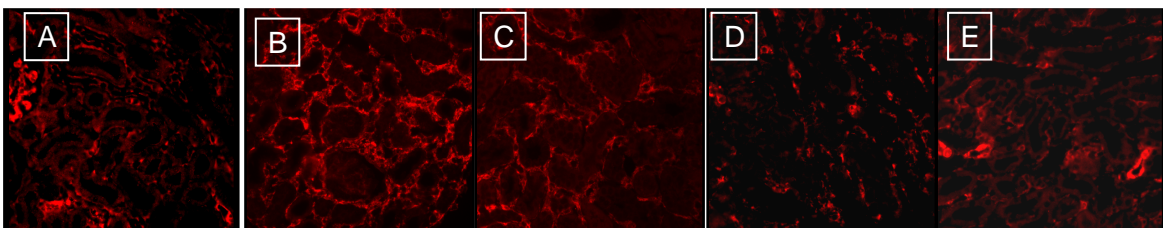


**Abb. 31: WT-Nieren: gesund – fibrotisch – behandelt; Vergleich der cGKI $\alpha$ -Expression**

Gesunde WT-Niere: unbehandelt (A)

Fibrotische WT-Niere: unbehandelt (B) versus ISDN (30mg/kg) behandelt (C)

Die Übersichtsbilder wurden mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen.



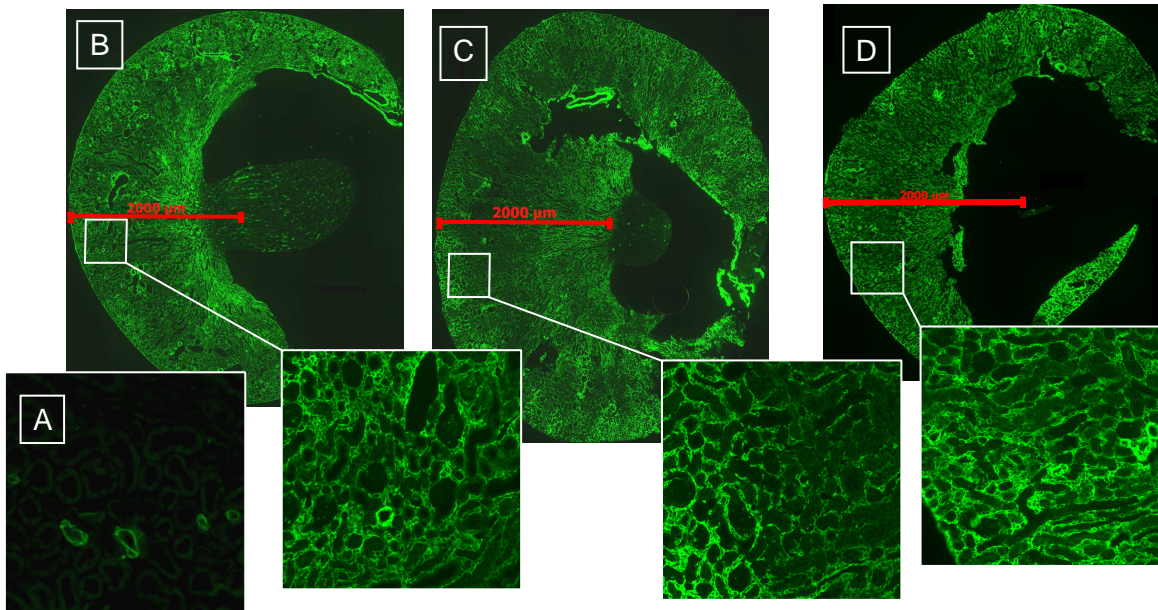
**Abb. 32: WT-Nieren: gesund – fibrotisch; Vergleich der cGKI $\alpha$ - bzw. cGKI $\beta$ -Expression**

Gesunde WT-Niere, cGKI $\alpha$  gefärbt: unbehandelt (A)

Fibrotische WT-Niere, cGKI $\alpha$  gefärbt: unbehandelt (B) versus ISDN (30 mg/kg) behandelt (C)

Gesunde WT-Niere, cGKI $\beta$  gefärbt: unbehandelt (D)

Fibrotische WT-Niere, cGKI $\beta$  gefärbt: unbehandelt (E)

**Abb. 33:  $\alpha$ SMA-Färbung von WT- versus Rescue-Niere**

Gesunde WT-Niere: unbehandelt (A)

Fibrotische WT-Niere: unbehandelt (B) versus ISDN (30mg/kg) behandelt (C)

Fibrotische Rescue-Niere: ISDN (30mg/kg) behandelt (D)

Die Übersichtsbilder wurden mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

## **7. Diskussion Niere-Teil 2: Pathophysiologische Funktion der cGKI in der Niere**

### ***7.1 Antiproliferativer Effekt von cGMP/cGKI in Mesangialzellen***

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Effekt von cGMP auf die Proliferation von Mesangialzellen untersucht. Hierzu ließ man isolierte murine Mesangialzellen in Anwesenheit von 8-Br-cGMP anwachsen. Während bei den WT-Mesangialzellen durch 8-Br-cGMP die Proliferation um ca. 30 % und bei den IRAG-KO um ca. 25 % gehemmt wurde, konnte bei den cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen bzw. bei den cGKI-KO-Zellen nur noch eine Hemmung um ca. 18 % (Rescue) bzw. 12 % (cGKI-KO) erreicht werden (siehe Kap. 6.1.1, Abb. 22). Dagegen scheint IRAG als cGKI $\beta$  Substrat so gut wie keine Rolle für die Proliferation von Mesangialzellen zu spielen.

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen also für einen cGMP/cGKI bedingten antiproliferativen Effekt in den Mesangialzellen.

Eine antiproliferative Wirkung von cGMP wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. So konnte die bei pulmonaler Hypertonie einhergehende verstärkte Proliferation von Ratten PaSMCs (Pulmonary-artery-smooth-muscle-cells) durch PDE5-Hemmung (einer spezifisch cGMP abbauenden PDE, siehe Kap. 1.1) inhibiert werden (160). Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Versuche mit Primär-Kulturen von Ratten VSMCs (Vascular-SMCs) (166). Bei diesen wurden direkt durch 8-Br-cGMP bzw. nach Gabe eines selektiven PDE5-Inhibitors (A-02131-1) erhöhte cGMP-Konzentrationen induziert, um im Anschluss zu zeigen, dass die Proliferation fördernde Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren durch cGMP aufgehoben werden kann. Dagegen war nach Gabe eines häufig verwendeten PKG-Inhibitors (KT5823) der cGMP-Effekt nicht mehr detektierbar, was ein Hinweis für die Involvierung der Kinase an der antiproliferativen Wirkung von cGMP war (166).

Die PKG-Abhängigkeit des cGMP-Effekts wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in VSMCs gezeigt (22). Erst nachdem durch adenovirale Transfektion der PKG die PKG-Aktivität gegeben war, konnte die Proliferation der VSMCs mit 8-Br-cGMP um 74 % verringert werden. Außerdem war die Aufhebung des antiproliferativen Effekts nur mit dem PKG-Inhibitor KT5823, jedoch nicht mit KT5720, einem PKA-Inhibitor möglich. Demnach ist PKG für die Regulation der Proliferation relevanter als PKA (22).

Selbst eine durch Hyperglykämie-induzierte VSMC Proliferation wurde cGMP-abhängig vermindert, jedoch erst nachdem mittels Transfektion eine konstitutive Expression der katalytischen Domäne der cGKI gewährleistet war (153). Demnach wurden bereits

cGMP-abhängige, antiproliferative Effekte unter Beteiligung der PKG gezeigt. Jedoch nur anhand von PKG-Inhibitoren, deren Spezifität nicht bewiesen ist (16).

In Kap. 6.1.1 konnte aber nicht nur eine Hemmung der Mesangialzellproliferation durch cGMP, sondern auch eine Stimulierung durch PDGF gezeigt werden. Die Proliferation wurde jedoch sowohl in WT als auch in cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen durch den Wachstumsfaktor PDGF erhöht (siehe Abb. 21).

Wie in Kap. 1.3.2 beschrieben, besteht die bekannteste Signaltransduktionskaskade, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, aus der sequentiellen Aktivierung von Ras-Raf-MEK-ERK-Elk-1 (20, 39, 68, 122). Gerade weil deren Bedeutung bereits für die Proliferation von Mesangialzellen diskutiert wurde, ist sie besonders erwähnenswert (25, 78). Aber nicht nur für Mesangialzellen, auch für die Migration von VSMCs spielen durch PDGF aktivierte MAP-Kinasen eine große Rolle (65).

Demzufolge könnte auch die in dieser Arbeit durch PDGF induzierte, erhöhte Proliferation auf einer Aktivierung der MAP-Kinasen beruhen. Nachdem sowohl in den WT als auch in den cGKI $\alpha$ -Rescue-Zellen das Wachstum beschleunigt wurde, kann von einem cGKI-unabhängigen Effekt ausgegangen werden.

Trotzdem könnte die Signaltransduktionskaskade, die für die Proliferation verantwortlich gemacht wird, der Aufklärung des cGMP/PKG-Effekts dienen:

Zum einen soll die cGMP vermittelte antiproliferative Wirkung auf eine erhöhte Expression der MAPK-Phosphatase zurückzuführen sein, die durch Dephosphorylierung der MAP-Kinasen die Signalübertragung unterbricht. Eine MAPK-Phosphatase stellt die MKP-1 dar, die mit ERK-Effektoren um Bindestellen an der Kinase (ERK) konkurriert. Durch die Bindung der Phosphatase an Stelle des Effektors wird die Aktivierung der ERK und dadurch die Signalübertragung unterbunden (163). NO/cGMP/cGKI $\alpha$  soll auch über die Stimulierung dieser Phosphatase MKP-1 zum Abbruch der Signalkaskade beitragen (65). So war die zuvor erwähnte - durch PDGF/MAPK induzierte - Migration von VSMCs durch NO/cGMP/cGKI hemmbar (65). In einer aktuelleren Arbeit konnte dieses Ergebnis ebenso bestätigt werden. Hier wurden nach Sildenafil-Gabe erhöhte cGMP-Konzentrationen erreicht, die anschließend für die Hemmung einer durch PDGF induzierten Proliferation von PaSMCs verantwortlich gemacht wurden. Als mögliche Ursache ziehen die Autoren jedoch nicht nur die cGKI $\alpha$  bedingte „up-regulation“ von MKP-1 in Betracht, sondern auch die Phosphorylierung von Raf-1 durch cGKI $\alpha$ , wodurch eine Mitogen induzierte Raf-1 Aktivierung nicht mehr möglich ist (79). Ähnliche Resultate erhielt man in renalen Tubulus-Zellen, bei denen eine zuerst durch AngiotensinII



ausgelöste Hypertrophie durch ANP/cGMP-Gabe über MKP-1 wieder reduziert wurde (51). Gleiches wurde in aus Ratten isolierten glomerulären Mesangialzellen gezeigt, nämlich dass ANP bzw. 8-Br-cGMP die MKP-1-mRNA- und Protein-Expression steigert (138).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es denkbar, dass der in dieser Arbeit in den Mesangialzellen beobachtete antiproliferative Effekt von cGMP auf eine durch cGKI $\alpha$  vermittelte Aktivierung der MKP-1 zurückzuführen ist. Die Rolle von MKP-1 bzw. Raf-1 wurde von uns noch nicht untersucht. Jedoch wurden zum ersten Mal Proliferationsversuche in cGKI $\alpha$ -Rescue- bzw. cGKI-KO-Mesangialzellen durchgeführt, die nicht nur den antiproliferativen cGMP-Effekt, sondern auch die Involvierung der cGKI zeigen.

## ***7.2 Antifibrotischer Effekt von cGMP/cGKI in der Niere***

Eine Konsequenz der Glomerulosklerose ist die Beeinträchtigung des selektiven Filters, was sich in einer erhöhten Protein-Durchlässigkeit widerspiegelt. Der vermehrte Übertritt von Proteinen in den proximalen Tubulus übersteigt wiederum deren Kapazität zur endozytotischen Rückresorption, wodurch tubulointerstitielle Strukturen geschädigt werden (73). Folglich geht die Glomerulosklerose mit einer tubulointerstitiellen Fibrose einher. Auch deren Begleiterscheinungen sind weitgehend identisch, nämlich überschüssige Bindegewebsvermehrung, unkontrollierte Proliferation sowie Makrophageninfiltration, so dass zwischen den Signalwegen sehr viele Parallelen bzw. Überschneidungen zu erkennen sind. Dennoch unterscheidet sich die Matrix des Glomerulus von der des tubulären Interstitiums: Während Mesangialzellen im Glomerulus vorzufinden sind, enthält das tubuläre Interstitium primär Fibroblasten. Immunhistochemisch konnte aber sowohl in Mesangialzellen des Glomerulus als auch in Fibroblasten des Interstitiums cGKI $\alpha$  nachgewiesen werden. Nachdem im vorherigen Kapitel ein antiproliferativer Effekt von cGKI in den Mesangialzellen beschrieben wurde, war nicht auszuschließen, dass durch cGKI auch Proliferationsvorgänge des Interstitiums beeinflusst werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit die pathophysiologische Rolle von cGKI bei der Entstehung der interstitiellen Fibrose, für die Proliferationsvorgänge besonders bedeutsam sind, untersucht. Das Modell der unilateralen Ureter Ligation (UUL) eignet sich sehr gut zur Fibrose Induktion bei Mäusen (21). Zudem sei noch darauf verwiesen, dass bei den für die Versuche verwendeten 129sv Mausstamm (im Gegensatz zu BL-6 Mäusen) auch glomerulosklerotische Vorgänge durch die UUL hervorgerufen werden (21). Nach 7 Tagen UUL zeigte sich

eine stark veränderte cGKI $\alpha$ -Expression sowohl auf mRNA-Ebene mittels Light Cycler als auch auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Aufnahmen und Western-Blot. Diese Ergebnisse sprachen für eine Involvierung von cGKI $\alpha$  an fibrotischen Vorgängen. Wie in Abb. 27 (siehe 2.10.4) deutlich zu erkennen ist, nimmt die Expression der cGKI $\alpha$ -mRNA 7 Tage nach der Fibrose Induktion viel stärker zu ( $6,8\pm 0,6$ ) als die der  $\beta$ -Isoform ( $2,6\pm 0,2$ ). Auch auf Protein-Ebene (mittels Western-Blot) dominierte in der Ureter ligierten Niere die cGKI $\alpha$ -Expression gegenüber der cGKI $\beta$  (siehe 2.10.3, Abb. 30 A). Immunhistochemisch wurde die erhöhte cGKI $\alpha$ -Expression in den renalen Strukturen näher analysiert: So zeigten beide Isoformen in der gesunden Niere im cortikalen Interstitium nur eine schwache Färbung, während in der Ureter ligierten Niere die  $\alpha$ -Isoform wesentlich deutlicher hoch reguliert wurde als die  $\beta$ -Isoform. Dagegen war im medullären Interstitium der Unterschied zur gesunden Niere wesentlich schwächer, da dort bereits vor der Ligation cGKI $\alpha$  stark exprimiert vorlag.

Nachdem die cGKI $\alpha$ -Expression sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene am deutlichsten erhöht war, stand im Vordergrund deren Funktion in Hinblick auf die Fibrose zu untersuchen. Der sGC-Aktivator YC1 bzw. der NO-Donor ISDN stimuliert durch erhöhte cGMP-Konzentrationen cGKI. Nach Applikation von YC1 bzw. ISDN an WT-Mäusen wurden die mRNA-Mengen der profibrotischen Stimuli signifikant erniedrigt. Deshalb erschien ein protektiver Effekt zumindest von NO/cGMP naheliegend. Um sicher zu stellen, dass auch cGKI involviert war, wurde das gleiche Prozedere mit den cGKI $\alpha$ -Rescue-Mäusen wiederholt. Ohne YC1- bzw. ISDN-Gabe glichen sowohl immunhistochemisch als auch auf mRNA-Ebene die fibrotischen WT-Nieren den fibrotischen Rescue-Nieren. Die mRNA-Mengen für die profibrotischen Faktoren waren zwar bei den Rescues tendenziell höher, jedoch im Vergleich zu den WT nicht signifikant. Erst nach ISDN Applikation wurde der Unterschied zwischen beiden Mauslinien deutlich, indem die in den WT detektierte „down-regulation“ der Fibroseindikatoren in den Rescue-Mäusen unterblieb. Eine Erklärung hierfür wäre:

Die fibrosebedingt, vermehrt gebildeten Myofibroblasten exprimierten weiterhin cGKI $\alpha$ , weshalb in der fibrotischen WT-Niere erhöhte cGKI $\alpha$ -Mengen nachgewiesen wurden. Jedoch war die Aktivierung der cGKI zu gering, um auch ohne ISDN Unterschiede zwischen WT- und Rescue-Mäusen feststellen zu können. Der PKG-Effekt wurde aber nach ISDN-Gabe deutlich, nachdem erhöhte cGMP-Spiegel zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Kinase beigetragen haben. Demzufolge kann angenommen werden, dass der antifibrotische Effekt von NO/cGMP über cGKI vermittelt wurde.

Die cGKI wiederum besitzt verschiedene Effektoren. Das im Zusammenhang mit Fibrose wohl am häufigsten diskutierte Substrat der cGKI stellt das bereits erwähnte RhoA und

deren Kinase ROCK (Rho-assoziierte Protein-Kinase) dar (siehe Kap. 1.3.3). Wie bereits in der Einleitung (siehe Kap. 1.3.3) beschrieben, kann die RhoA/ROCK Kaskade durch Vasokonstriktoren oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden (81, 139, 111). Anschließend werden smad-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, wodurch die Gentranskription profibrotischer Proteine initiiert wird (140).

Auch die Ureter ligierten Nieren zeigten (7d post UUL) leicht erhöhte mRNA-Mengen für RhoA/ROCK. Nach ISDN-Gabe wurde jedoch die mRNA-Menge von RhoA/ROCK nur in WT und nicht in Rescue-Mäusen signifikant verringert. Demzufolge liegt es nahe, dass der protektive Effekt von cGKI unter anderem über RhoA/ROCK vermittelt wird.

Ein cGMP-abhängiger antifibrotischer Effekt wurde bereits aufgrund einer verminderten Expression des Glycoproteins TSP-1 (Thrombospondin 1) diskutiert (59, 154). TSP-1 wird nicht nur bei der diabetischen Nephropathie durch die erhöhten Glucosespiegel, sondern auch bei der Thy1 induzierten Glomerulonephritis vermehrt gebildet. Erhöhte TSP-1-Spiegel wiederum aktivieren den Wachstumsfaktor TGF $\beta$ , der wie bereits erwähnt als Initiator für die Signalkaskade fungiert, indem er über die Phosphorylierung von smad-Proteinen die Gentranskription von Matrixproteinen und somit die Matrix-Expansion begünstigt (59, 154). Erhöhte cGMP-Spiegel - induziert in der einen Arbeit durch die Hemmung von PDE5 (59), beziehungsweise durch die Gabe eines NO-Donors (154) - inhibierten den Ablauf dieser Signalkaskade, indem sie die TSP-1-Expression und nachfolgende TGF $\beta$  Aktivierung verminderten. Zusätzlich wurde noch auf eine cGMP-abhängige Aktivierung der PKG geschlossen, nachdem der PKG-Inhibitor KT5823 den NO/cGMP-Effekt aufhob, dagegen durch die konstitutive Expression der katalytischen Domäne der cGKI die Wirkung von NO/cGMP wiederhergestellt werden konnte (154). Neben dem Einfluss auf die TSP-1-Expression soll cGKI auch direkt in die Gentranskription eingreifen, indem es zusammen mit - durch TGF $\beta$  aktiviertem - smad4 einen Komplex ausbildet und dadurch deren Funktion für die Gentranskription unterbindet.

Weiterhin ist die ungehemmte Proliferation auf einen pathologisch veränderten Ablauf des Zellzyklus zurückzuführen. Sowohl bei der Thy1 induzierten Glomerulonephritis als auch bei der diabetischen Nephropathie findet eine erhöhte Zellteilung durch einen ungehemmten Eintritt von der G1- in die S-Phase statt. Ein Zusammenspiel verschiedener Proteine bestimmt deren Ablauf: Beginnend mit dem rb (retinoblastoma)-Protein, das den Übergang von der G1- zur S-Phase kontrolliert. Das rb-Protein selbst wird durch CDK (Cyclin-abhängige Kinasen) kontrolliert. Deren Aktivität wiederum wird durch das p21 und p27 Protein determiniert. Folglich lässt eine durch p21 und p27 vermittelte verringerte Hemmung dieser CDKs eine verstärkte Stimulierung des rb-

Proteins zu. PKG soll hier inhibierend auf die erhöhte Cyclin-Expression eingreifen, dagegen stimulierend auf die erniedrigte p27- bzw. p21-Aktivität. In beiden Fällen wird die erhöhte Cyclin-abhängige Kinasen-Aktivität vermindert, wodurch das rb-Protein weniger stimuliert und nachfolgend auch die Zellteilung normalisiert wird (153, 61). Denkbar wäre, dass auch dieser PKG-Effekt über RhoA vermittelt wird. Wie bereits in Kap. 1.3.3 erwähnt, wird RhoA ein regulatorischer Einfluss auf Cycline und nachfolgender Zellteilung, speziell dem Übergang von G1- zur S-Phase, zugesprochen (164).

## 8. Zusammenfassung Niere-Teil 2: Pathophysiologische Funktion der cGKI in der Niere

Während im ersten Teil dieser Arbeit primär auf mögliche physiologische Funktionen der cGKI in der Niere eingegangen wurde, erfolgte im zweiten Teil die Untersuchung der cGKI unter pathophysiologischen Bedingungen. Sowohl in Fibroblasten des Interstitiums als auch in Mesangialzellen des Glomerulus wurde immunhistochemisch eine hohe cGKI-Expression detektiert. Beide Strukturen sind maßgeblich determinierend für die Progression einer renalen Fibrose. Vorerst wurde der Einfluss von cGMP/cGKI auf Proliferationsvorgänge untersucht, die vermehrt bei fibrotischen Erkrankungen anzutreffen sind. Während cGMP in frisch kultivierten WT-Mesangialzellen einen antiproliferativen Effekt zeigte, war in Rescue-Mesangialzellen die Wirkung signifikant erniedrigt. Demzufolge kann von einer Involvierung der cGKI an der antiproliferativen Wirkung in Mesangialzellen ausgegangen werden.

Die Rolle von cGMP/cGKI für die interstitielle Fibrose wurde mittels unilateraler Ureter Ligation (UUL) untersucht. Im kortikalen Interstitium wurden beide Isoformen schwach detektiert, während im medullären nur die  $\alpha$ -Isoform auffallend stark immunhistochemisch nachweisbar war. Bereits dieses Expressionsmuster implizierte, dass cGKI $\alpha$  im Interstitium vermutlich mehr Funktionen ausübt als cGKI $\beta$ . Diese funktionelle Differenzierung der beiden Isoformen wurde mehrfach bestätigt:

Sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene war die cGKI $\alpha$ -Expression stärker fibrosebedingt hoch reguliert als die der  $\beta$ -Isoform. Hierbei wurde immunhistochemisch gezeigt, dass die Expressionszunahme der  $\alpha$ -Isoform primär im kortikalen Interstitium vorzufinden war. Zudem wurden die mRNA-Mengen der  $\alpha$ -Isoform nach YC1- bzw. ISDN-Gabe signifikant verändert, dagegen blieben die der  $\beta$ -Isoform nahezu unbeeinträchtigt. Demzufolge wurden die detektierten, antifibrotischen YC1- bzw. ISDN-Effekte wahrscheinlich primär durch die  $\alpha$ -Isoform und nicht durch die  $\beta$ -Isoform vermittelt. Die durch YC1 bzw. ISDN induzierte Wirkung äußerte sich einerseits in der Abnahme der mRNA für die Fibrose-Marker TGF/FSP und andererseits makroskopisch, indem ein größerer Bereich der Medulla erkennbar war als bei den unbehandelten Mäusen.

Weiter zeigten die Untersuchungen der Rescue-Mäuse, dass der protektive Effekt von cGMP unter anderem über cGKI vermittelt wurde: Während ohne ISDN Behandlung der Fibrose-Verlauf in WT- und Rescue-Tieren annähernd gleich fortgeschritten war, blieb nach Verabreichung des NO-Donors der zuvor in WT detektierte protektive Effekt in den

Rescues nahezu aus. Dies lässt die Annahme zu, dass die antifibrotische Wirkung von NO/cGMP durch cGKI vermittelt wird.

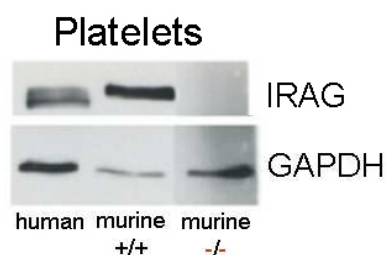
Ein weiterer Ansatzpunkt war, die von cGKI initiierte Signalkaskade zu untersuchen. Häufig diskutiert wird bei antiproliferativen Prozessen das cGKI $\alpha$  Substrat RhoA und dessen Kinase ROCK. Auf mRNA-Ebene konnte für RhoA/ROCK nach ISDN-Gabe eine signifikante Abnahme gezeigt werden, die jedoch bei den Rescues unterblieb. Somit lässt sich zusammenfassen, dass cGKI an den antifibrotischen Effekten von NO/cGMP involviert ist, vermutlich indem cGKI die profibrotische RhoA/ROCK Signalkaskade hemmt.

Auf diesen Voruntersuchungen aufbauend, wäre es wünschenswert, Ansätze bei der Therapie renaler Erkrankungen, die häufig in eine Fibrose übergehen, entwickeln zu können. Denkbar wäre es sGC-Aktivatoren oder spezifische cGKI-Aktivatoren zu testen.

## 9. Ergebnisse Thrombozyten

### 9.1 NO/cGMP-abhängige Hemmung der Aggregation und Sekretion mittels IRAG

Wie bereits von Antl et al gezeigt, ist für die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation die Interaktion von IRAG mit dem IP<sub>3</sub>RI essentiell (4). Die hierfür verwendeten IRAG $\Delta$ 12-Mausmutanten exprimieren noch ein verkürztes Proteinfragment von IRAG, das nur die Bindung zu cGKI $\beta$ , jedoch nicht zu IP<sub>3</sub>RI zulässt (4). Folglich könnte der Unterschied zwischen IRAG $\Delta$ 12 Thrombozyten und WT Thrombozyten nicht allein auf die fehlende IRAG - IP<sub>3</sub>RI Interaktion zurückzuführen sein, sondern darauf, dass cGKI $\beta$  - an das Fragment gebunden - anderen Signalwegen nicht mehr zur Verfügung steht. Um dies überprüfen zu können, wurde die Bedeutung von IRAG für die Thrombozytenaggregation mit Hilfe von IRAG-KO Thrombozyten analysiert. Anhand von Western-Blots konnte die Deletion des IRAG Proteins in den Thrombozyten



bestätigt werden. Der Mechanismus für die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Granulasekretion, ist bisher noch ungeklärt. Auch die Rolle von IRAG wurde hierfür noch nicht analysiert. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob IRAG die Granulasekretion in Thrombozyten beeinflusst.

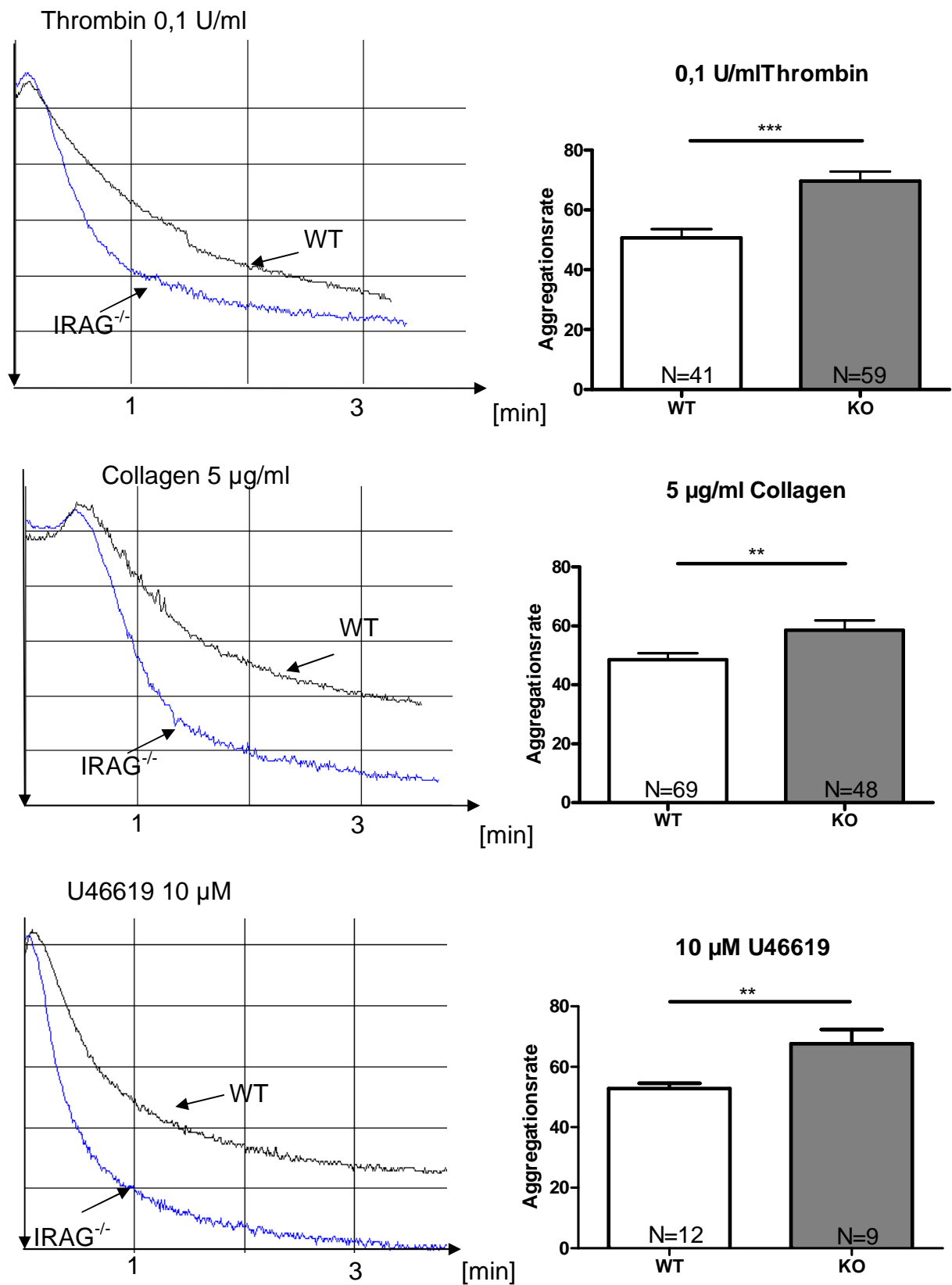
**Abb. 34: Western-Blot, der die Deletion des IRAG Proteins zeigt.**  
Verwendet wurden je 50  $\mu$ g Protein, sowie GAPDH als Ladungskontrolle.

#### 9.1.1 Rolle von IRAG für die Hemmung der Aggregation und der ATP-Sekretion aus „dense“ Granula

##### Aggregation

Die Aggregation selbst wurde im Aggregometer (Chronolog), sowie im Luminoaggregometer (Chronolog) parallel zur ATP-Sekretion vermessen. Gemäß Protokoll (siehe 2.11.1) erfolgte die Isolation und Aufarbeitung der Thrombozyten. Dabei fiel auf, dass die IRAG-KO-Mäuse tendenziell 20 % mehr Thrombozyten besaßen als die WT. Die Thrombozytenkonzentrationen im Blut waren jedoch sehr unterschiedlich, so dass auf eine statistische Darstellung verzichtet wurde. Deshalb wurde bei den einzelnen Versuchen besonders darauf geachtet - durch entsprechende Verdünnung - gleiche Konzentrationen von WT- und IRAG-KO Thrombozyten einzusetzen. Für die Induktion der Thrombozytenaggregation wurden verschiedenen Agonisten verwendet, die sich unter anderem in ihrer Potenz und ihren Rezeptoren unterscheiden. Trotz gleicher Thrombozytenkonzentrationen wiesen die IRAG-KO Thrombozyten nach Zugabe des jeweiligen Agonisten eine im Vergleich zu WT Thrombozyten erhöhte

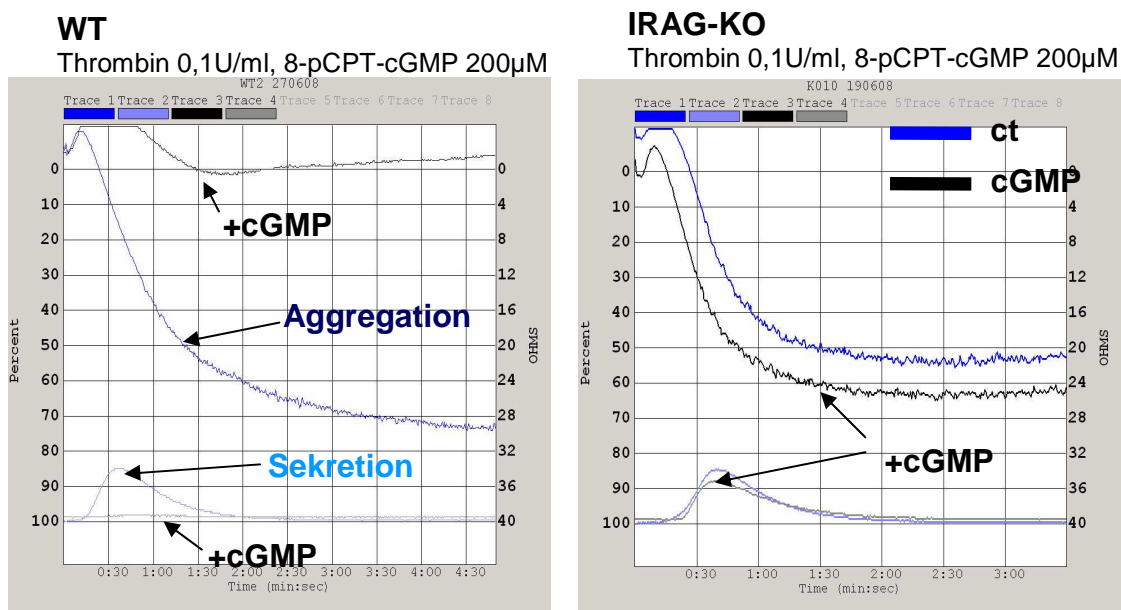
Aggregabilität auf, nämlich für Thrombin 32 %, für Collagen 17 % und für das Thromboxan-Analogon U46619 22 % (siehe Abb. 35).



**Abb. 35: Darstellung der erhöhten Aggregabilität der IRAG-KO Thrombozyten im Vergleich zu den WT Thrombozyten nach Stimulierung mit Thrombin (0,1 U/ml), Collagen (5 µg/ml) oder U46619 (10 µM).**



Als Inhibitoren der Thrombozytenaggregation - durch Aktivierung der No/cGMP Signalkaskade - wurden mehrere Substanzen verwendet zum einen die NO-Donoren SNP und DEA-NO sowie das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP. In Abb. 36 sieht man die simultane Aufzeichnung von Aggregation und ATP-Sekretion, die mit einem Luminoaggregometer analysiert wurde. Vorerst soll nur die Aggregation, dessen Verlauf die beiden oberen Kurven darstellen, betrachtet werden. Ein zuverlässiger und aussagekräftiger Parameter für die Aggregation stellt die maximale Steigung der Kurve dar, weswegen sie als Maß zur Berechnung der maximalen Aggregationsrate verwendet wurde. Da zwei Messkanäle zur Verfügung standen, konnte parallel die Aggregation mit und ohne Zugabe von cGMP gemessen werden. Die Abb. 36 zeigt die durch cGMP (200  $\mu$ M, 10 min vorinkubiert) induzierte Hemmung der Aggregation in WT Thrombozyten im Vergleich zur Kontrolle ohne cGMP. Dagegen in den IRAG-KO Thrombozyten war die Hemmung mit cGMP weitgehend aufgehoben (Abb. 36).



**Abb. 36: Detektion der Aggregation.** Es ist die simultane Aufnahme der ATP-Sekretion und der Aggregation in einem Luminoaggregometer dargestellt. Die linke y-Achse dient der Aggregation (prozentuale Zunahme), die rechte der ATP-Sekretion. Auf der linken Seite ist der Kurvenverlauf der WT Thrombozyten und auf der rechten der der IRAG-KO Thrombozyten dargestellt. Die Kontrolle zeigt die Aggregation (dunkelblaue Kurve) bzw. ATP-Sekretion (hellblaue Kurve) nach Stimulierung mit Thrombin (0,1 U/ml). Parallel dazu wurde die Aggregation (schwarze Kurve) und ATP-Sekretion (grau) nach Vorinkubation mit dem Inhibitor (8-pCPT-cGMP, 200  $\mu$ M) aufgezeichnet.

Für die statistische Auswertung wurde die maximale Aggregationsrate der Kontrollen - jeweils ohne Inhibitor - gleich 100% gesetzt und als Bezugspunkt für die Messwerte mit Inhibitor gewählt.

Tab. 22 vergleicht die Aggregationsrate von WT Thrombozyten mit der von IRAG-KO Thrombozyten. Während durch das cGMP-Analogon bzw. durch unterschiedliche NO-Donoren die Aggregation der WT Thrombozyten stark gehemmt werden konnte, war in IRAG defizienten Thrombozyten die Aggregation nur geringfügig beeinträchtigt. Vor allem die cGMP induzierte Hemmung der Aggregation war auf IRAG angewiesen.

<b>Thrombin</b> [0,1 U/ml bzw. 0,024 U/ml]	<b>WT (Mittelwert)</b> [Kontrolle = 100 %]	<b>IRAG-KO (Mittelwert)</b> [Kontrolle = 100 %]
200 µM <b>8-pCPT-cGMP</b> [0,1 U/ml Thrombin]	16,1 % ± 3,3	90,7 % ± 4,1
2,5 µM <b>SNP</b> [0,024 U/ml]	35,4 % ± 7,6	88,0 % ± 4
40 µM <b>DEA-NO</b> [0,1 U/ml]	31,2 % ± 2,3	65,7 % ± 11,2
<b>Collagen</b> [5 µg/ml bzw. 2 µg/ml]	<b>WT (Mittelwert)</b> [Kontrolle = 100 %]	<b>IRAG-KO (Mittelwert)</b> [Kontrolle = 100 %]
200 µM <b>8-pCPT-cGMP</b> [5 µg/ml Collagen]	35,2 % ± 3,2	96,4 % ± 2,8
2,5 µM <b>SNP</b> [2 µg/ml]	25,4 % ± 5,7	68,0 % ± 9,0
40 µM <b>DEA-NO</b> [5 µg/ml]	20,0 % ± 1,2	65,5 % ± 5,2
<b>U46619</b> [10 µM]	<b>WT (Mittelwert)</b> [Kontrolle = 100 %]	<b>IRAG-KO (Mittelwert)</b> [Kontrolle = 100 %]
50 µM <b>8-pCPT-cGMP</b>	14,0 % ± 3,6	89,0 % ± 5,2
2,5 µM <b>SNP</b>	64,0 % ± 4,0	103,4 % ± 3,4
0,1 µM <b>DEA-NO</b>	60,8 % ± 8,5	96,3 % ± 8,2

**Tab. 22: Vergleich der Aggregationsrate [in%] zwischen WT- und IRAG-KO Thrombozyten.** Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Kontrolle, deren Aggregation gleich 100 % gesetzt wurde. Induziert wurde die Aggregation durch verschiedene Agonisten wie Thrombin (0,024 U/ml bzw. 0,1 U/ml), Collagen (2 µg/ml bzw. 5 µg/ml) und das TXA<sub>2</sub>-Analogon U46619 (10 µM). Als Inhibitoren wurden die NO-Donoren SNP (2,5 µM) bzw. DEA-NO (0,1 µM bzw. 40 µM) oder das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP (200 µM) verwendet.

Um die Effekte der verschiedenen Inhibitoren besser vergleichen zu können, wurden deren IC<sub>50</sub> (Inhibitor Concentration) Werte anhand einer Dosis–Wirkungskurve ermittelt. Der IC<sub>50</sub> Wert gibt die Inhibitor-Konzentration an, bei der die Aggregation zu 50 % (Kontrolle, d.h. ohne Inhibitor = 100 % Aggregation) gehemmt ist. In der nachfolgenden Tab. 23 sind die IC<sub>50</sub> Werte der Inhibitoren 8-pCPT-cGMP, SNP und DEA-NO für die einzelnen Agonisten in WT- und IRAG-KO Thrombozyten aufgeführt.

	<b>Thrombin</b> [0,1 U/ml]	<b>Collagen</b> [5 µg/ml]	<b>U46619</b> [10 µM]
<b>8-pCPT-cGMP</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>
IC <sub>50</sub> [µM]	136,9 ± 6,6	104,8 ± 11,1	5,2 ± 2,5
	<b>IRAG-KO</b>	<b>IRAG-KO</b>	<b>IRAG-KO</b>
IC <sub>50</sub> [µM]	1205 ± 36,0	959 ± 105,8	191 ± 12,7
<b>SNP</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>
IC <sub>50</sub> [µM]	29,8 ± 12,5	19,5 ± 10,7	1,0 ± 0,1
	<b>IRAG-KO</b>	<b>IRAG-KO</b>	<b>IRAG-KO</b>
IC <sub>50</sub> [µM]	113,5 ± 20,5	63,5 ± 25,5	21,7 ± 6,9
<b>DEA-NO</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>
IC <sub>50</sub> [µM]	36,2 ± 10,5	15,8 ± 4,5	0,7 ± 0,3
	<b>IRAG-KO</b>	<b>IRAG-KO</b>	<b>IRAG-KO</b>
IC <sub>50</sub> [µM]	75,0 ± 32,1	66,2 ± 27,7	16,1 ± 1,0

**Tab. 23: Zusammenfassung der IC<sub>50</sub> Werte für die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch 8-pCPT-cGMP, SNP bzw. DEA-NO im Vergleich WT- mit IRAG-KO Thrombozyten.** Die Dosis-Wirkungskurve der Inhibitoren wurde für Thrombin (0,1 U/ml), Collagen (5 µg/ml) und U46619 (10 µM) bestimmt.

Wie bereits erwähnt detektiert das Luminoaggregometer simultan zur Aggregation auch die Sekretion, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

### Sekretion

Thrombozyten besitzen „alpha“ Granula, „dense“ (elektronendichte) Granula und Lysosomen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion der „alpha“ und „dense“ Granula analysiert. Der Sekretionsprozess beider Granulatypen zeigt zwar Parallelen, trotzdem werden sie nicht identisch reguliert. Deshalb wurde die Rolle von IRAG sowohl für die Sekretion der „dense“ Granula, wofür als Marker ATP diente, als auch für die Sekretion der „alpha“ Granula mit P-Selektin als Indikator untersucht.

### ATP-Sekretion aus „dense“ Granula

Zur Quantifizierung der sezernierten ATP-Menge wurde die Lumineszenzmethode verwendet. Sie beruht darauf, dass das Glühwürmchenenzym Luciferase (neben Sauerstoff und Magnesiumionen) ATP benötigt um Luciferin umzusetzen. Das dabei emittierte gelb-grüne Licht mit einem Emissionsmaximum von 562 nm wurde mit dem zur Verfügung stehenden Luminoaggregometer (Chronolog) detektiert. Da die Thrombozyten weder Luciferin noch Luciferase besitzen, mussten diese jeweils mit dem Luciferin-Luciferase enthaltenden Reagenz vorinkubiert werden. Vor jedem Versuch wurde - unter Berücksichtigung der Eigenabsorption der jeweiligen Thrombozytenlösung - die Messung durch die Zugabe einer definierten ATP-Menge standardisiert. Der Vorteil des Luminoaggregometers bestand darin, dass simultan zur Aggregation auch die Sekretion aufgezeichnet wurde. Folglich erhielt man gleichzeitig eine Aussage über die zeitliche Kinetik der Aggregation und ATP-Sekretion. In Abb. 36 spiegeln die beiden unteren Kurven den Sekretionsverlauf wieder. Man sieht, dass cGMP nicht nur die Aggregation, sondern auch die ATP-Sekretion der WT Thrombozyten hemmt. Im Gegensatz dazu ist die Sekretion der IRAG-KO Thrombozyten trotz cGMP nur schwach beeinträchtigt.

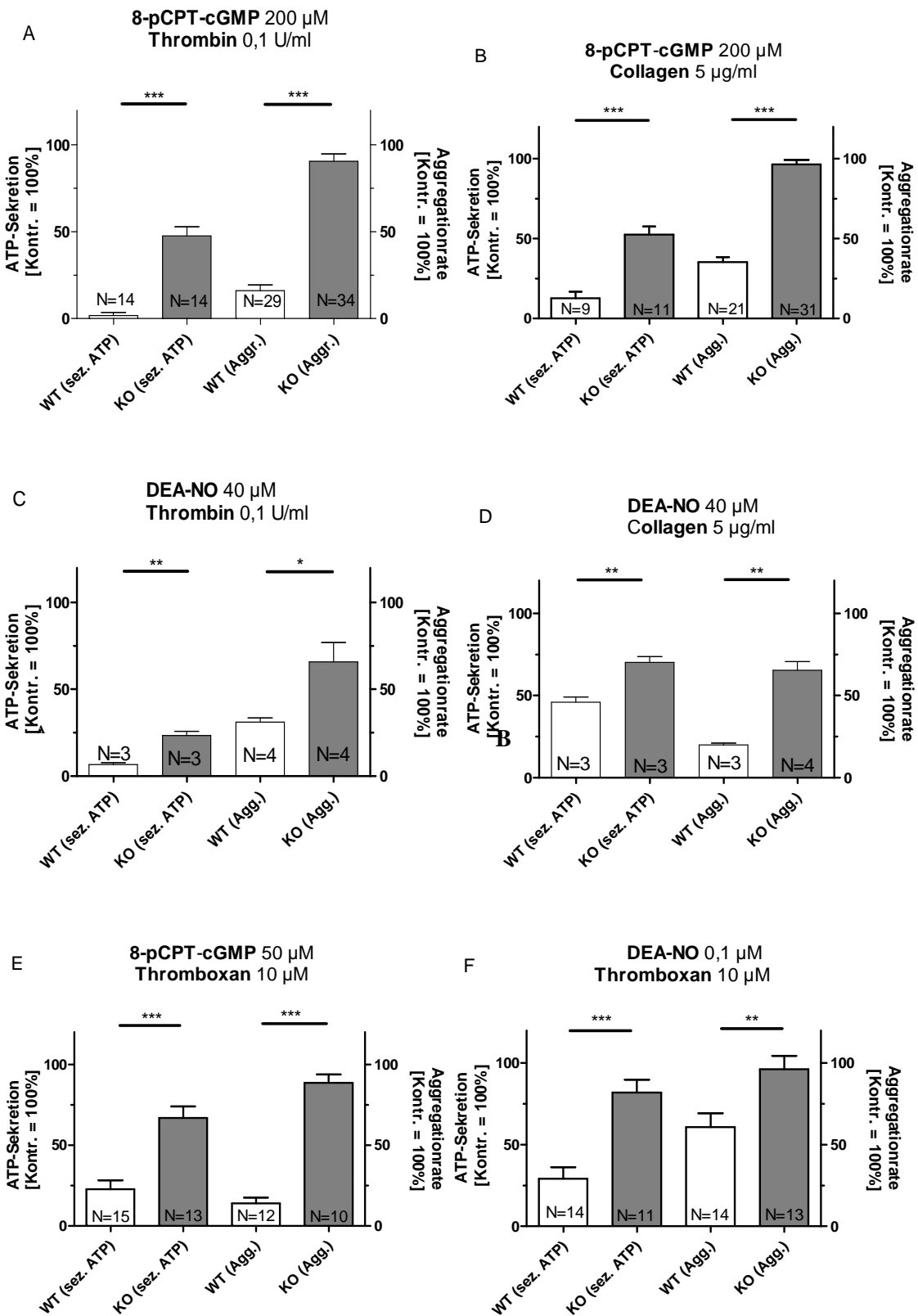
In Tab. 24 wird die gemessene ATP-Sekretion der WT- und IRAG-KO Thrombozyten mit bzw. ohne Inhibitor gegenübergestellt. Die deutlich unterschiedlich ausgeprägte Hemmung der ATP-Sekretion in WT- bzw. IRAG-KO Thrombozyten, weist auf die relevante Funktion von IRAG für die Unterdrückung der ATP-Sekretion hin.

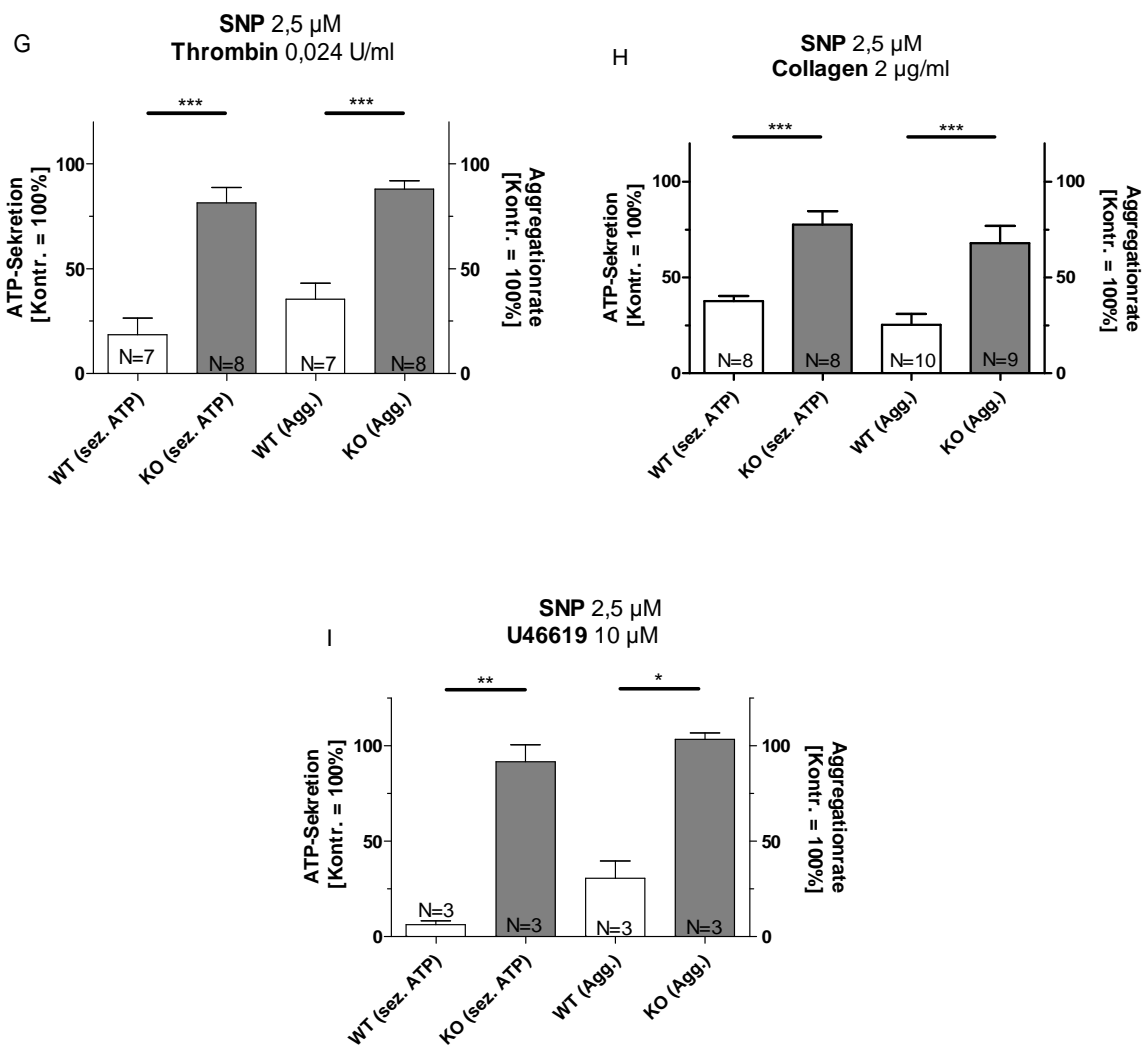
<b>Thrombin</b>	<b>WT (Mittelwert)</b>	<b>IRAG-KO (Mittelwert)</b>
[0,1 U/ml bzw. 0,024 U/ml]	[Kontrolle = 100 %]	[Kontrolle = 100 %]
200 $\mu$ M <b>8-pCPT-cGMP</b>	1,8 % $\pm$ 1,8	47,6 % $\pm$ 5,4
[0,1 U/ml Thrombin]		
2,5 $\mu$ M <b>SNP</b> [0,024 U/ml]	18,6 % $\pm$ 7,9	81,4 % $\pm$ 7,4
40 $\mu$ M <b>DEA-NO</b> [0,1 U/ml]	6,7 % $\pm$ 1,0	23,5 % $\pm$ 2,4
<b>Collagen</b>	<b>WT (Mittelwert)</b>	<b>IRAG-KO (Mittelwert)</b>
[5 $\mu$ g/ml bzw. 2 $\mu$ g/ml]	[Kontrolle = 100 %]	[Kontrolle = 100 %]
200 $\mu$ M <b>8-pCPT-cGMP</b>	12,8 % $\pm$ 4,0	52,5 % $\pm$ 5,2
[5 $\mu$ g/ml Collagen]		
2,5 $\mu$ M <b>SNP</b> [2 $\mu$ g/ml]	37,7 % $\pm$ 3,0	77,7 % $\pm$ 7,1
40 $\mu$ M <b>DEA-NO</b> [5 $\mu$ g/ml]	45,9 % $\pm$ 3,2	70,1 % $\pm$ 3,5
<b>U46619</b>	<b>WT (Mittelwert)</b>	<b>IRAG-KO (Mittelwert)</b>
[10 $\mu$ M]	[Kontrolle = 100 %]	[Kontrolle = 100 %]
50 $\mu$ M <b>8-pCPT-cGMP</b>	22,9 % $\pm$ 5,4	67,0 % $\pm$ 7,1
2,5 $\mu$ M <b>SNP</b>	6,3 % $\pm$ 1,9	91,8 % $\pm$ 8,8
0,1 $\mu$ M <b>DEA-NO</b>	29,2 % $\pm$ 7,1	81,9 % $\pm$ 7,9

**Tab. 24: Vergleich der Hemmung der ATP-Sekretion von WT Thrombozyten mit der von IRAG-KO Thrombozyten.** Die prozentual stattfindende ATP-Sekretion wurde auf die Kontrolle bezogen, deren Sekretion gleich 100 % gesetzt wurde. Induziert wurde die Sekretion durch verschiedene Agonisten wie Thrombin (0,1 U/ml), Collagen (2  $\mu$ g/ml bzw. 5  $\mu$ g/ml) und U46619 (10  $\mu$ M). Als Inhibitoren wurden NO-Donoren SNP (2,5  $\mu$ M) bzw. DEA-NO (0,1  $\mu$ M bzw. 40  $\mu$ M) oder das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP (50  $\mu$ M bzw. 200  $\mu$ M) verwendet.

Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen orientierten sich an den jeweiligen IC<sub>50</sub> Werten. Nachdem die IC<sub>50</sub> Werte der Inhibitoren für Thrombin und Collagen vergleichbar waren (siehe Tab. 23), wurde für beide Agonisten auch die gleiche 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M) bzw. DEA-NO (40  $\mu$ M) Konzentration eingesetzt (siehe Abb. 37 A-D). Dagegen wies das Thromboxan – Analogon U46619 eine wesentlich höhere Sensitivität für die Inhibitoren auf als Thrombin und Collagen (siehe Tab. 23). Deswegen reichten für deren Hemmung niedrigere cGMP (50  $\mu$ M) bzw. DEA-NO (0,1  $\mu$ M) Konzentrationen aus (siehe Abb. 37 E/F). Die Diagramme G-I (siehe Abb. 37) vergleichen die Aggregation/Sekretion der drei Agonisten unter Verwendung der gleichen SNP (2,5  $\mu$ M) Konzentration. In der Annahme, dass auch für SNP U46619 wesentlich sensitiver ist,

wurde Thrombin (0,024 U/ml) und Collagen (2 µg/ml) in einer niedrigeren Konzentration eingesetzt, um ein vergleichbares Ausmaß an Hemmung zu induzieren.





**Abb. 37: Statistische Darstellung der ATP-Sekretion und Aggregation.** Im Säulendiagramm zeigen die beiden linken Balken die ATP-Sekretion und die beiden rechten Balken die maximale Aggregationsrate jeweils im Vergleich WT- und IRAG-KO Thrombozyten. Die trotz Inhibitor prozentual stattfindende ATP-Sekretion bzw. Aggregation wurde jeweils auf die Kontrolle ohne Inhibitor bezogen und gleich 100 % gesetzt. Getestet wurden die verschiedenen Agonisten Thrombin (0,1 U/ml bzw. 0,024 U/ml), U46619 (10  $\mu$ M) und Collagen (5  $\mu$ g/ml bzw. 2  $\mu$ g/ml). Als Inhibitoren wurden die NO-Donoren SNP (2,5  $\mu$ M, 2 min vorinkubiert) bzw. DEA-NO (40  $\mu$ M bzw. 0,1  $\mu$ M, 1 min vorinkubiert) und das cGMP-Analogen 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M, 10 min vorinkubiert) verwendet.

### 9.1.2 Rolle von IRAG für die Hemmung der P-Selektin-Sekretion aus „alpha“ Granula und der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung

Die für die Aggregation entscheidende Fibrinogenbindung findet erst nach Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors statt. Mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) und dem entsprechenden Antikörper (JON/A, Emfret, Würzburg), der die aktive GPIIb/IIIa

Konformation erkennt, kann die Rezeptoraktivierung detektiert werden (siehe 2.11.2.2). Wie beim Luminoaggregometer können auch beim FACS – hier durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz markierter Antikörper – simultan mehrere Prozesse betrachtet werden. Deswegen wurde parallel zur GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung (PE markierter JON/A-AK) die P-Selektin-Sekretion aus den Granula (FITC markierter CD62P-AK) untersucht, was im nächsten Abschnitt gezeigt wird.

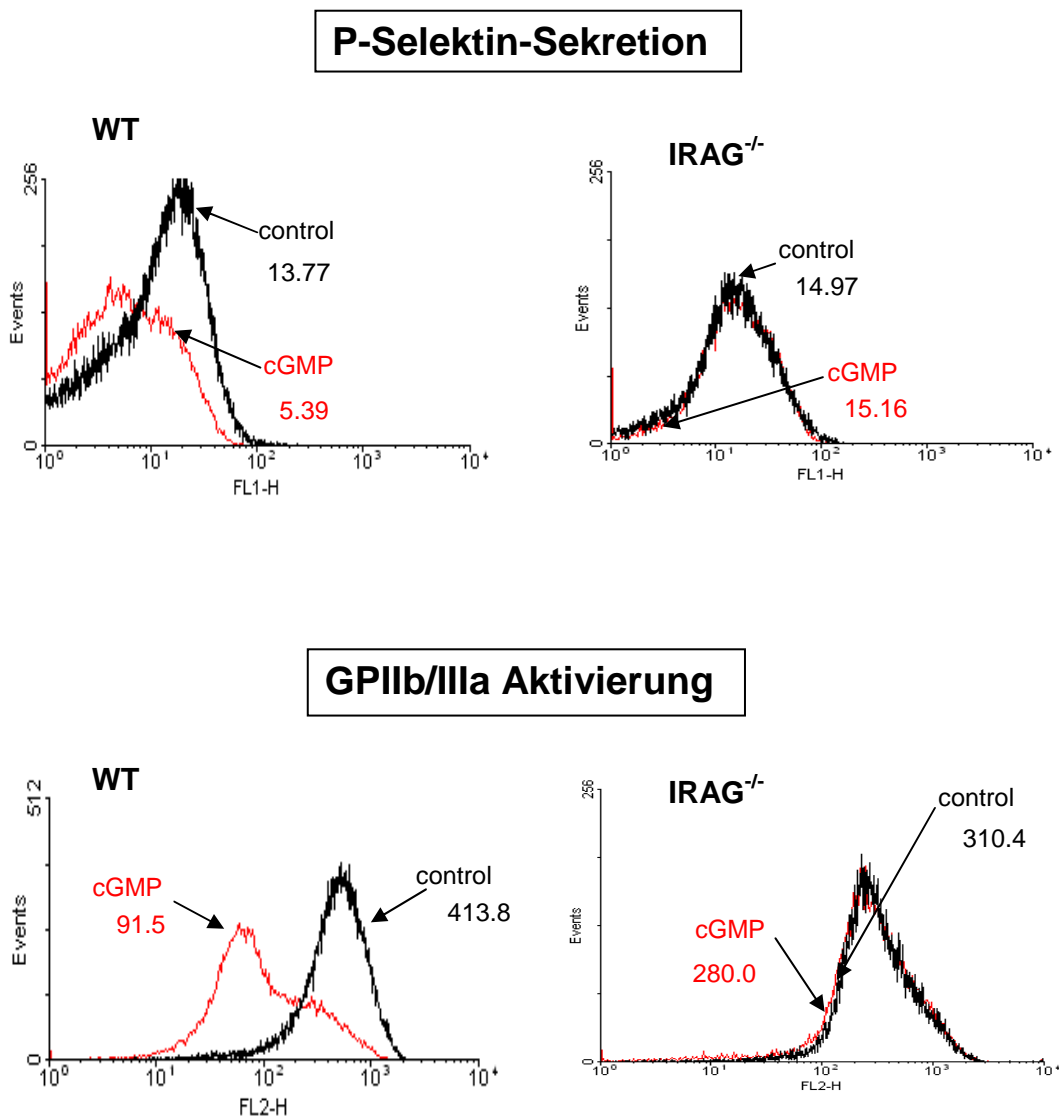
Die FACS-Analyse erlaubt, eine genaue Aussage über die Änderung der Expression thrombozytärer Oberflächenrezeptoren zu treffen. Nach Aktivierung der Thrombozyten nimmt die Oberflächendichte der aktivierten Glycoproteine durch die erhöhte Expression zu. Folglich spiegelt die Antikörperbindung die Anzahl thrombozytärer Glycoproteine und somit den Aktivierungszustand der Plättchen wieder.

#### P-Selektin-Sekretion aus „alpha“ Granula

Nach Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin wird P-Selektin (CD62P) verstärkt aus den „alpha“ Granula sezerniert und dadurch auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Somit kann auch P-Selektin bzw. die Anzahl CD62P positiver Zellen als Marker für die Plättchenaktivierung verwendet werden, die mittels Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence activated cell sorting) simultan mit der für die Thrombozytenaggregation entscheidenden GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung gemessen wurde (siehe 2.11.2.2).

Um den Einfluss von IRAG auf die GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung und die P-Selektin-Sekretion zu untersuchen wurden, WT- und IRAG-KO Thrombozyten verwendet. Nach Vorinkubation mit 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M, 10 min, RT) bzw. DEA-NO (0,1  $\mu$ M, 1 min, RT) wurden die Thrombozyten mit Thrombin (0,1 U/ml) stimuliert und gleichzeitig mit den FITC (P-Selektin) bzw. PE (GPIIb/IIIa Aktivierung) markierten Antikörpern behandelt (siehe 2.11.2.2). Man erkennt in Abb. 38 in WT Thrombozyten mit cGMP eine Abnahme der Fluoreszenzintensität sowohl bei der P-Selektin-Sekretion (FITC) als auch bei der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung (PE). Die Fluoreszenzintensität wiederum spiegelt die Anzahl der Fluoreszenz markierten Thrombozyten wider. Durch NO bzw. cGMP wird die Anzahl FITC (P-Selektin) bzw. PE (GPIIb/IIIa Aktivierung) positiver Thrombozyten in WT, jedoch nur schwach in IRAG defizienten Thrombozyten reduziert (Abb. 38, Tab. 25, Tab. 26). Hingegen wurde mit dem cAMP-Analagon cBIMPS die GPIIb/IIIa Aktivierung und P-Selektin-Sekretion in WT- und IRAG-KO Thrombozyten gleich stark beeinträchtigt (Abb. 40).





**Abb. 38: FACS-Analyse der P-Selektin-Sekretion und der GPIIb/IIIa Aktivierung.** Dargestellt ist ein Histogramm (Einparameterdarstellung), in dem alle Ereignisse nach der Stärke ihres Signals (Fluoreszenzintensität) in einer Verteilungskurve dargestellt wurden. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität doppelt logarithmisch gegen die Ereignisse („events“) aufgetragen. Die P-Selektin-Sekretion misst das Zytometer im FL1 Kanal (FITC, 525 nm), die GPIIb/IIIa Aktivierung im FL-2 Kanal (PE, 575 nm). Vergleich zwischen WT- und IRAG-KO Thrombozyten der FITC bzw. PE Fluoreszenzintensität nach Vorinkubation mit 8-p-CPT-cGMP (200  $\mu$ M, 10 min, RT) und Stimulierung mit Thrombin (0,1 U/ml).

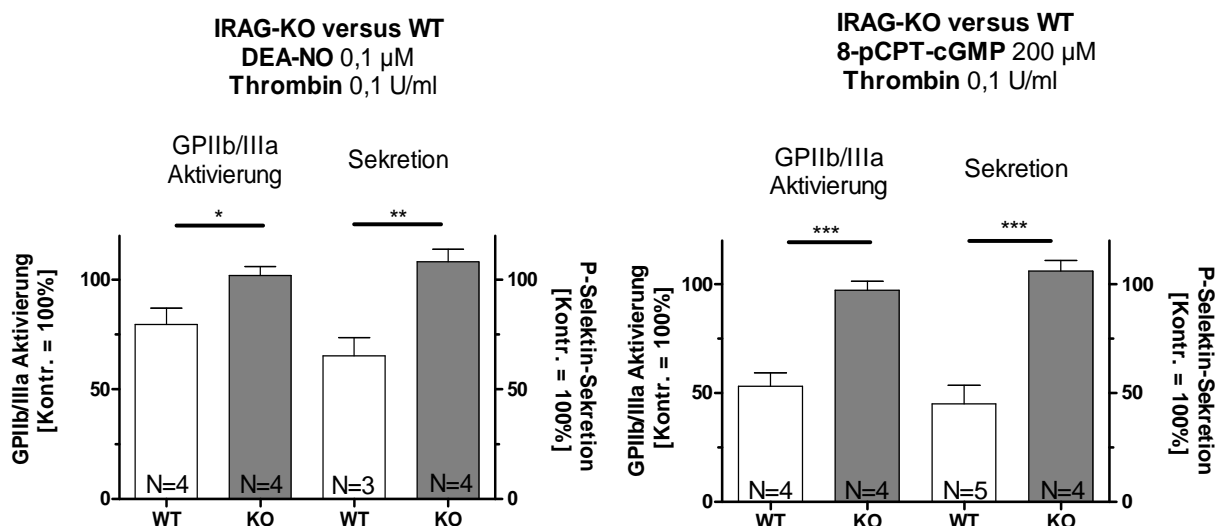
Für die Darstellung, Auswertung und Kompensation der Ergebnisse siehe 2.11.2.3.

Thrombin [0,1U/ml]	WT (Mittelwert) [Kontrolle = 100 % Sekretion]	IRAG-KO (Mittelwert) [Kontrolle = 100 % Sekretion]
200 $\mu$ M 8-pCPT-cGMP	45 % $\pm$ 8,5	106 % $\pm$ 5,0
0,1 $\mu$ M DEA-NO	65 % $\pm$ 8,4	108 % $\pm$ 5,7

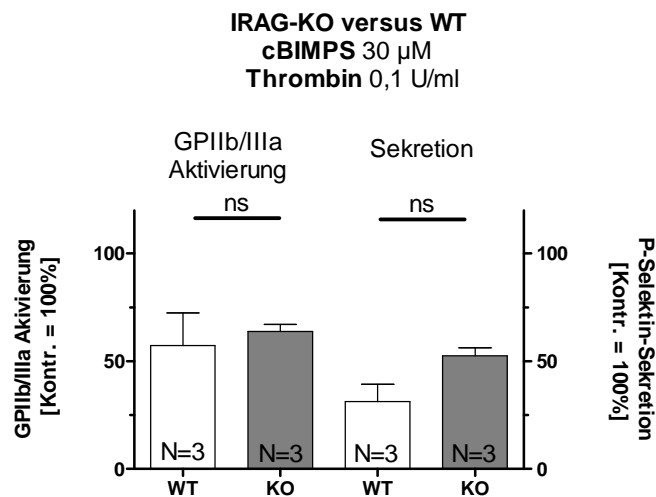
**Tab. 25: FACS-Analyse der Hemmung der P-Selektin-Sekretion.** Inhibitoren: 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M) bzw. DEA-NO (0,1  $\mu$ M). Vergleich zwischen WT- und IRAG-KO Thrombozyten.

Thrombin [0,1U/ml]	WT (Mittelwert) [Kontrolle = 100 % GPIIb/IIIa Aktivierung]	IRAG-KO (Mittelwert) [Kontrolle = 100 % GPIIb/IIIa Aktivierung]
200 $\mu$ M 8-pCPT-cGMP	53 % $\pm$ 6,0	97 % $\pm$ 4,2
0,1 $\mu$ M DEA-NO	80 % $\pm$ 7,5	102 % $\pm$ 4,0

**Tab. 26: FACS-Analyse der Hemmung der GPIIb/IIIa Aktivierung.** Inhibitoren: 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M) bzw. DEA-NO (0,1  $\mu$ M). Vergleich zwischen WT- und IRAG-KO Thrombozyten.



**Abb. 39: Statistische Darstellung der Hemmung der GPIIb/IIIa Aktivierung und der P-Selektin-Sekretion.** Im Säulendiagramm zeigen die beiden linken Balken die GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung und die beiden rechten Balken die Sekretion von P-Selektin jeweils im Vergleich WT und IRAG-KO. Die in Gegenwart des Inhibitors prozentual stattfindende GPIIb/IIIa Aktivierung bzw. P-Selektin-Sekretion wurde jeweils auf die Kontrolle ohne Inhibitor (= 100 %) bezogen. Als Agonist wurde Thrombin (0,1 U/ml) und als Inhibitor DEA-NO (0,1  $\mu$ M, 1 min vorinkubiert) bzw. das cGMP-Analogon 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M, 10 min vorinkubiert) verwendet.



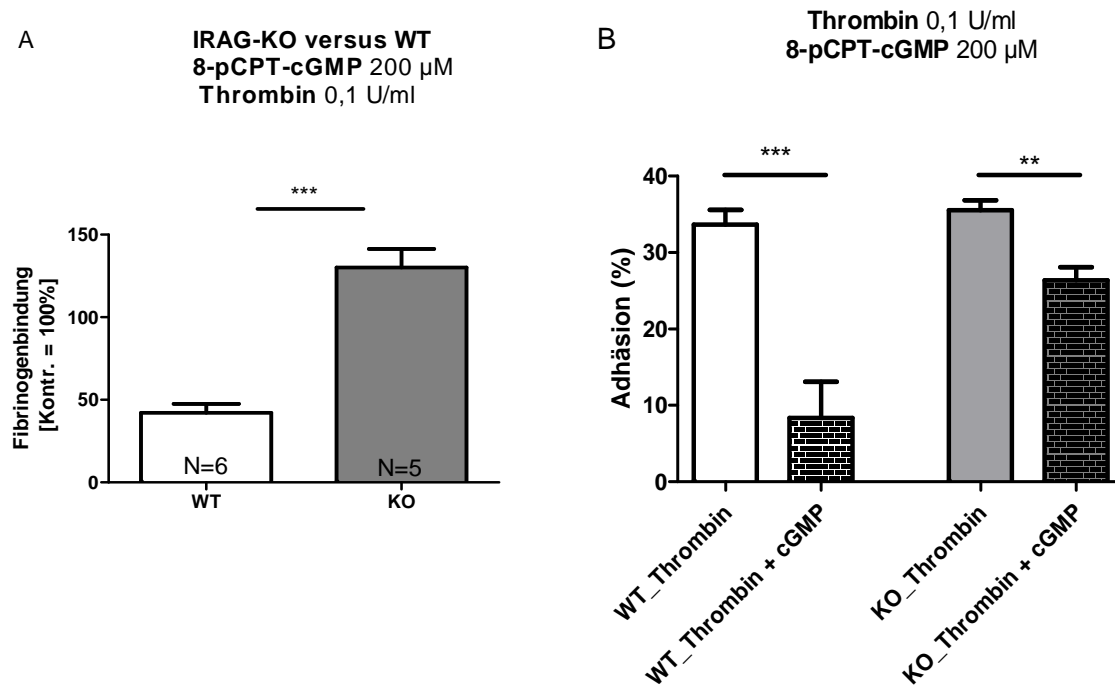
**Abb. 40: Vergleich der GPIIb/IIIa Aktivierung und P-Selektin-Sekretion mit dem cAMP-Analogen cBIMPS als Inhibitor.** Im Säulendiagramm zeigen die beiden linken Balken die GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung und die beiden rechten Balken die Sekretion von P-Selektin jeweils im Vergleich WT und IRAG-KO. Als Agonist wurde Thrombin (0,1 U/ml) und als Inhibitor das cAMP-Analogen cBIMPS (30  $\mu$ M, 10 min vorinkubiert) verwendet.

## 9.2 NO/cGMP-abhängige Hemmung der Adhäsion an Fibrinogen mittels IRAG

Zusätzlich wurde die Fibrinogenbindung an den aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptor mittels Alexa<sup>TM</sup>488 - markiertem humanen Fibrinogenkonjugat im FACS detektiert. Konform mit der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung war auch die Fibrinogenbindung bei den IRAG-KO Thrombozyten durch cGMP nur schwach gehemmt (Abb. 41 A).

Die Bindung von Fibrinogen an GPIIb/IIIa spielt nicht nur für die Aggregation, sondern auch für die Adhäsion eine wichtige Rolle. Deshalb wurde zudem die Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen beschichtete Loch microtiter Platten durch Messung der Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt (siehe Kap. 2.11.3). Das Enzym wird weder sezerniert noch ist dessen Aktivität abhängig vom Stimulierungszustand der Thrombozyten, weswegen es sich ideal für die Quantifizierung eignet. Die gewaschenen murinen Thrombozyten ( $4 \times 10^6$ /ml) adhärten nach Zugabe von Thrombin (0,1 U/ml) an die Fibrinogen beschichteten Loch microtiter Platten. Die durch den Stimulus bedingte Zunahme der Adhäsion ließ sich aus der Differenz zwischen stimulierten und unstimulierten adhärenen Thrombozyten berechnen. Die mittels Thrombin induzierte Adhäsion war in WT- (34 %  $\pm$ 1,9;  $p = 0,0004$ ,  $n = 7$ ) und IRAG-KO (36 %  $\pm$ 1,3;  $p < 0,0001$ ,  $n=7$ ) Thrombozyten annähernd gleich (Abb. 41 B). Durch cGMP (8-pCPT-cGMP, 200  $\mu$ M, 10 min) konnte jedoch bei den WT Thrombozyten die Adhäsion um 75

%  $\pm 4,7$  ( $p = 0,0004$ ,  $n=7$ ) reduziert werden, dagegen bei den IRAG-KO nur um 26 %  $\pm 1,7$  ( $p = 0,0011$ ,  $n=7$ ). Folglich ist IRAG an der cGMP-abhängige Hemmung der durch Thrombin stimulierten Adhäsion an Fibrinogen involviert.



**Abb. 41: Statistische Darstellung der Hemmung der Fibrinogenbindung und der Adhäsion.**

A: Fibrinogenbindung nach Vorinkubation mit 8-pCPT-cGMP (200  $\mu$ M) von WT Thrombozyten der von IRAG defizienten Thrombozyten gegenübergestellt. B: Vergleich der Adhäsion an Fibrinogen mit bzw. ohne cGMP in WT- bzw. IRAG-KO Thrombozyten.

## 10. Diskussion Thrombozyten

### 10.1 Einfluss von IRAG auf die Hemmung der Aggregation

Zuerst wurde die Rolle von IRAG für die Thrombozytenaggregation untersucht. Nach deren Aktivierung (mit Thrombin, Collagen bzw. U46619) zeigte sich, dass die IRAG defizienten Thrombozyten „schneller“ aggregierten als die WT Thrombozyten (siehe Kap. 9.1). Dies könnte auf den in IRAG-KO Thrombozyten beeinträchtigten NO/cGMP Signalweg beruhen; denn NO fungiert als negativer „feedback“, indem es nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von Thrombozyten selbst nach deren Stimulierung freigesetzt wird (104). In diesem Zusammenhang besonders erwähnenswert ist die Arbeit von Johnson et al., in der sieben Gene detektiert wurden, deren Polymorphismen die Thrombozytenaktivität determinieren (67). Dabei wurde auch für das IRAG-Gen (als MRVI1 Gen bezeichnet) ein Polymorphismus beschrieben. Die für IRAG identifizierten SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) wurden für die nach ADP- bzw. Epinephrin-Zugabe erhöhte Thrombozytenaggregation verantwortlich gemacht (67). Interessant wäre, ob die detektierte „Hyperaggregabilität“ auf einer erniedrigten IRAG-Aktivität bzw. -Expression beruhte, was aber nicht weiter überprüft wurde.

Ebenso konnte in VASP defizienten Thrombozyten nach Thrombin Stimulierung eine im Vergleich zu WT erhöhte Thrombozytenaktivierung nachgewiesen werden, indem mittels FACS eine verstärkte Fibrinogenbindung detektiert wurde (52). Hierfür wurde jedoch die - in VASP-KO-Mäusen - vermehrt vorliegende Integrinaktivierung bzw. Bindung verantwortlich gemacht (7). Dagegen ist von cGK-KO Thrombozyten noch keine „Hyperaggregabilität“ bekannt.

Die Aggregation wurde in dieser Arbeit anhand verschiedener Agonisten analysiert, welche alle die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen. Dies lässt auf die Bedeutung von Calcium für die Aktivierung der Thrombozytenaggregation schließen. Thrombin und TXA<sub>2</sub> induzieren über Gq/PLC $\beta$  einen Calciumanstieg, während Collagen über GPVI und PLC $\gamma$ /Syk fungiert. In den IRAG $\Delta$ 12-Mäusen wurde bereits gezeigt, dass die durch NO/cGMP induzierte Hemmung der Aggregation über IRAG vermittelt wird, welches für die Inhibition der intrazellulären Calciumfreisetzung benötigt wird (4). Durch die erniedrigten Calciumkonzentrationen werden auch Calcium-abhängige Enzyme blockiert, zum Beispiel Calcium-abhängige PKC-Isoformen oder die kleine GTPase Rab1B, die wiederum für die GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung verantwortlich sind (121). Dies würde auch erklären, weshalb in den IRAG-KO Thrombozyten die Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors und die anschließende Fibrinogenbindung durch NO/cGMP nur geringfügig beeinträchtigt waren. Gleichzeitig werden beide Prozesse für den Ablauf der Aggregation vorausgesetzt. Folglich war auch die Hemmung der Aggregation in den

IRAG-KO Thrombozyten verglichen mit den WT Thrombozyten schwächer. Die IC<sub>50</sub> Werte (siehe 9.1.1, Tab. 23) geben die unterschiedlichen Konzentrationen an, die benötigt wurden, um bei WT- bzw. IRAG-KO Thrombozyten die Aggregation um 50 % zu hemmen. So mussten bei den IRAG-KO Thrombozyten ca. 10-fach höhere cGMP Konzentrationen verwendet werden, um die gleiche Hemmung wie in WT Thrombozyten zu erzielen. Bei den NO-Donoren hingegen reichten bereits ca. 2-3-fach höhere Inhibitor-Konzentrationen aus. Demnach ist der Unterschied der IC<sub>50</sub> Werte zwischen WT und IRAG-KO bei cGMP viel ausgeprägter als bei NO. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass durch NO nicht nur PKG-abhängige, sondern auch PKA-abhängige Signalwege stimuliert werden. Ein gemeinsames Substrat von PKG und PKA stellt VASP dar, dessen Phosphorylierung ebenso zur Hemmung des GPIIb/IIIa Rezeptors beiträgt, jedoch Calcium-unabhängig (7). Demzufolge ist die VASP vermittelte Hemmung in IRAG-KO Thrombozyten noch intakt und könnte ein Grund sein, weshalb die Unterschiede der IC<sub>50</sub> Werte zwischen WT und IRAG-KO bei den NO-Donoren kleiner sind als bei cGMP. In der Einleitung (siehe Kap. 1.2.2) wurde bereits die PKG - verglichen mit den PDEs bzw. CNG - als das in den Thrombozyten bevorzugte Effektorprotein von cGMP vorgestellt. Nachdem cGMP in den IRAG defizienten Thrombozyten nahezu keine Hemmung zeigte, können wahrscheinlich andere PKG-Substrate (siehe Kap.1.2.2) die Funktion von IRAG nicht übernehmen.

Des Weiteren wiesen die ermittelten IC<sub>50</sub> Werte auf eine erhöhte Sensitivität des TXA<sub>2</sub> Rezeptors gegenüber NO/cGMP hin. Verglichen mit Thrombin und Collagen, reichten für U46619 ca. 20- (bei NO-Donoren) bzw. 40-fach (bei cGMP) niedrigere Inhibitor-Konzentrationen aus. Diese erhöhte Sensitivität könnte durch die NO/PKG induzierte zusätzliche Phosphorylierung des TXA<sub>2</sub> Rezeptors zustande kommen (106,152). Um dies nachzuprüfen wurde in „steady state“ GTPase Experimenten das sog. „turnover“ von [<sup>32</sup>P] GTP in WT- und IRAG-KO Thrombozyten bestimmt. In der Tat konnte durch U46619 eine erhöhte GTPase-Aktivität detektiert werden, die durch Vorinkubation mit cGMP wieder ihr Ausgangsniveau erreichte (Daten nicht gezeigt). Dabei war kein Unterschied zwischen WT- und IRAG-KO Thrombozyten feststellbar, was im Falle von TXA<sub>2</sub> für einen zusätzlichen cGMP-abhängigen Signalweg spricht, jedoch unabhängig von IRAG.

## **10.2 Einfluss von IRAG auf die Hemmung der Sekretion**

Die Aggregation der Thrombozyten wird vom Sekretionsprozess der Thrombozytengranula begleitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sekretion der „alpha“ Granula mittels P-Selektin als Marker und die der „dense“ Granula mittels ATP als Marker untersucht.

Auch wenn sich die Mechanismen der Sekretion der beiden Granulaarten weitgehend überlappen, wurden bereits Granula-spezifische Proteine identifiziert. So soll GTPase Rab4 und das „vesicle associated membrane protein 8“ (VAMP8) nur an der Calcium induzierten „alpha“ Granula Sekretion, allerdings nicht an der „dense“ Granula Sekretion beteiligt sein (126). Dagegen wird Rab27 nur für die Regulation der „dense“ Granula Sekretion verantwortlich gemacht, jedoch nicht für die der „alpha“ Granula Sekretion (145). Auch für das PKG und PKA Substrat VASP wird nur ein Einfluss auf die Hemmung der „alpha“ Granula Sekretion beschrieben (52), dagegen nicht auf die Inhibition der „dense“ Granula Sekretion. Die beiden Granulaarten unterscheiden sich aber nicht nur in ihrem Sekretionsmechanismus, sondern auch in ihren gespeicherten Molekülen. Entsprechend ihren Eigenschaften und Funktionen enthalten die „alpha“ Granula große Adhäsions- und Hitzeproteine, wohingegen die „dense“ Granula kleinere Moleküle ohne Proteincharakter beinhalten (107). Somit dient die Sekretion der „alpha“ Granula primär der Adhäsion und die der „dense“ Granula der Rekrutierung anderer Thrombozyten (107). Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede der Granulapopulationen erschien es angebracht, die Rolle von IRAG für die Sekretion beider Granulaarten separat zu untersuchen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass IRAG die NO/cGMP induzierte Hemmung sowohl der „alpha“ als auch der „dense“ Granula Sekretion vermittelt.

Durch die Sekretion der „dense“ Granula wird die Aggregation und Sekretion zusätzlich verstärkt: Neben ATP, deren Freisetzung detektiert wurde (siehe Kap. 9.1.1), wird auch ADP sezerniert. Während ATP P2X1, einen ATP gesteuerten Calcium-Kanal stimuliert, wird durch ADP P2Y12, ein Gi gekoppelter Rezeptor aktiviert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Aktivierung Gi gekoppelter Rezeptoren für die Potenzierung der anderen Signalwege (Gq und G12/13) notwendig, wodurch erst die irreversible Aggregation ermöglicht wird (29, 123). Der an Gi gebundene Effekt wird vornehmlich bei niedrigen Konzentrationen des Stimulus bzw. bei schwachen Agonisten bemerkbar (29). Demzufolge wird durch die NO/cGMP/IRAG-abhängige Hemmung der „dense“ Granula Sekretion auch die irreversible Aggregation unterbunden.

Im Gegensatz dazu wird durch die Inhibition der „alpha“ Granula die Adhäsion beeinträchtigt, indem Adhäsionsmoleküle, wie das in dieser Arbeit untersuchte P-Selektin, nicht sezerniert werden. Der Effekt von IRAG auf die Adhäsion wird im nächsten Abschnitt explizit diskutiert.

### **10.3 Einfluss von IRAG auf die Hemmung der Adhäsion**

Wie bereits erwähnt kann sezerniertes P-Selektin wie der vWF an den GPIIb $\alpha$  Rezeptor binden und dadurch die Adhäsion begünstigen. Folglich beeinflusst IRAG die Adhäsion schon allein dadurch, dass es die Freisetzung adhäsionsfördernder Inhaltsstoffe wie des P-Selektins oder des vWFs aus den „alpha“ Granula hemmt. P-Selektin kann aber zusätzlich aus den Weibel-Palade Körpern der Endothelzellen sezerniert werden. Deshalb wurde die Rolle von IRAG für die Hemmung der Adhäsion ausführlicher analysiert. Nach Stimulierung mit Thrombin wurde die Adhäsion an Fibrinogen untersucht. Der im Rahmen der Aggregation bereits vorgestellte GPIIb/IIIa Rezeptor spielt auch für die Fibrinogen vermittelte Adhäsion eine essentielle Rolle. Die FACS Experimente zeigten, dass die Hemmung der GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung und deren Fibrinogenbindung an die Anwesenheit von IRAG gebunden sind. Deshalb konnte auch die über diesen Weg ablaufende Adhäsion an Fibrinogen durch NO/cGMP über IRAG inhibiert werden.

Korrelierende Ergebnisse waren bereits bei den IRAG $\Delta$ 12-Mäusen zu sehen: Bei diesen wurde *in vivo* die Adhäsion der mutierten Thrombozyten an das verletzte Endothel der Arteria carotis durch NO nicht gehemmt (4).

Ebenso verursacht das schon mehrfach erwähnte VASP primär die Hemmung der Adhäsion, indem die Interaktion zwischen Integrinen und Aktinfilamenten blockiert wird (67, 85).



#### **10.4 Vergleich der Hemmung der Thrombozytenaggregation versus Granulasekretion**

Im Folgenden werden noch die für die Aggregation bzw. Sekretion repräsentativen Signalwege verglichen. Dadurch kann möglicherweise auch der Mechanismus, der für die NO/cGMP/IRAG induzierte Hemmung verantwortlich ist, geklärt werden:

Eine Schlüsselrolle für den Ablauf der Aggregation nimmt das GPIIb/IIIa ein, an dessen Aktivierung small GTPase Rap1 involviert ist (24). Die Regulation von Rap1 kann zum einen Calcium-abhängig über Ca/DAG/GEFI, zum anderen Calcium-unabhängig über PKC stattfinden (24). Ca/DAG/GEFI und PKC induzierte Signalwege aktivieren also synergistisch GPIIb/IIIa. Jedoch sind potente Agonisten wie Thrombin oder Collagen auf die zusätzliche Aktivierung des Calcium-unabhängigen PKC Weges nicht angewiesen, um eine Aggregation auszulösen, wohl aber um eine Sekretion auszulösen (24). Demzufolge bedarf nur die Sekretion der Aktivierung beider Kaskaden. Dagegen spielt der Calcium-unabhängige Signalweg für die Aggregation eine geringere Rolle als für die Sekretion. Bisher nimmt man an, dass die Effekte von IRAG primär auf die Hemmung der Calciumfreisetzung zurückzuführen sind (4). Folglich kann bei der Sekretion wahrscheinlich nur der Calcium-abhängige Signalweg durch IRAG inhibiert werden, während der PKC Weg von IRAG nicht beeinflusst wird. Dies könnte erklären, weshalb in den IRAG-KO Thrombozyten durch cGMP noch eine im Vergleich zur Aggregation deutliche Hemmung der Sekretion zu sehen war (nach Stimulation mit Thrombin oder Collagen, siehe Kap. 9.1; Abb. 37 A/B).

## **10. Zusammenfassung der Rolle von IRAG für die Thrombozytenaktivierung**

Die Thrombozyten spielen sowohl für physiologische als auch pathophysiologische Prozesse eine bedeutende Rolle. So dient die Thrombozytenaktivierung einerseits dem Wundverschluss, begünstigt jedoch auch arteriosklerotische Vorgänge. Deshalb ist die Aufklärung der pharmakologischen Interventionsmöglichkeit von besonders hohem Interesse. Eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse soll noch einmal die Bedeutung von IRAG, einem Signalprotein der NO/cGMP Signalkaskade, für die Thrombozyten belegen:

Besonders die NO/cGMP-abhängige Hemmung der Aggregation wird primär über IRAG vermittelt. Zudem wird die parallel ablaufende Sekretion beider Granulaarten - „alpha“ und „dense“ Granula - mittels NO/cGMP über IRAG inhibiert. Dadurch wird die Freisetzung sowohl aggregationsfördernder als auch adhäsionsfördernder Moleküle gehemmt. Außerdem wurde die Bedeutung von IRAG für die cGMP-abhängige Hemmung der Adhäsion an Fibrinogen nachgewiesen.

Interessant war vor allem, die nach Aktivierung der Thrombozyten erhöhte Aggregabilität der IRAG-KO Thrombozyten im Vergleich zu den WT Thrombozyten. Die kürzlich entdeckten Polymorphismen des IRAG-Gens (67) könnten dazu dienen, dass IRAG-Gen mit humanen Erkrankungen, z. B. arterielle Thromben, zu assoziieren

Die Plättchenadhäsion und -aktivierung sind initiale Ereignisse der Thrombusbildung, so dass deren Inhibition eine Möglichkeit bietet, unerwünschte thrombotische Ereignisse zu verhindern. IRAG als das Protein, das für die NO/cGMP-abhängige Hemmung sämtlicher Schritte der Thrombozytenaktivierung eine unverzichtbare Rolle spielt, könnte hierbei ein besonders vielversprechendes Zielprotein bei der Entwicklung neuer Pharmaka darstellen.

## 11. Literaturverzeichnis

1. **Abboud HE.** Platelet-derived growth factor and mesangial cells. *Kidney Int* 41: 581-583, 1992.
2. **Abrams C, Deng YJ, Steiner B, O'Toole T, and Shattil SJ.** Determinants of specificity of a baculovirus-expressed antibody Fab fragment that binds selectively to the activated form of integrin alpha IIb beta 3. *The Journal of biological chemistry* 269: 18781-18788, 1994.
3. **Aikawa R, Komuro I, Nagai R, and Yazaki Y.** Rho plays an important role in angiotensin II-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Molecular and cellular biochemistry* 212: 177-182, 2000.
4. **Antl M, von Bruhl ML, Eiglsperger C, Werner M, Konrad I, Kocher T, Wilm M, Hofmann F, Massberg S, and Schlossmann J.** IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood* 109: 552-559, 2007.
5. **Aoki H, Izumo S, and Sadoshima J.** Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation. *Circulation research* 82: 666-676, 1998.
6. **Ares GR, Caceres P, Alvarez-Leefmans FJ, and Ortiz PA.** cGMP decreases surface NKCC2 levels in the thick ascending limb: role of phosphodiesterase 2 (PDE2). *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F877-887, 2008.
7. **Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, and Fassler R.** The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *The EMBO journal* 18: 37-48, 1999.
8. **Badid C, Vincent M, Fouque D, Laville M, and Desmouliere A.** Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive renal disease. *Renal failure* 23: 543-549, 2001.
9. **Bailey C.** Effect of luminal atrial natriuretic peptide on chloride reabsorption in mouse cortical thick ascending limb: inhibition by endothelin. *J Am Soc Nephrol* 11: 1791-1797, 2000.
10. **Bascands JL, and Schanstra JP.** Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int* 68: 925-937, 2005.
11. **Beer JH, Springer KT, and Collier BS.** Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood* 79: 117-128, 1992.
12. **Bender AT, and Beavo JA.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* 58: 488-520, 2006.
13. **Boxberger.** *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken.* . Wiley VCH, Weinheim: 2006.
14. **Briggs JP, and Schnermann J.** The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects. *Annual review of physiology* 49: 251-273, 1987.
15. **Buchwalow IB, Schulze W, Karczewski P, Kostic MM, Wallukat G, Morwinski R, Krause EG, Muller J, Paul M, Slezak J, Luft FC, and Haller H.** Inducible nitric oxide synthase in the myocardium. *Molecular and cellular biochemistry* 217: 73-82, 2001.
16. **Burkhardt M, Glazova M, Gambaryan S, Vollkommer T, Butt E, Bader B, Heermeier K, Lincoln TM, Walter U, and Palmethofer A.** KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* 275: 33536-33541, 2000.
17. **Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, and Walter U.** cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *The Journal of biological chemistry* 269: 14509-14517, 1994.
18. **Cavallini L, Coassin M, Borean A, and Alexandre A.** Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 271: 5545-5551, 1996.
19. **Cha B, Kim JH, Hut H, Hogema BM, Nadarja J, Zizak M, Cavet M, Lee-Kwon W, Lohmann SM, Smolenski A, Tse CM, Yun C, de Jonge HR, and Donowitz M.** cGMP inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. *The Journal of biological chemistry* 280: 16642-16650, 2005.
20. **Chang L, and Karin M.** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001.
21. **Chevalier RL, Forbes MS, and Thornhill BA.** Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 75: 1145-1152, 2009.
22. **Chiche JD, Schlutsmeyer SM, Bloch DB, de la Monte SM, Roberts JD, Jr., Filippov G, Janssens SP, Rosenzweig A, and Bloch KD.** Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *The Journal of biological chemistry* 273: 34263-34271, 1998.

23. **Chuang LY, Guh JY, Wang KA, Huang YJ, and Huang JS.** Role of nitric oxide in high glucose-induced mitogenic response in renal fibroblasts. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 20: 2548-2558, 2006.
24. **Cifuni SM, Wagner DD, and Bergmeier W.** CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets. *Blood* 112: 1696-1703, 2008.
25. **Cove-Smith A, and Hendry BM.** The regulation of mesangial cell proliferation. *Nephron* 108: e74-79, 2008.
26. **Cramer EM, Savidge GF, Vainchenker W, Berndt MC, Pidard D, Caen JP, Masse JM, and Breton-Gorius J.** Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. *Blood* 75: 1220-1227, 1990.
27. **Damsky CH, and Werb Z.** Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Current opinion in cell biology* 4: 772-781, 1992.
28. **Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, and Friebe A.** NO-sensitive guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost.*
29. **Dangelmaier C, Jin J, Smith JB, and Kunapuli SP.** Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thrombosis and haemostasis* 85: 341-348, 2001.
30. **Desch M, Sigl K, Hieke B, Salb K, Kees F, Bernhard D, Jochim A, Spiessberger B, Hocherl K, Feil R, Feil S, Lukowski R, Wegener JW, Hofmann F, and Schlossmann J.** IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovascular research* 86: 496-505.
31. **Diaz-Ricart M, Tandon NN, Gomez-Ortiz G, Carretero M, Escolar G, Ordinas A, and Jamieson GA.** Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16: 883-888, 1996.
32. **Dunn SR, Qi Z, Bottinger EP, Breyer MD, and Sharma K.** Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney Int* 65: 1959-1967, 2004.
33. **Eddy AA.** Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7: 2495-2508, 1996.
34. **Floege J, van Roeyen C, Boor P, and Ostendorf T.** The role of PDGF-D in mesangioproliferative glomerulonephritis. *Contributions to nephrology* 157: 153-158, 2007.
35. **Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, and Murad F.** Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochemical pharmacology* 42: 1849-1857, 1991.
36. **Friebe A, and Koesling D.** Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation research* 93: 96-105, 2003.
37. **Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, and Keef KD.** Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *The Journal of biological chemistry* 274: 10927-10935, 1999.
38. **Gachet C.** ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and haemostasis* 86: 222-232, 2001.
39. **Garrington TP, and Johnson GL.** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology* 11: 211-218, 1999.
40. **Gawaz M.** *Das Blutplättchen.* Thieme Verlag, 1999.
41. **Geiger J, Nolte C, and Walter U.** Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *The American journal of physiology* 267: C236-244, 1994.
42. **Geiselhoring A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, and Schlossmann J.** IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *The EMBO journal* 23: 4222-4231, 2004.
43. **George JN, Nurden AT, and Phillips DR.** Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *The New England journal of medicine* 311: 1084-1098, 1984.
44. **Giebisch G.** Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *The American journal of physiology* 274: F817-833, 1998.
45. **Giebisch G, Hebert SC, and Wang WH.** New aspects of renal potassium transport. *Pflugers Arch* 446: 289-297, 2003.
46. **Gill RK, Saksena S, Syed IA, Tyagi S, Alrefai WA, Malakooti J, Ramaswamy K, and Dudeja PK.** Regulation of NHE3 by nitric oxide in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G747-756, 2002.
47. **Ginsberg MH, Xiaoping D, O'Toole TE, Loftus JC, and Plow EF.** Platelet integrins. *Thrombosis and haemostasis* 70: 87-93, 1993.
48. **Groggel GC, Marinides GN, Hovingh P, Hammond E, and Linker A.** Inhibition of rat mesangial cell growth by heparan sulfate. *The American journal of physiology* 258: F259-265, 1990.

49. **Guyton AC, Coleman TG, Young DB, Lohmeier TE, and DeClue JW.** Salt balance and long-term blood pressure control. *Annual review of medicine* 31: 15-27, 1980.
50. **Haas CS, Schockmann HO, Lang S, Kralewski M, and Sterzel RB.** Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation. *Journal of nephrology* 12: 405-415, 1999.
51. **Hannken T, Schroeder R, Stahl RA, and Wolf G.** Atrial natriuretic peptide attenuates ANG II-induced hypertrophy of renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F81-90, 2001.
52. **Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U, and Zimmer M.** Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8120-8125, 1999.
53. **Hepler JR.** Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends in pharmacological sciences* 20: 376-382, 1999.
54. **Heximer SP, Srinivasa SP, Bernstein LS, Bernard JL, Linder ME, Hepler JR, and Blumer KJ.** G protein selectivity is a determinant of RGS2 function. *The Journal of biological chemistry* 274: 34253-34259, 1999.
55. **Hirsch J, and Schlatter E.** K<sup>+</sup> channels in the basolateral membrane of rat cortical collecting duct are regulated by a cGMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* 429: 338-344, 1995.
56. **Hirsch JR, and Schlatter E.** Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels in the cortical collecting duct of rat. *Wiener klinische Wochenschrift* 109: 485-488, 1997.
57. **Hofmann F, Ammendola A, and Schlossmann J.** Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science* 113 ( Pt 10): 1671-1676, 2000.
58. **Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, and Schlossmann J.** Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological reviews* 86: 1-23, 2006.
59. **Hohenstein B, Daniel C, Wittmann S, and Hugo C.** PDE-5 inhibition impedes TSP-1 expression, TGF-beta activation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 23: 3427-3436, 2008.
60. **Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, and Walter U.** Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *European journal of biochemistry / FEBS* 225: 21-27, 1994.
61. **Huang JS, Chuang LY, Guh JY, Chen CJ, Yang YL, Chiang TA, Hung MY, and Liao TN.** Effect of nitric oxide-cGMP-dependent protein kinase activation on advanced glycation end-product-induced proliferation in renal fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 16: 2318-2329, 2005.
62. **Inkyo-Hayasaka K, Sakai T, Kobayashi N, Shirato I, and Tomino Y.** Three-dimensional analysis of the whole mesangium in the rat. *Kidney international* 50: 672-683, 1996.
63. **Ishino T, Kobayashi R, Wakui H, Fukushima Y, Nakamoto Y, and Miura AB.** Biochemical characterization of contractile proteins of rat cultured mesangial cells. *Kidney Int* 39: 1118-1124, 1991.
64. **Italiano JE, Jr., Patel-Hett S, and Hartwig JH.** Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 18-23, 2007.
65. **Jacob A, Molkentin JD, Smolenski A, Lohmann SM, and Begum N.** Insulin inhibits PDGF-directed VSMC migration via NO/ cGMP increase of MKP-1 and its inactivation of MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C704-713, 2002.
66. **Jin XH, McGrath HE, Gildea JJ, Siragy HM, Felder RA, and Carey RM.** Renal interstitial guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate mediates pressure-natriuresis via protein kinase G. *Hypertension* 43: 1133-1139, 2004.
67. **Johnson AD, Yanek LR, Chen MH, Faraday N, Larson MG, Tofler G, Lin SJ, Kraja AT, Province MA, Yang Q, Becker DM, O'Donnell CJ, and Becker LC.** Genome-wide meta-analyses identifies seven loci associated with platelet aggregation in response to agonists. *Nature genetics* 42: 608-613.
68. **Johnson GL, and Lapadat R.** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, NY)* 298: 1911-1912, 2002.
69. **Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Jr., Shivdasani RA, and von Andrian UH.** Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science (New York, NY)* 317: 1767-1770, 2007.
70. **Kaplan MR, Plotkin MD, Brown D, Hebert SC, and Delpire E.** Expression of the mouse Na-K-2Cl cotransporter, mBSC2, in the terminal inner medullary collecting duct, the glomerular and extraglomerular mesangium, and the glomerular afferent arteriole. *The Journal of clinical investigation* 98: 723-730, 1996.
71. **Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, Chen EJ, Bany IA, Mochizuki N, Ashbacher A, Matsuda M, Housman DE, and Graybiel AM.** A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13278-13283, 1998.

72. **Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, and Barnes MJ.** Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* 91: 491-499, 1998.
73. **Kriz W, and LeHir M.** Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney international* 67: 404-419, 2005.
74. **Kuhn M.** Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circulation research* 93: 700-709, 2003.
75. **Kurtz L, Gerl M, Kriz W, Wagner C, and Kurtz A.** Replacement of connexin 40 by connexin 45 causes ectopic localization of renin-producing cells in the kidney but maintains in vivo control of renin gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F403-409, 2009.
76. **Kyhse-Andersen J.** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10: 203-209, 1984.
77. **Lee GS.** Mesangial cell culture: its role in the understanding of the pathogenesis of glomerular disease. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 24: 851-855, 1995.
78. **Leevers SJ, and Marshall CJ.** Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *The EMBO journal* 11: 569-574, 1992.
79. **Li J, Zhao X, Li X, Lerea KM, and Olson SC.** Angiotensin II type 2 receptor-dependent increases in nitric oxide synthase expression in the pulmonary endothelium is mediated via a G alpha i3/Ras/Raf/MAPK pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C2185-2196, 2007.
80. **Li L, Miano JM, Cserjesi P, and Olson EN.** SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circulation research* 78: 188-195, 1996.
81. **Li M, Li Z, and Sun X.** Statins suppress MMP2 secretion via inactivation of RhoA/ROCK pathway in pulmonary vascular smooth muscles cells. *European journal of pharmacology* 591: 219-223, 2008.
82. **Loffing J, Pietri L, Aregger F, Bloch-Faure M, Ziegler U, Meneton P, Rossier BC, and Kaissling B.** Differential subcellular localization of ENaC subunits in mouse kidney in response to high- and low-Na diets. *American journal of physiology* 279: F252-258, 2000.
83. **Loffing J, and Schild L.** Functional domains of the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 16: 3175-3181, 2005.
84. **Margadant C, and Sonnenberg A.** Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO reports* 11: 97-105.
85. **Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U, and Gawaz M.** Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* 103: 136-142, 2004.
86. **Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, and Hofmann F.** Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *The Journal of experimental medicine* 189: 1255-1264, 1999.
87. **Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J, and Gawaz M.** Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprotection and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 112: 1180-1188, 2005.
88. **Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, and Schnermann J.** Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F339-351, 2000.
89. **Meyer MH, Meyer RA, Jr., Gray RW, and Irwin RL.** Picric acid methods greatly overestimate serum creatinine in mice: more accurate results with high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* 144: 285-290, 1985.
90. **Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, and Valeri CR.** In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 11877-11882, 1996.
91. **Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, and Munzel T.** Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 103: 2188-2194, 2001.
92. **Nakamura T, Jamieson GA, Okuma M, Kambayashi J, and Tandon NN.** Platelet adhesion to native type I collagen fibrils. Role of GPVI in divalent cation-dependent and -independent adhesion and thromboxane A2 generation. *The Journal of biological chemistry* 273: 4338-4344, 1998.

93. **Nie HG, Zhang W, Han DY, Li QN, Li J, Zhao RZ, Su XF, Peng JB, and Ji HL.** 8-pCPT-cGMP stimulates alphabeta-gamma-ENaC activity in oocytes as an external ligand requiring specific nucleotide moieties. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F323-334.
94. **Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, and Knepper MA.** Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *The American journal of physiology* 275: F885-893, 1998.
95. **Norman JT, and Fine LG.** Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. *Experimental nephrology* 7: 167-177, 1999.
96. **O'Neil RG, and Hayhurst RA.** Sodium-dependent modulation of the renal Na-K-ATPase: influence of mineralocorticoids on the cortical collecting duct. *The Journal of membrane biology* 85: 169-179, 1985.
97. **Offermanns S.** Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research* 99: 1293-1304, 2006.
98. **Pabst R, and Sterzel RB.** Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney international* 24: 626-631, 1983.
99. **Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, and Hofmann F.** Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal* 17: 3045-3051, 1998.
100. **Pfeifer A, Nurnberg B, Kamm S, Uhde M, Schultz G, Ruth P, and Hofmann F.** Cyclic GMP-dependent protein kinase blocks pertussis toxin-sensitive hormone receptor signaling pathways in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry* 270: 9052-9059, 1995.
101. **Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, and Hofmann F.** Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 135: 105-149, 1999.
102. **Pfister G.** Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91: 497-503, 2001.
103. **Plato CF, Shesely EG, and Garvin JL.** eNOS mediates L-arginine-induced inhibition of thick ascending limb chloride flux. *Hypertension* 35: 319-323, 2000.
104. **Rajendran S, and Chirkov YY.** Platelet hyperaggregability: impaired responsiveness to nitric oxide ("platelet NO resistance") as a therapeutic target. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 22: 193-203, 2008.
105. **Raju TN.** The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936). *Lancet* 356: 346, 2000.
106. **Reid HM, and Kinsella BT.** The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for nitric oxide-mediated desensitization. Independent modulation of Tp alpha signaling by nitric oxide and prostacyclin. *The Journal of biological chemistry* 278: 51190-51202, 2003.
107. **Rendu F, and Brohard-Bohn B.** The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12: 261-273, 2001.
108. **Ridley AJ, and Hall A.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399, 1992.
109. **Rink TJ, Sanchez A, and Hallam TJ.** Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion without raising cytoplasmic free calcium in human platelets. *Nature* 305: 317-319, 1983.
110. **Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, and Egido J.** TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovascular research* 74: 196-206, 2007.
111. **Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, and Egido J.** Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 21: 16-20, 2006.
112. **Rutherford PA, Pizzonia JH, Biemesderfer D, Abu-Alfa A, Reilly R, and Aronson PS.** Expression of Na(+)-H+ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 in kidney and blood cells of rabbit and rat. *Experimental nephrology* 5: 490-497, 1997.
113. **Samara WM, and Gurbel PA.** The role of platelet receptors and adhesion molecules in coronary artery disease. *Coronary artery disease* 14: 65-79, 2003.
114. **Sandau KB, Gantner F, and Brune B.** Nitric oxide-induced F-actin disassembly is mediated via cGMP, cAMP, and protein kinase A activation in rat mesangial cells. *Experimental cell research* 271: 329-336, 2001.
115. **Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, and Hofmann F.** Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circulation research* 87: 825-830, 2000.
116. **Sawada N, Itoh H, Miyashita K, Tsujimoto H, Sone M, Yamahara K, Arany ZP, Hofmann F, and Nakao K.** Cyclic GMP kinase and RhoA Ser188 phosphorylation integrate pro- and antifibrotic signals in blood vessels. *Molecular and cellular biology* 29: 6018-6032, 2009.

117. **Sawada N, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, and Nakao K.** cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochemical and biophysical research communications* 280: 798-805, 2001.
118. **Schlondorff D.** The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *Faseb J* 1: 272-281, 1987.
119. **Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, and Ruth P.** Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 404: 197-201, 2000.
120. **Schmidt L, Thews.** *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* 2004.
121. **Schwarz UR, Walter U, and Eigenthaler M.** Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical pharmacology* 62: 1153-1161, 2001.
122. **Seger R, and Krebs EG.** The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9: 726-735, 1995.
123. **Selheim F, Froyset AK, Strand I, Vassbotn FS, and Holmsen H.** Adrenaline potentiates PI 3-kinase in platelets stimulated with thrombin and SFRLLN: role of secreted ADP. *FEBS letters* 485: 62-66, 2000.
124. **Shattil SJ.** Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thrombosis and haemostasis* 74: 149-155, 1995.
125. **Shattil SJ.** Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thrombosis and haemostasis* 82: 318-325, 1999.
126. **Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, and Kita T.** Small GTPase Rab4 regulates Ca<sup>2+</sup>-induced alpha-granule secretion in platelets. *The Journal of biological chemistry* 275: 33844-33849, 2000.
127. **Shui HA, Ka SM, Wu WM, Lin YF, Hou YC, Su LC, and Chen A.** LPS-evoked IL-18 expression in mesangial cells plays a role in accelerating lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 46: 1277-1284, 2007.
128. **Silbernagl S, and Despopoulos A.** *Taschenatlas der Physiologie.* Stuttgart: Thieme, 2003.
129. **Singhal PC, DeCandido S, Satriano JA, Schlondorff D, and Hays RM.** Atrial natriuretic peptide and nitroprusside cause relaxation of cultured rat mesangial cells. *The American journal of physiology* 257: C86-93, 1989.
130. **Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, and Parmacek MS.** Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *The Journal of biological chemistry* 270: 13460-13469, 1995.
131. **Somlyo AP, and Somlyo AV.** Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological reviews* 83: 1325-1358, 2003.
132. **Somlyo AP, and Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *The Journal of physiology* 522 Pt 2: 177-185, 2000.
133. **Sonnenburg WK, and Beavo JA.** Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* 26: 87-114, 1994.
134. **Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, and Santoro SA.** The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg<sup>++</sup>-dependent adhesion of platelets to collagen. *The Journal of cell biology* 108: 1917-1924, 1989.
135. **Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Weber M, and Goodman SL.** Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 2: S126-131, 1992.
136. **Stockand JD, and Sansom SC.** Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiological reviews* 78: 723-744, 1998.
137. **Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, and Neilson EG.** Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of cell biology* 130: 393-405, 1995.
138. **Sugimoto T, Haneda M, Togawa M, Isono M, Shikano T, Araki S, Nakagawa T, Kashiwagi A, Guan KL, and Kikkawa R.** Atrial natriuretic peptide induces the expression of MKP-1, a mitogen-activated protein kinase phosphatase, in glomerular mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* 271: 544-547, 1996.
139. **Sun XZ, Li ZF, Liu Y, Fang P, and Li MX.** Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses matrix metalloproteinase-2 production in pulmonary artery smooth muscles cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 37: 362-367.
140. **Sun XZ, Li ZF, Liu Y, Fang P, and Li MX.** Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses MMP2 production in pulmonary artery smooth muscles cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2009.
141. **Surks HK, and Mendelsohn ME.** Dimerization of cGMP-dependent protein kinase 1alpha and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cellular signalling* 15: 937-944, 2003.



142. **Surks HK, Richards CT, and Mendelsohn ME.** Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA. *The Journal of biological chemistry* 278: 51484-51493, 2003.
143. **Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, and Mendelsohn ME.** Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nature medicine* 9: 1506-1512, 2003.
144. **Thews O, Zywiets F, Lecher B, and Vaupel P.** Quantitative changes of metabolic and bioenergetic parameters in experimental tumors during fractionated irradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 45: 1281-1288, 1999.
145. **Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, and Seabra MC.** Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5872-5877, 2007.
146. **Torrecillas G, Diez-Marques ML, Garcia-Escribano C, Bosch RJ, Rodriguez-Puyol D, and Rodriguez-Puyol M.** Mechanisms of cGMP-dependent mesangial-cell relaxation: a role for myosin light-chain phosphatase activation. *The Biochemical journal* 346 Pt 1: 217-222, 2000.
147. **Vaandrager AB, Bot AG, and De Jonge HR.** Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 112: 437-443, 1997.
148. **Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, and de Jonge HR.** N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *The Journal of biological chemistry* 271: 7025-7029, 1996.
149. **Wagner C, and Kurtz A.** Regulation of renal renin release. *Current opinion in nephrology and hypertension* 7: 437-441, 1998.
150. **Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, and Kurtz A.** Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *The Journal of clinical investigation* 102: 1576-1582, 1998.
151. **Wallmon A, Fellstrom B, Larsson R, Floege J, Topley N, and Ljunghall S.** PDGF-BB, but not PDGF-AA, stimulates calcium mobilization, activation of calcium channels and cell proliferation in cultured rat mesangial cells. *Experimental nephrology* 1: 238-244, 1993.
152. **Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, and Mendelsohn ME.** Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4888-4893, 1998.
153. **Wang S, and Li Y.** Expression of constitutively active cGMP-dependent protein kinase inhibits glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *American journal of physiology* 297: H2075-2083, 2009.
154. **Wang S, Wu X, Lincoln TM, and Murphy-Ullrich JE.** Expression of constitutively active cGMP-dependent protein kinase prevents glucose stimulation of thrombospondin 1 expression and TGF-beta activity. *Diabetes* 52: 2144-2150, 2003.
155. **Wang WH.** The cGMP-dependent protein kinase stimulates the basolateral 18-pS K channel of the rat CCD. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C1212-1217, 2000.
156. **Wang X, Pluznick JL, Settles DC, and Sansom SC.** Association of VASP with TRPC4 in PKG-mediated inhibition of the store-operated calcium response in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1768-1776, 2007.
157. **Weber S, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P, Worner R, Wegener JW, Valtcheva N, Feil S, Schlossmann J, Hofmann F, and Feil R.** Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circulation research* 101: 1096-1103, 2007.
158. **Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, and Ginsberg MH.** Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *The American journal of pathology* 124: 324-334, 1986.
159. **Wernet W, Flockerzi V, and Hofmann F.** The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS letters* 251: 191-196, 1989.
160. **Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, and Wilkins MR.** Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172: 105-113, 2005.
161. **Wong CY, Cheong SK, Mok PL, and Leong CF.** Differentiation of human mesenchymal stem cells into mesangial cells in post-glomerular injury murine model. *Pathology* 40: 52-57, 2008.
162. **Wu A, Pangalos MN, Efthimiopoulos S, Shioi J, and Robakis NK.** Appican expression induces morphological changes in C6 glioma cells and promotes adhesion of neural cells to the extracellular matrix. *J Neurosci* 17: 4987-4993, 1997.
163. **Wu JJ, and Bennett AM.** Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *The Journal of biological chemistry* 280: 16461-16466, 2005.

164. **Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S, and Narumiya S.** ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* 8: 1449-1455, 1993.
165. **Yang J, and Liu Y.** Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *The American journal of pathology* 159: 1465-1475, 2001.
166. **Yu SM, Hung LM, and Lin CC.** cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 95: 1269-1277, 1997.
167. **Zatz R, and de Nucci G.** Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *The American journal of physiology* 261: F360-363, 1991.
168. **Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Muller GA, Strutz F, and Kalluri R.** Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *The American journal of pathology* 159: 1313-1321, 2001.

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Abstracts

Desch, M., Schinner, E., Weinmeister, P., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2008), Cardiovascular function of IRAG. *Summerschool (Regensburg, Germany)*.

Desch, M., Schinner, E., Kees, F., Weinmeister, P., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2008), Analysis of smooth muscle and platelet function in IRAG knockout mice. *30. Jahrestagung der GDCh (Regensburg, Germany)*.

Desch, M., Schinner, E., Sigl, K., Wegener, J.W., Feil, R., Feil, S., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2009), Cardiovascular and gastrointestinal function of IRAG. *50. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Schinner, E., Schlossmann, J. (2009), NO/cGMP signaling in platelets. *4th International Conference on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Regensburg, Germany)*.

Schinner, E., Schramm A., Kurtz A., Hofmann F., Schlossmann, J. (2010), Localisation of cGKI in the kidney. *51. Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Schinner, E., Kurtz A., Hofmann F., Schlossmann, J. (2010), Localisation and function of cGKI in the interstitium. (*Summerschool, Hersbruck, Germany*)

Desch, M., Schinner, E., Hofmann, F., Seifert, R., Schlossmann, J. (2010) Cyclic cytidine 3', 5'-monophosphate (cCMP) signals via cGMP kinase I *Summerschool (Regensburg, Germany)*.

### Originalarbeiten

Desch, M., Schinner, E., Hofmann, F., Seifert, R., Schlossmann, J. Cyclic cytidine 3', 5'-monophosphate (cCMP) signals via cGMP kinase I. (*FEBS lett.2010 Sep 24*)

Schinner, E., Schlossmann J. Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation. (*in preparation*)

Schinner, E., Kurtz A., Hofmann, F., Schlossmann, J. Suppression of kidney fibrosis by cGMP-dependent kinases cGKI (*in preparation*)

## 12. Anhang

### 12.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
μ	mikro	MC	Mesangialzellen
αSMA	alpha-smooth-muscle-actin	MEK	MAP kinase kinase
A	Ampere	MKP-1	MAPK-Phosphatase 1
ADH	Antidiuretisches Hormon	MLC	Myosin-Leicht-Kette
AK	Antikörper	MLCK	MLC-Kinase
ATP	Adenosin-Triphosphat	MLCP	MLC-Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat	MQ-	Millipore-H <sub>2</sub> O
ASDN	Aldosteron sensible distales Nephron	H <sub>2</sub> O	
BSA	Bovines Serum-Albumin	mRNA	Messenger-RNA
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat	MTS	Dimethylthiazolcarboxymethoxyphenylsulfophenyltetrazolium
cDNA	complementary DNA	MYPT1	Myosin Phosphatase target Subunit 1
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen	n	nano
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
cGMP	Cyclisches Guanosin-Monophosphat	NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I	NHE3	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -exchanger
CNG	Cyclic nucleotide gated	NKCC	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup> Transporter
CTGF	Connective-tissue-growth-factor	nNOS	Neuronale NOS (=NOS1)
Da	Dalton	NO	Stickstoffmonoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	NOS	NO-Synthase
DNA	Desoxyribonucleinsäure	NP	Natriuretisches Peptid
dNTP	Desoxy Nucleotid Triphosphat	PaSMC	Pulmonary-artery-smooth-muscle-cells
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation	PBS	Phosphate-buffered Saline
DTT	Dithio-Threitol	PCR	Polymerase chain reaction
ECM	Extrazelluläre Matrix	PDE	Phosphodiesterase
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation	PDGF	Platelet-derived-growth-factor
ENaC	Epithelialer Natrium Channel	PFA	Paraformaldehyd
eNOS	Endotheliale NOS (=NOS3)	pGC	particulate Guanylate-Cyclase
ERK 1/2	extracellular-signal regulated kinase 1/2	PKG	Protein-Kinase G
FACS	fluorescence -activated cell sorting	PVDF	Polyvinylidenfluorid
FSC	Forward Scatter	nNOS	Neuronale NOS (=NOS1)
FSP1	Fibroblast specific protein	NO	Stickstoffmonoxid
GEF	Guanin-nucleotid-exchange-factor	NOS	NO-Synthase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
GP	Glycoproteine	rb	retinoblastoma
GTP	Guanosin-Triphosphat	RGS2	Regulator of G-Protein-Signaling
h	Stunde	RNA	Ribonucleinsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	ROCK	Rho-assoziierte coiled-coil Kinase
HBBS	Hank's balanced Salt Solution	rpm	rounds per minute
HPLC	High pressure liquid chromatography	RT-	Reverse Transkription / Transkriptase
HRP	Horse redish peroxidase	RT	Raumtemperatur
HS	Horse Serum	SSC	Sidwards Scatter
I.E.	Internationale Einheit	SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
IH	Immunhistochemie	sGC	soluble Guanylate-Cyclase
IL-1	Interleukin 1	SMC	Smooth-muscle-cells
iNOS	Induzierbare NOS (=NOS2)	SNP	Single nucleotide polymorohism
IP <sub>3</sub>	Inositol-Triphosphat	SNP	Sodiumnitropussid
IP <sub>3</sub> RI	IP <sub>3</sub> -Rezeptor I	SOC	Store-operated-calcium-channel
IRAG	IP <sub>3</sub> -Rezeptor-assoziiertes cGK-Substrat	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
ISDN	Isosorbid-2,5-dinitrat;	TBS	Tris-buffered Saline
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat	TBST	TBS mit TritonX
k	kilo	TEMED	Tetramethylethylendiamin
KO	Knockout	TGF	Transforming-growth-factor
LSM	Laser Scaning Microscope	TSP-1	Thrombospondin-1
m	mili	TRPC	Transient-receptor-potential-cation-channel

U46629	Thromboxan, TXA <sub>2</sub>
UUL	Unilaterale Ureter Ligation
VASP	Vasodilatatorisches Phosphoprotein
VSMC	Vascular-smooth-muscle-cells
vWF	von Willebrand Faktor
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WT	Wildtyp
WB	Western-Blot

## 12.2 Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen:

Abb. 1: NO/cGMP-Signaltransduktionsweg.....	8
Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur der cGKs.....	10
Abb. 3: Trimerer Komplex.....	12
Abb. 4: Aufbau eines Nephrons.....	12
Abb. 5: Schematische Ansicht eines Nierenkörperchens.....	13
Abb. 6: Stoffwechsellkäfig.....	32
Abb. 7: HPLC-Chromatogramme .....	34
Abb. 8: Magnet für Glomeruli Isolierung.....	36
Abb. 9: Analyse der Expression von cGKI im JGA.....	55
Abb. 10: Expression der cGKI im Mesangium.....	56
Abb. 11: Glomeruläre Strukturen ohne cGKI Expression.....	57
Abb. 12: Verteilungsmuster von Desmin, cGKI $\alpha$ , cGKI $\beta$ und sGC innerhalb der Mesangialzellen ..	58
Abb. 13: Analyse möglicher Substratproteine der cGKI $\alpha$ und cGKI $\beta$ .....	59
Abb. 14: Immuno-Blot muriner Mesangialzellen.....	60
Abb. 15: 24 h Trink- und Urinvolumina.....	61
Abb. 16: Glomeruläre Filtrationsrate.....	63
Abb. 17: Analyse der Na <sup>+</sup> - und K <sup>+</sup> -Konzentrationen.....	65
Abb. 18: Immuno-Blot muriner Mesangialzellen.....	77
Abb. 19: cGMP-Effekt in Abhängigkeit von der Passagenhöhe .....	78
Abb. 20: Kalibriergerade zur Bestimmung der Zellzahl.....	78
Abb. 21: Übersicht über das Proliferationsverhalten von WT- und cGKI $\alpha$ -Rescue-Mesangialzellen .....	80

Abb. 22: Effekt von 1 mM 8-Br-cGMP auf kultivierte Mesangialzellen.....	81
Abb. 23: Übersichtsbild einer mit cGKI $\alpha$ -AK gefärbten WT Niere.....	83
Abb. 24: Übersichtsbild einer mit cGKI $\beta$ -AK gefärbten WT Niere.....	83
Abb. 25: Analyse der cGKI-Expression im medullären Interstitium.....	84
Abb. 26: Fibrose-Entwicklung post UUL nach unterschiedlichen Progressionszeiten.....	85
Abb. 27: Analyse der mRNA-Expression 1d/7d/14d post UUL.....	86
Abb. 28: n-fache Zunahme der mRNA-Expression von TGF, FSP, cGKI und sGC nach 7 Tagen UUL.....	87
Abb. 29: n-fache Expressionszunahme der mRNA-Mengen von TGF, FSP, RhoA und ROCK...89	
Abb. 30: Analyse der Protein-Expression von WT-Nieren 7d post UUL mittels Western-Blot.....	90
Abb. 31: WT-Nieren: Vergleich gesund - fibrotisch - behandelt bzgl. cGKI $\alpha$ -Expression.....	92
Abb. 32: WT-Nieren: Vergleich gesund - fibrotisch bzgl. cGKI $\alpha$ - bzw. cGKI $\beta$ -Expression.....	92
Abb. 33: $\alpha$ SMA-Färbung von WT- versus Rescue-Nieren.....	93
Abb. 34: Deletion des IRAG Proteins.....	102
Abb. 35: Darstellung der erhöhten Aggregabilität.....	103
Abb. 36: Detektion der Aggregation/Sekretion.....	104
Abb. 37 Statistische Darstellung der ATP-Sekretion und Aggregation.....	109
Abb. 38: FACS-Analyse der P-Selektin-Sekretion und der GPIIb/IIIa Aktivierung.....	112
Abb. 39: Statistische Darstellung der Hemmung der GPIIb/IIIa Aktivierung und P-Selektin-Sekretion .....	113
Abb. 40: Vergleich der GPIIb/IIIa Aktivierung und P-Selektin-Sekretion mit dem cAMP-Analogon cBIMPS als Inhibitor.....	114
Abb. 41: Statistische Darstellung der Hemmung der Fibrinogenbindung und der Adhäsion.....	115

### Tabellen:

Tab. 1: Puffer und Lösungen.....	28
Tab. 2: Liste der verwendeten Antikörper.....	29
Tab. 3: Adsorptions- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenz-Farbstoffe.....	30
Tab. 4: Bezeichnung der Geräte und technische Daten des HPLC-Laufs.....	33
Tab. 5: Urin-Verdünnungen für Flammenphotometer.....	34

---

Tab. 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.....	39
Tab. 7: Mastermix für Reverse Transkription.....	45
Tab. 8: Zusammensetzung des verwendeten Puffers.....	50
Tab. 9: Konzentration/Inkubationszeit der verwendeten Agonisten und Inhibitoren.....	54
Tab. 10: Vergleich der prozentualen Unterschiede zwischen Trinkvolumina.....	62
Tab. 11: Vergleich der prozentualen Unterschiede zwischen Urinvolumina.....	62
Tab. 12: GFR in [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}(\text{BW})$ ] von WT- und cGKI $\alpha$ -Rescue.....	64
Tab.13: Kreatininkonzentrationen in mg/dl in Serum und Urin.....	64
Tab. 14: Na <sup>+</sup> -Konzentrationen [mM] im Urin bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät.....	66
Tab. 15: K <sup>+</sup> -Konzentrationen [mM] im Urin bei Normal-, Hoch- und Niedrig-Salz-Diät.....	66
Tab. 16: Vergleich der prozentualen Unterschiede von WT und cGKI $\alpha$ -Rescue.....	67
Tab. 17: Übersicht über die prozentuale Hemmung der Proliferation durch 1 mM 8-Br-cGMP in Abhängigkeit von der Passagenhöhe .....	79
Tab. 18: Zusammenfassung der Abb. 21 .....	81
Tab. 19: n-fache Expressionszunahme der mRNA-Mengen.....	88
Tab. 20: Prozentuale Abnahme der mRNA-Mengen profibrotischer Marker nach Verabreichung von ISDN (30 bzw. 60 mg/kg) und YC1.....	88
Tab. 21: Zusammenfassung der mRNA-Mengen aus Abb. 29.....	89
Tab. 22: Vergleich der Aggregationsrate [in%] zwischen WT- und IRAG-KO Thrombozyten.....	105
Tab. 23: Zusammenfassung der IC50 Werte von 8-pCPT-cGMP, SNP bzw. DEA-NO.....	106
Tab. 24: Vergleich der Hemmung der Sekretion von WT Thrombozyten mit der von IRAG-KO Thrombozyten.....	108
Tab. 25: FACS-Analyse der Hemmung der P-Selektin-Sekretion.....	113
Tab. 26: FACS-Analyse der Hemmung der GPIIb/IIIa Aktivierung.....	113

### 12.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zuallererst möchte ich Herr Prof. Dr. Schlossmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit danken. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Kees für seinen unermüdlichen Einsatz zur Optimierung des HPLC-Protokolls, seine Hilfsbereitschaft und für seine Fürsorglichkeit. Sowie unseren Sekretärin Rita und den TAs, Katharina, Astrid, Gertraud, Maria und Susanne, vor allem Susanne war für mich in den letzten Monaten nicht mehr weg zu denken. Sie zeigten sich alle jederzeit hilfsbereit auch bzgl. Schokoladensucht, Pflasterversorgung oder sonstigen guten und witzigen Ratschlägen.

Von anderen Lehrstühlen möchte ich noch danken Marion Kubitzka, Barbara Reich, v.a. aber Herrn Prof. Dr. Kurtz und seiner TA Anna, für das Lernen von Methoden und deren Hilfsbereitschaft.

Ein besonderes Dankeschön auch an meine Laborkollegen Andrea, Katharina, Petra, Irena, Melanie, Matthias und Higgl, die mir stets mit Rat und Tat (und Schoggi) zur Seite standen und den Arbeitsalltag jeden Tag auf's Neue amüsant (auch wenn es der Higgl manchmal übertrieben hat) und abwechslungsreich gestalteten. Vornehmlich möchte ich Korrekturlesern ein herzliches „Dankeschön“ aussprechen (Andrea, Melli, Petra und Kathi). Das einmalige Arbeitsklima war sicherlich für das Gelingen dieser Arbeit in jeder Beziehung nur förderlich und möchte ich auch in Zukunft keinesfalls missen.

Schließlich gebührt (neben meinen drei Brüdern) meiner lieben Mama mein größter Dank für die Ermöglichung meines Studiums, nicht nur aus finanzieller Hinsicht, sondern vor allem auch dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr hatte, stets motivierend und mich immer mit gutem Zuspruch versorgte.



## 12.4 Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)