

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Nitroxyl-Donoren: PKG1 α als neue therapeutische Zielstruktur

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors Dr. rer. biol. hum.
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Julia Pflaumenbaum
aus Kiew, Ukraine

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.10.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Friederike Cuello

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Tanja Zeller

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Hypertonie und zugrundeliegende Ursachen.....	1
1.2 Aktuelle leitlinienkonforme Behandlung der Hypertonie.....	4
1.3 Blutdruckregulation.....	5
1.3.1 Die endotheliale NO-Synthese	6
1.3.2 PKGI vermittelte Vasorelaxation.....	7
1.4 PKG, Struktur und Regulation	10
1.4.1 Struktur der PKGI α	11
1.4.2 ROS und ihr Einfluss auf regulatorische Signalwege.....	13
1.4.3 Oxidative Modifikation von PKGI α	15
1.5 HNO als neue therapeutische Strategie	20
1.5.1 1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA).....	21
1.5.2 CXL-1020.....	22
1.6 FRET und Biosensoren für cGMP	24
1.6.1 Grundlagen von FRET	24
1.6.2 FRET-basierte cGMP Biosensoren	25
1.7 Ziele der Arbeit.....	27
2 Materialien und Methoden	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien und Bakterienstämme	28
2.1.2 Mauslinien.....	28
2.1.3 Plasmide	29
2.1.4 Plasmide generiert in dieser Doktorarbeit.....	29
2.1.5 DNA Oligonukleotide	29

2.1.6	Substanzen	30
2.1.7	Universelle TaqMan PCR Sonden.....	31
2.1.8	Enzyme und Enzypuffer	31
2.1.9	Antikörper.....	32
2.1.10	Primäre Antikörper für Western Blot Analyse	32
2.1.11	Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz Analyse.....	33
2.1.12	Sekundäre Antikörper für Western Blot Analyse.....	33
2.1.13	Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz und Fluoreszenzfarbstoffe	34
2.1.14	Kits.....	34
2.1.15	Zellkultur	35
2.1.16	Chemikalien	35
2.1.17	Verbrauchsmaterialien	38
2.1.18	Geräte.....	39
2.1.19	Mikroskopie.....	41
2.1.20	Software.....	42
2.2	Methoden	43
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.1.1	Klonierungsstrategie zur Herstellung von Redox-defizienten Mutanten	43
2.2.1.2	Polymerasekettenreaktion.....	46
2.2.1.3	Restriktionsverdau	47
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion	47
2.2.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	48
2.2.1.6	Transformation des Ligationsansatzes in TOP10 <i>E. coli</i> Zellen	48
2.2.1.7	Vervielfältigung von transformierten Klonen - Mini-Präparation	49
2.2.1.8	Kontrollverdau	49
2.2.1.9	Vervielfältigung von positiven Klonen - Midi-Präparation	50

2.2.1.10	Bestimmung der Plasmid-Konzentration.....	50
2.2.1.11	Klonierungsstrategie zur Herstellung stabiler Klone	50
2.2.1.12	Klonierungsstrategie zur Herstellung des Twin-Strep-Tags® PKG1 α -C117/195S Konstruktes	51
2.2.2	Zellkulturtechnik	53
2.2.2.1	Kultivierung von Zellen	53
2.2.2.2	Auftauen von HEK-Zellen.....	54
2.2.2.3	Passagieren von HEK-Zellen	54
2.2.2.4	Einfrieren von HEK-Zellen.....	54
2.2.2.5	Transfektion von HEK-Zellen.....	55
2.2.2.6	Selektion stabiler Zelllinien mit Geneticin	56
2.2.2.7	Selektion stabiler Zelllinien mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	57
2.2.2.8	Konzentrationen, Inkubationszeiten und Herstellung von Inhibitor- und Stimulationslösungen für ein 6-Well Platten-Format.....	57
2.2.2.9	Stimulation der HEK293 Zellen, die stabil die Sensoren cGi500 exprimieren	58
2.2.3	FRET-Messungen	58
2.2.3.1	Vorbereitung einer 96-Well Assayplatte zur Messung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen und Einzelmessungen.....	58
2.2.3.2	Vorbereitung einer „Compound“-Platte mit NO- und HNO-Donoren zur Messung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	60
2.2.3.3	FRET-Messungen mit dem FlexStation3® Hochdurchsatzplattengerät.....	61
2.2.3.4	FRET-Messungen in Zelllysaten	62
2.2.4	PKG1 α Aktivitätsassays	63
2.2.4.1	<i>In vitro</i> PKG1 α Assay mit rekombinantem Substrat C1-M-C2.....	63
2.2.4.2	Spektrophotometrischer Kinase Aktivitätsassay mit gereinigter PKG1 α und synthetischem Substrat VASPTide.....	64

2.2.4.2.1	Aufreinigung der humanen PKG α -WT und C117/195S	65
2.2.4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	66
2.2.4.2.3	Untersuchung der PKG α Aktivität mittels eines spektrophotometrischen Assays (Cook Assay)	67
2.2.4.3	Untersuchung der PKG α Aktivität durch endogene VASP-Phosphorylierung	68
2.2.5	Proteinanalyse	69
2.2.5.1	SDS-PAGE	69
2.2.5.2	Western Blot-halbtrockener/tankbasierter Proteintransfer	70
2.2.5.3	Immunoblotting.....	72
2.2.6	Mausexperimente.....	72
2.2.6.1	Genotypisierung	74
2.2.6.1.1	DNA Isolation.....	74
2.2.6.1.2	Durchführung der TaqMan PCR.....	74
2.2.6.2	Isolation von Organen	76
2.2.6.3	Isolation von VSMCs aus der Aorta.....	77
2.2.6.4	Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie	78
2.2.6.5	<i>Ex vivo</i> Messung der Vasorelaxation in <i>Arteria femoralis</i> mittels Drahtmyographen.....	79
2.2.7	Statistik	81
3	Ergebnisse.....	82
3.1	Etablierung und Validierung von Redox-defizienten FRET-Sensoren.....	82
3.1.1	Generierung von C117S, C195S und C177/195S FRET-Sensoren.....	82
3.1.2	Generierung und Selektion stabiler Zelllinien	83
3.2	Analyse der cGi500 WT und Mutanten FRET-Sensoren nach NO- und HNO-Stimulation.....	85
3.2.1	cGMP-Affinitätsbestimmungen von WT- und Mutanten FRET-Sensoren.....	85

3.2.2	Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen in HNO-stimulierten cGi500 WT und Mutanten FRET-Sensoren	87
3.2.3	Analyse der HNO-induzierten Konformationsänderung in WT- und Mutanten FRET-Sensoren	88
3.2.4	Analyse der HNO-induzierten Konformationsänderung in Zelllysaten von WT und Mutanten FRET-Sensoren.....	90
3.2.5	Nachweis der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke bei cGi500 WT und mutierten FRET-Sensoren	92
3.3	Untersuchung der funktionellen Relevanz der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke	92
3.4	Validierung HNO-vermittelter Effekte in KI-Mausmodellen.....	95
3.4.1	Analyse des Herzgewichts von KI-Mäusen Prkg1-C117S, Prkg1-C195S und WT Geschwistertieren.....	95
3.4.2	Analyse der PKG α Expression in verschiedenen Organen von Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Mäusen	96
3.4.3	Validierung HNO-vermittelter Effekte in intakten Gefäßen von Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Mäusen.....	97
3.4.4	Analyse der VSMCs, isoliert aus Aorta der Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäuse	100
3.4.4.1	Immunfluoreszenzanalyse von VSMCs	100
3.4.4.2	Analyse der PKG α Aktivität mittels endogener VASP Phosphorylierung in VSMCs aus Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäusen	102
3.4.5	Initiale Charakterisierung der Prkg1-C117/195S KI-Maus	104
3.4.5.1	Zucht und Phänotyp der Prkg1-C117/195S Mäuse	104
3.4.5.2	Analyse der PKG α Aktivität mittels endogener VASP Phosphorylierung in VSMCs aus dem Prkg1-C117/C195S KI-Mausmodell.....	106
3.4.6	<i>In vitro</i> Charakterisierung von Twin-Strep-tag [®] PKG α C117/195S.....	108
3.4.6.1	Herstellung des Twin-Strep-tag [®] PKG α -C117/195S Konstruktes	108
3.4.6.2	Aufreinigung von hPKG α -WT und hPKG α -C117/195S	109

3.4.6.3	<i>In vitro</i> Kinase Assays mit gereinigter WT und C117/195S PKGI α	110
4	Diskussion	113
4.1	Untersuchung von Redox-defizienten FRET-Sensoren	114
4.2	Analyse der funktionellen Relevanz der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke.....	117
4.3	HNO-vermittelte Effekte in Prkg1-C117 und Prkg1-C195S KI-Mäusen.....	118
4.4	Charakterisierung der Prkg1-C117/195S KI-Mäuse.....	120
4.5	Ausblick.....	124
5	Zusammenfassung	126
5.1	Abstract.....	128
6	Literaturverzeichnis	130
II.	Danksagung	143
III.	Lebenslauf	145
IV.	Eidesstattliche Erklärung	148

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar (10 ⁻⁶ mol/l)
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACh	Acetylcholin
APS	Ammoniumpersulfat
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1
b.p.	Basenpaar
BCA	Bicinchoninsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BHQ1	Black Hole Quencher 1
BK _{Ca} -Kanal	Ca ²⁺ abhängiger Kaliumkanal
BSA	Bovine Serum Albumin
C42	Cystein 42
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Cyanine 3 Phosphoramidite
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure Tetranatriumsalz
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO Mäuse	Knockout Mäuse
l	Liter
LocNA	geschlossene Nukleinsäure

LZ-Domäne	Leucin-Zipper-Domäne
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ •7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MLC	Myosin-leichte Kette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mM	Millimolar (10 ⁻³ mol/l)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Myosin ATPase	Myosin Adenosin-Triphosphatase
MYPT1	Myosin-bindende Untereinheit 1 Myosinphosphatase
NaCl	Natriumchlorid
NaDOC	Natriumdesoxycholat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCA	1.6.1 1-Nitrosocyclohexylacetat
ng	Nanogramm
Ni-NTA	nickelgeladenes Affinitätsharz
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ODQ	1H-(1,2,4)oxidiazolol(4,3-a)quinoxaline-1-on
OH ⁻	Hydroxylanion
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PDE.....	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA.....	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC.....	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLN	Phospholamban
pmol	Pikomolar (10 ⁻¹² mol/l)
PSS.....	physiologische Kochsalzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RGS2	Regulator des G-Proteins Signalwegs 2
RhoA	Ras-homologes Familienmitglied A
RIPA.....	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm.....	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RyR.....	Ryanodinrezeptor
SAH.....	Systemische arterielle Hypertonie
SDS.....	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE.....	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SERCA.....	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
sGC.....	Lösliche Guanylylcyclase
SM-MHC11	Glatte Muskulatur-Myosinschwerkette 11

SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine
SNP	Natrium-Nitroprussid, Natriumnitroprussid
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TaqMan PCR	TaqMan Polymerase Kettenreaktion
TCEP	3,3',3''-Phosphinidin-triisopropionsäure-hydrochlorid
Thr.....	Threonin
Tris.....	Trizma®-Base
TRP-Kanal.....	Transient-Rezeptor-Potential-Kanal
v/v	Volumenprozent
VASP	VAsodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VSMCs	Glatte Gefäßmuskelzellen
w/v.....	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
α -SMA	α -glattes-Muskel-Aktin
β -Blocker	β -Adrenozeptorblocker

1 Einleitung

1.1 Hypertonie und zugrundeliegende Ursachen

Die systemische arterielle Hypertonie (SAH) ist ein weltweit verbreiteter und modulierbarer Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die SAH zeichnet sich durch einen dauerhaft hohen systolischen (≥ 140 Millimeter Quecksilbersäule - mmHg) und einen hohen diastolischen (≥ 90 mmHg) Blutdruck aus (Mancia et al. 2023). Dauerhafter Bluthochdruck führt zu einer Schädigung der Gefäße und somit zum Auftreten und der Entstehung verschiedener Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, Herzinfarkt mit häufig daraus resultierender Herzinsuffizienz und anderen Gefäß- und Nierenerkrankungen (Olsen et al. 2016). Über 1,28 Milliarden Menschen weltweit, darunter ca. 25% der Frauen und 33% der Männer in Deutschland, im Alter zwischen 29 und 79 Jahren erkranken an SAH (Zhou und Collaborators 2021). Hypertonie zusammen mit Prähypertonie (>115 mmHg) sind jährlich verantwortlich für 8,5 Millionen Todesfälle weltweit (Zhou et al. 2021).

Die Hypertonie lässt sich in primäre, auch essentielle Hypertonie genannt, an der ca. 90-95% der Patienten erkranken (Oparil et al. 2018), und die sekundäre Hypertonie unterteilen. Sekundäre Hypertonie entsteht als Folge einer Vorerkrankung, beispielsweise Erkrankungen der Nieren oder des endokrinen Systems. Die primäre Hypertonie zeigt dagegen keine organische Ursache für den Bluthochdruck. Ihre Entstehung ist jedoch abhängig von komplexen Interaktionen zwischen genetischer Veranlagung, Umweltfaktoren, Lebensstil und Alterungsprozessen (Titze und Luft 2017, Padmanabhan und Dominiczak 2021, Kelly et al. 2022) (Abb. 1.1). Daher wird oft von einer polyätiologischen Genese der essentiellen Hypertonie gesprochen. Alle diese Faktoren führen zu Veränderungen der kardiovaskulären Regulationssysteme und bewirken bei den meisten Bluthochdruckpatienten eine Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstandes, resultierend in einem Blutdruckanstieg (Oparil et al. 2018).

Veränderungen an mehreren Blutdruckregulationssystemen sind an der Entstehung der Hypertonie beteiligt. Dazu gehören eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), des autonomen Nervensystems, die vermehrte Produktion von natriuretischen Peptiden und parakrine Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel die endotheliale Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) (Mancia und Grassi 2014, Olsen et al.

2016, Jordan et al. 2018, Oparil et al. 2018), die bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie aufgrund der entkoppelten endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) eingeschränkt ist (Li et al. 2015).

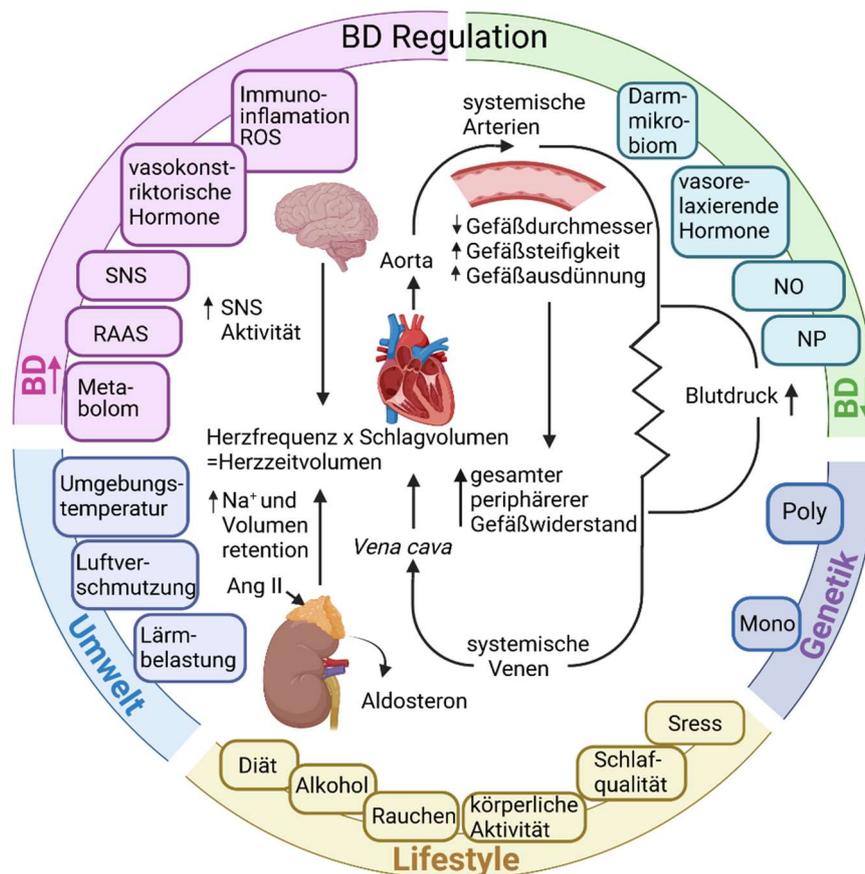


Abb. 1.1: Multiple Einflussfaktoren bei der Regulation des Blutdrucks. BD: Blutdruck, NP: natriuretische Peptide, RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron System, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, SNS: sympathisches Nervensystem. Modifiziert nach Mancina (2023) und erstellt mit BioRender.com.

Das autonome Nervensystem, vor allem eine Sympathikus-Überaktivierung führt zur Blutdruckerhöhung auf verschiedenen Wegen:

- Steigerung des Herzzeitvolumens (die Blutmenge, die vom Herzen pro Minute gepumpt wird) durch die positive inotrope und chronotrope Wirkung des β_1 -Adrenozeptors.
- Vasokonstriktorische Wirkung durch Stimulation der α_1 -Adrenozeptoren in Gefäßen.

- Aktivierung der Reninsekretion (diese ist auch β_1 -Adrenozeptor abhängig) in der Niere und dadurch induzierte RAAS Aktivierung.

Außerdem kommt es bei Sympathikus-Überaktivierung und einigen anderen Reizen (z.B Blutdruckabfall) unter anderem zur Bildung von Vasopressin durch die Hypophyse im Gehirn. Dieses Hormon stimuliert die Freisetzung von Renin in der Niere (Szczepanska-Sadowska et al. 2021). Die Hauptfunktion von Renin ist die Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) spaltet Angiotensin I zu Angiotensin II, das im Mittelpunkt der pathogenetischen Rolle des RAAS bei Bluthochdruck steht. Angiotensin II ist in der Lage, die Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde zu stimulieren. Dies führt zu Natrium- (Na^+) und Wasserretention und somit zu einer Blutvolumensteigerung (Oparil et al. 2018). Außerdem ist Angiotensin II einer der stärksten Vasopressoren, der über seine Rezeptoren in Gefäßen zur Vasokonstriktion und dadurch zu einer Blutdruckerhöhung führt. Weiterhin kann eine chronische Sympathikus-Überaktivierung auch zu einer Insulinresistenz und metabolischen Veränderungen führen, die wiederum zum Blutdruckanstieg beitragen (Landsberg 2001).

In den letzten Jahren wurde auch eine wichtige Rolle des Immunsystems mit der Entstehung der Hypertonie in Verbindung gebracht (Harrison und Gongora 2009, Mancina und Grassi 2014, Griendling et al. 2021). Insbesondere kommt es hier zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (eng. reactive oxygen species, [ROS]) in Immunzellen, die Entzündungsprozesse fördern und Gefäßschädigungen verursachen. Die übermäßige Salzaufnahme mit der Nahrung, Mikrobiomveränderungen im Darm und ein hoher Aldosteronspiegel wirken proinflammatorisch und tragen zur Entstehung von Mikro- und Makroangiopathien bei. Alle diese Faktoren führen zur Entwicklung der Hypertonie (Hengel et al. 2022).

Die pathologischen Veränderungen finden sowohl auf der Ebene der Makro- als auch der Mikrozirkulation statt und können sich gegenseitig verstärken (Laurent et al. 2022). Da mehrere pathophysiologische Mechanismen an der Entstehung der Hypertonie beteiligt sind, scheint es besonders sinnvoll, eine Kombination von Medikamenten mit unterschiedlichen Angriffspunkten einzusetzen. Dies erfordert auch die Suche nach neuen Wirkstoffen, welche diese verschiedenen Regulationsmechanismen therapeutisch adressieren können und somit eine Möglichkeit bieten, Hypertonie noch effektiver zu behandeln. Außerdem gibt es einen

großen Bedarf bei Therapierefraktären Patient*innen, die sich trotz der bewährten Pharmakotherapie nicht in normotensive Blutdruckbereiche einstellen lassen.

1.2 Aktuelle leitlinienkonforme Behandlung der Hypertonie

Zur Erstlinientherapie der SAH gehören vor allem solche Antihypertensiva wie β -Adrenozeptorblocker (β -Blocker), ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp1-(AT₁) Antagonisten, Ca²⁺-Kanal-Blocker vom Dihydropyridine-(L-Typ) und Thiazid Diuretika. Diese Substanzen senken den Blutdruck entweder durch Verminderung des Herzzeitvolumens (β -Blocker), Hemmung des RAAS und seiner Wirkungen (ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten), Hemmung des Ca²⁺ Einstroms in die VSMCs (L-Typ Ca²⁺-Kanal Blocker) oder durch Senkung des Blutvolumens (Diuretika). Nebenwirkung von Antihypertensiva sind vielfältig. Dazu gehören Hyperkaliämie, allergischer Husten und das Angioödem (ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten), Veränderung der Ionenhomöostase (Diuretika), bronchiale Obstruktion, meist bei Patienten mit Asthma und Störung der kardialen Reizweiterleitung (β -Blocker) (Oparil et al. 2018, Visseren et al. 2021).

Bei der Zweitlinientherapie werden unter anderem verschiedene nitrovasodilatorisch wirkende Substanzen eingesetzt. Der Signalweg der im Fokus dieser Arbeit steht, wird durch diese Nitrovasodilatoren aktiviert. Diese Substanzen werden als NO Donoren bezeichnet und ihre vasorelaxierende Wirkung beruht auf der Freisetzung von NO. Zu dieser Gruppe gehören organische Nitrate wie z.B. Glyceroltrinitrat (GTN), auch Nitroglycerin genannt, Natriumnitroprussid (eng. sodium nitroprusside [SNP]), S-Nitrosothiole (z.B. S-nitroso-N-Acetylpenicillamin [SNAP]) und viele andere NO Donoren. Sie sind potentiell in der Lage, die schädliche Auswirkung einer mangelhaften NO Produktion der ineffizienten eNOS auszugleichen. Jedoch ist der Einsatz dieser Medikamentengruppe meist auf die stationäre akute Behandlung der Hypertonie, z.B. durch Infusion von SNP beschränkt. Die klinische Wirksamkeit der klassischen NO Donoren ist erheblich eingeschränkt durch ihre kurze Halbwertszeit, schlechte zielgerichtete Wirkung und Toxizität. Insbesondere zur Behandlung von chronischer Hypertonie sind NO Donoren wie GTN nicht geeignet, da sie zu einem sogenannten „Toleranz-Phänomen“ führen. Dieses Phänomen beruht darauf, dass bei gleichbleibender Einnahme des Arzneistoffes eine verringerte oder ausbleibende therapeutische Wirkung erreicht wird und somit höhere Dosen eingesetzt werden müssen, die

wiederum mit einem erheblichen Risiko für das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen wie dem „Nitrat-Kopfschmerz“ einhergehen.

Die Entstehung der Nitrat-Toleranz ist nicht genau geklärt, genauso wie die Frage, warum sich im Laufe der Behandlung ein Verlust der klinischen Wirksamkeit manifestiert. Einige Arbeitsgruppen (Münzel et al. 2005, Esplugues et al. 2006, Wenzel et al. 2008, Münzel et al. 2011) konnten jedoch eine mögliche Erklärung des molekularen Mechanismus der Nitrat-Toleranz beschreiben. Bereits innerhalb eines Tages unter Behandlung mit GTN kommt es zuerst reflektorisch zu neurohormonaler Aktivierung vasokonstriktorischer Signale. Diese Aktivierung führt sowohl zur erhöhten Ausschüttung von Katecholaminen und Vasopressin als auch zur Erhöhung des intravasalen Volumens und zur Produktion von Angiotensin II durch das RAAS. Diese erste gegenregulatorische Reaktion des Körpers wird als Pseudotoleranz bezeichnet (Münzel et al. 2005). Eine Langzeitbehandlung dagegen induziert Nitrat-Toleranz und vaskuläre Dysfunktionen durch unterschiedliche Mechanismen. Angiotensin II kann über die Protein Kinase C (PKC) eNOS entkoppeln oder auch über PKC NADPH-Oxidase (NOX) aktivieren, was wiederum zur eNOS Entkopplung führt, resultierend in einer vermehrten ROS Produktion und Desensibilisierung der sGC. Weiterhin wird vermutet, dass GTN die Produktion von mitochondrialen ROS stimulieren kann. Die mitochondriale ROS aktivieren wiederum PKC und NOX, was erneut in eNOS Entkopplung und Desensibilisierung der sGC resultiert (Wenzel et al. 2008). Chen et al. identifizierten dabei einen wichtigen enzymatischen Mechanismus der Bioaktivierung von GTN. Sie konnten zeigen, dass die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) primär für die GTN Bioaktivierung verantwortlich ist. GTN in hohen Konzentrationen war in der Lage, zumindest *in vitro*, ALDH-2 Aktivität zu hemmen, was wiederum zur verminderten Umwandlung von GTN zu NO führte (Chen et al. 2002).

1.3 Blutdruckregulation

Die Aufrechterhaltung der physiologischen Blutdruckregulation ist ein komplexes Zusammenspiel multipler Faktoren (Olsen et al. 2016, Oparil et al. 2018). Hierzu zählen das Blutvolumen, das Herzzeitvolumen sowie die Balance zwischen Vasokonstriktion und Vasorelaxation. Die NO-abhängige Regulation und die daraus resultierende Vasorelaxation, vermittelt durch die Aktivierung der zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängigen Proteinkinase G (PKG) spielen dabei eine wichtige Rolle.

1.3.1 Die endotheliale NO-Synthese

NO ist ein gasförmiges Signalmolekül in biologischen Prozessen (Derbyshire und Marletta 2012). Es moduliert eine Vielzahl von physiologischen Funktionen, darunter den Gefäßtonus, die Darmmotilität, die Thrombozytenaggregation, die Zellproliferation, die Apoptose und die Neurotransmission (Schlossmann et al. 2003). Die Bildung von NO wird in Endothelzellen durch den Blutfluss und die daraus resultierenden Scherkräfte auf die Gefäßwände stimuliert (Abb. 1.2). Dies führt zur Ausschüttung von unterschiedlichen Zirkulationsfaktoren wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin oder Substanz P (Förstermann und Sessa 2012). Diese Zirkulationsfaktoren binden spezifisch an ihre G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die sich auf der Endothelzellmembran befinden. Die α -Untereinheit von Gq-Protein, die an den GPCR bindet, vermittelt die Stimulation der Phospholipase C (PLC). PLC wiederum hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 erhöht den intrazellulären Calciumspiegel durch Bindung an IP_3 -Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (ER) (Kim et al. 2021). Zusätzlich führt dies zur Aktivierung der Transient-Rezeptor-Potential (TRP)-Kanäle und somit zum verstärkten Einstrom von Ca^{2+} durch diese Kanäle (Yao und Garland 2005). Dies führt dazu, dass Calcium (Ca^{2+}) und Calmodulin (CaM) einen Komplex bilden und die CaM-bindende Domäne der eNOS aktivieren (Zhao et al. 2015). eNOS katalysiert die NO-Synthese aus der Aminosäure L-Arginin unter Abspaltung der Aminosäure L-Citrullin und Wasser. Die Produktion von NO wird durch verschiedene Kofaktoren unterstützt, unter anderem von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH_4), Flavinmononucleotid und Eisenprotoporphyrin IX (Alderton et al. 2001).

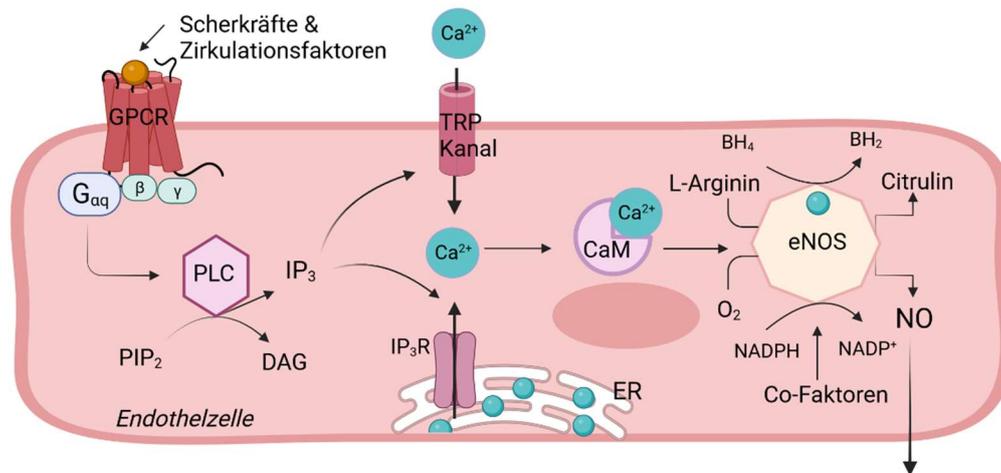


Abb. 1.2: Ca^{2+} abhängige Stimulation und Produktion von NO in Endothelzellen. Zirkulationsfaktoren wirken auf ihre GPCR Rezeptoren auf der Membran der Endothelzelle. Dadurch kommt es zur Stimulation der PLC und zur Produktion von IP_3 . Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird durch IP_3 -Bindung am IP_3 -Rezeptor erhöht. Ca^{2+} interagiert daraufhin mit CaM und bildet einen Komplex, welcher unter anderem zur Aktivierung der CaM-bindenden Domäne von eNOS und zur Produktion von NO führt. Modifiziert nach Zhao (2015) und erstellt mit BioRender.com

NO diffundiert daraufhin durch die Zellmembran in benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen (eng. vascular smooth muscle cells [VSMCs]), bindet dort an den Häm-Kofaktor von der NO-sensitiven Guanylylcyclase (sGC) und stimuliert die katalytische Aktivität des Enzyms, aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) cGMP als zweiten Botenstoff herzustellen (Warner et al. 1994, Gewaltig und Kojda 2002, Burgoyne et al. 2012b). cGMP ist in der Lage, mehrere Effektorproteine zu aktivieren. Dazu gehören unter anderem Phosphodiesterasen (PDEs), cGMP-gesteuerte Ionenkanäle und PKG. Die Aktivierung von PKGI induziert eine Substratphosphorylierung in VSMCs. Dies führt zu einer Vasorelaxation der Blutgefäße, indem es zu einer verringerten Ca^{2+} -Sensitivität (Desensitisierung) der Myofilamente und zum Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt, resultierend in einem abgeschwächten Querbrückenzyklus (Sauzeau et al. 2000, Wooldridge et al. 2004)

1.3.2 PKGI vermittelte Vasorelaxation

PKG1 spielt eine zentrale Rolle in der NO-abhängigen Signalübertragung, insbesondere in Bezug auf die Senkung des Blutdrucks. Es wurden dabei mehrere PKGI-Substrate identifiziert, deren Phosphorylierung zu einer Relaxation von VSMCs führt (Hofmann et al. 2000). Dazu

gehören unter anderem die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), das IP₃-Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinase Substrat (IRAG), der Ca²⁺ abhängige Kaliumkanal (BK_{Ca}-Kanal) und das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) (Abb. 1.3).

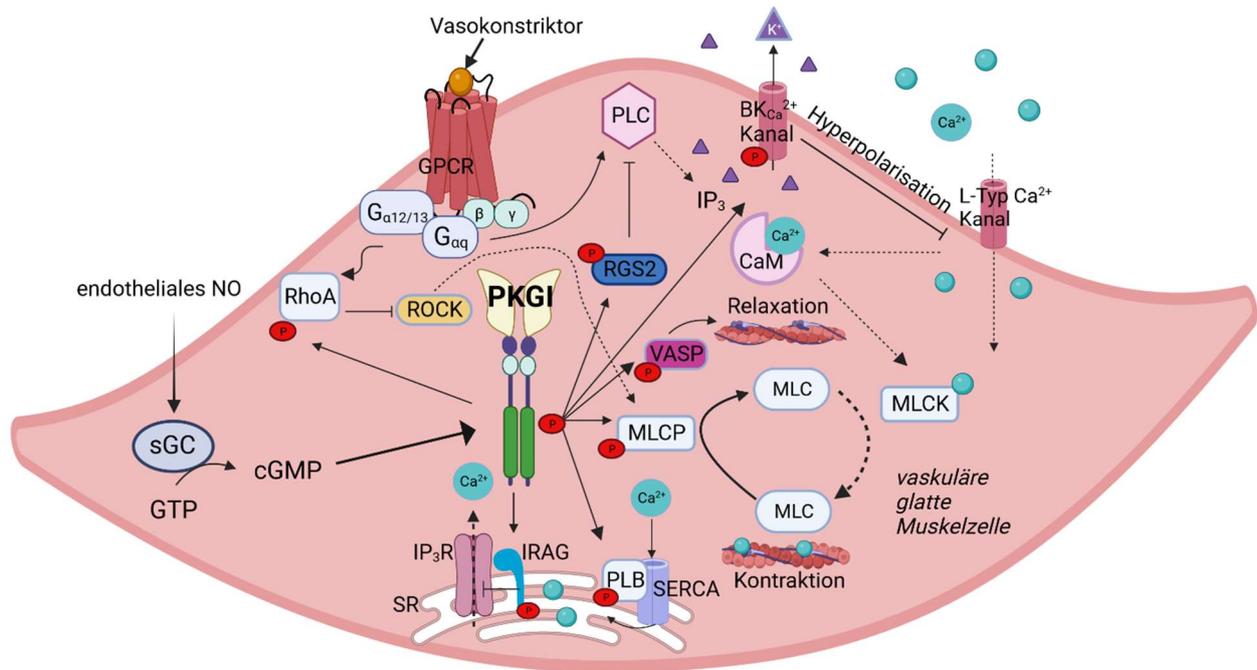


Abb. 1.3: PKGI-induzierte Vasorelaxation und die beteiligten Signalwege und Mechanismen. Inhibitorische Wirkung der PKG-vermittelten Phosphorylierung: gestrichelte Linie; aktivatorische Wirkung der PKG-vermittelten Phosphorylierung: durchgezogene Linie. Modifiziert nach Burgoyne 2010 und Schlossmann 2003, erstellt mit BioRender.com.

Die PKGI abhängige Phosphorylierung von IRAG hemmt den IP₃-Rezeptor und vermindert somit eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Schlossmann et al. 2000). Außerdem hemmt PKGI die PLC-vermittelte IP₃ Synthese durch die Phosphorylierung des „Regulators des G-Proteins Signalwegs 2“ (eng. regulator of G-protein signalling 2 [RGS2]). Diese Phosphorylierung erhöht die GTPase-Aktivität von Gαq, was letztlich die PLC Aktivierung vermindert (Obst et al. 2006, Osei-Owusu et al. 2007).

MLCP wirkt als Gegenspieler der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (eng. Myosin light chain kinase [MLCK]). MLCK wird durch einen Ca²⁺ Anstieg aktiviert. Diese phosphoryliert die Myosin-Leichtkette (MLC) und aktiviert dadurch die Myosin Adenosin-Triphosphatase (Myosin ATPase). Es kommt zu einer vermehrten Aktin-Myosin-Interaktion und somit zu einer Vasokonstriktion (Stull et al. 1991). Eine verminderte Ca²⁺-Konzentration in den VSMCs

bewirkt dagegen die MLCK-Inaktivierung und die PKGI-vermittelte MLCP-Phosphorylierung am Serin (Ser) 695 und Ser 852 (Surks et al. 1999, Wooldridge et al. 2004). Diese Phosphorylierung erfolgt durch die Interaktion zwischen Leucin-Zipper-Domäne (LZ-Domäne) von PKGI und der regulatorischen Untereinheit Myosin-bindende Untereinheit 1 (eng. myosin phosphatase targeting subunit 1 [MYPT1]) der MLCP (Somlyo und Somlyo 2003). Dies führt zu einer vermehrten MLC-Dephosphorylierung und resultiert in einer Vasorelaxation (Schlossmann et al. 2003). Nicht nur die Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} ist entscheidend für die Kontraktion und Relaxation der Zellen, sondern auch das Verhältnis der Aktivität der MLCK und MLCP. Diese Aktivitätsänderung beeinflusst die Ca^{2+} -Sensitivität der VSMCs (Kitazawa et al. 1991, Somlyo und Somlyo 2003).

Ein weiterer Mechanismus zur Senkung des intrazellulären Ca^{2+} in VSMCs ist die direkte Phosphorylierung von BK_{Ca} -Kanälen durch PKGI. Diese führt zu einer vermehrten Öffnung des Kanals und somit zum Kalium-Export aus der Zelle (Alioua et al. 1998, Fukao et al. 1999). Dadurch wird eine Hyperpolarisation der Zelle bewirkt, die zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom durch die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle führt (Gewaltig und Kojda 2002). Als Folge nimmt die Kontraktion der VSMCs ab.

Ein Gegenspieler der PKGI ist Rho-Kinase (ROCK). ROCK kann Ca^{2+} unabhängig MYPT1 an Threonin (Thr) 696 und Thr 853 phosphorylieren und inhibieren (Wooldridge et al. 2004). Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von MLC und zur vermehrten Aktin-Myosin Interaktion, die in Vasokonstriktion resultiert. ROCK wird durch das Ras-homologe Familienmitglied A (eng. Ras homolog family member A [RhoA]) und die Stimulation von GPCR mit einem Vasokonstriktor aktiviert. PKGI kann durch Phosphorylierung von RhoA am Ser 188 in den Signalübertragungsweg von RhoA-ROCK eingreifen und somit verstärkt zu einer Vasorelaxation führen (Sawada et al. 2001, Sauzeau et al. 2003).

Phospholamban (PLN) ist ein Substrat von PKGI nicht nur in Herzmuskelzellen (Frantz et al. 2013, Moltzau et al. 2013) sondern auch in VSMCs (Cornwell et al. 1991, Lalli et al. 1999, Burgoyne und Eaton 2010). Unphosphoryliertes PLN hemmt die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA). Dies führt dazu, dass SERCA weniger Ca^{2+} ins sarcoplasmatische Retikulum pumpt. Dadurch steht vermehrt zytosolisches Ca^{2+} für die Kontraktilität der VSMCs zur Verfügung. PLN Phosphorylierung durch PKGI am Ser16 führt zu einer Aufhebung der Hemmung von SERCA und zur Relaxation der Zelle. Lalli et al. (1997) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Aorten, welche aus PLN Knockout (KO) Mäusen isoliert wurden, eine verminderte Vasokonstriktion

auf Kaliumchlorid (KCl) und Phenylephrin aufweisen (Lalli et al. 1997). Diese Publikation unterstützt somit die Hypothese, dass PLN auch in VSMCs SERCA hemmen und die Vasokonstriktion vermindern kann. Allerdings fehlen momentan neben *in vitro/ex vivo* Untersuchungen (Cornwell et al. 1991, Lalli et al. 1999) weitere *in vivo* Arbeiten, um die Rolle von cGMP/PKGI-abhängiger PLN-Phosphorylierung im Kontext von VSMCs und die daraus resultierende Vasorelaxation direkt zu belegen.

VASP ist ein 46 kDa großes regulatorisches Aktin-bindendes Protein, das zu der Familie der Enable/Vasodilator-stimulated Phosphoproteine (Ena/VASP) gehört (Sechi und Wehland 2004) und durch PKGI an Ser 239 (humanes VASP) phosphoryliert wird (Profirovic et al. 2005). Zusammen mit seinem Familienmitglied, dem Protein Mena, ist es an der Regulation der Vasorelaxation in VSMCs beteiligt. Daten, die kürzlich veröffentlicht wurden, zeigen eine stark verminderte Relaxation der Aortenringe bei VASP- und insbesondere bei VASP/Mena-KO Mäusen. Obwohl die genauen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, wird vermutet, dass die PKGI-vermittelte VASP-Phosphorylierung in einer verminderten Aktin Polymerisierung resultiert. Dies führt zu einer weniger ausgeprägten Interaktion zwischen Aktin und Myosin und somit auch zur Vasorelaxation (Benz et al. 2023).

Zusammenfassend bewirkt die Aktivierung von PKGI in Zellen der glatten Muskulatur die Phosphorylierung mehrerer Substrate, die die Ca^{2+} -Empfindlichkeit kontraktile Proteine und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase regulieren. Dies bewirkt eine verringerte Aktin-Myosin-Interaktion und somit eine vermehrte Vasorelaxation.

1.4 PKG, Struktur und Regulation

PKG ist eine in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimierte Kinase (Hofmann und Wegener 2013). Zusammen mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) und der PKC gehört sie zur Familie der AGC-Proteinkinasen (Arencibia et al. 2013). Zwei unterschiedliche Gene *Prkg1* und *Prkg2* kodieren für zwei Isoformen der PKG-Familie PKGI und PKGII, welche den humanen Genen *PRKG1* und *PRKG2* entsprechen und eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Maus und Mensch aufweisen (Francis und Corbin 1994, Hofmann et al. 2000). PKGI α und I β sind Spleißvarianten des *Prkg1* Gens, welche sich in den N-terminalen 100 Aminosäuren unterscheiden (Wernet et al. 1989), resultierend in unterschiedlicher cGMP-Affinität, Substratspezifität und subzellulärer Lokalisation (Ruth et al. 1997, Surks et al. 1999, Hofmann et al. 2000). PKGI α ist die Hauptisoform, die im

Herzen, in glatten Muskelzellen des Uterus, in Blutgefäßen, in der Lunge, im Kleinhirn, im Darm und in der Luftröhre vorkommt. PKGI β wird dagegen hauptsächlich in Blutplättchen exprimiert (Geiselhöringer et al. 2004). PKGI β wird durch das Gen *Prkg2* kodiert und ist durch die Myristoylierung an der Plasmamembran verankert (Vaandrager et al. 1996). Dagegen liegen PKGI α und PKGI β hauptsächlich frei im Zytosol vor (Francis et al. 2010). PKG ist an wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt und trägt nicht nur zur Regulation des Blutdrucks bei, sondern auch zu neuronaler Adaption, Lernprozessen und zur Hemmung der Blutplättchenaggregation. Besonders eindrücklich sind Studien, die an PKG KO-Mäusen durchgeführt wurden und die spezifischen physiologischen Funktionen dieser Kinase demonstrieren. KO-Mäuse wiesen nach der Geburt eine verkürzte Lebensdauer von maximal 6 Wochen und eine erhöhte Mortalität von ca. 50% auf. Sie zeigten multiple Defekte verschiedener Organe, eine gestörte, verlangsamte Darmperistaltik (Pfeifer et al. 1998) und eine beeinträchtigte Hemmung der Plättchenaggregation (Massberg et al. 1999).

1.4.1 Struktur der PKGI α

PKGI α ist eine Ser/Thr-Kinase (Hofmann und Wegener 2013). Sie liegt in der Zelle als konstitutiver Homodimer (150 kDA) vor, bestehend aus zwei parallel ausgerichteten Monomeren (Abb. 1.4). Jeder Monomer besitzt eine regulatorische N-terminale Domäne und eine katalytische Domäne in der C-terminalen Region der Kinase (Monken und Gill 1980, Takio et al. 1984, Francis und Corbin 1994, Hofmann 2005). Die katalytische Domäne beinhaltet eine Subdomäne, die Magnesium/ATP bindet, sowie eine substratbindende Subdomäne (Francis et al. 2010). PKGI α phosphoryliert Substrate an der Konsensussequenz (R/K)-(R/K)-X-(S/T), wobei X für eine beliebige Aminosäure steht (Kennelly und Krebs 1991).

Die regulatorische Domäne beinhaltet einen Leucin-Zipper (α -Helix Motiv), eine überlappende autoinhibitorische und autophosphorylierte Subdomäne (AI) sowie eine cGMP-bindende Subdomäne mit aufeinanderfolgender hochaffiner „A“ und niederaffiner „B“ Bindestelle. Diese Bindestellen werden auch als zyklische Nukleotid-Bindungsdomänen A und B (CNB-A und CNB-B) bezeichnet und binden bevorzugt cGMP (>100-fach erhöhte Selektivität), aber auch cAMP (Francis et al. 2010).

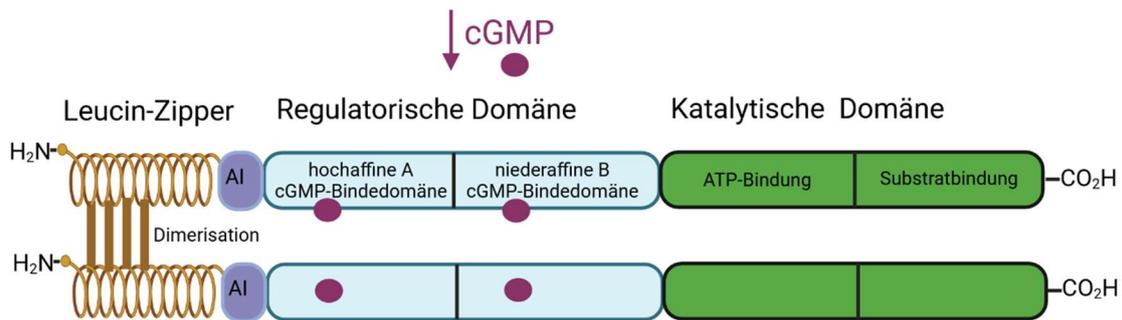


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der dimeren Struktur von PKGI α . Die Kinase besteht aus einer regulatorischen (N-terminale Region) und einer katalytischen Domäne (C-terminale Region). Die katalytische Domäne wird in ATP- und substratbindende Subdomänen unterteilt. Die regulatorische Domäne besteht aus einem Leucin-Zipper Motiv, einer AI Subdomäne sowie einer cGMP-bindenden Subdomäne mit einer hochaffinen A und einer niederaffinen B cGMP-Bindestelle.

Die Bindung von zyklischen Nukleotiden führt zur Strukturveränderung der regulatorischen Domäne. Dies induziert allosterisch eine Konformationsänderung der Kinase, die Freisetzung der katalytischen Domäne und eine vermehrte Aktivierung mit daraus resultierender Substratphosphorylierung. Eine maximale Aktivität ist erreicht, wenn alle vier cGMP-Bindestellen des Kinase-Dimers besetzt sind (Chu et al. 1997, Wall et al. 2003, Alverdi et al. 2008). In Abwesenheit von cGMP wird die Kinaseaktivität durch eine autoinhibitorische Subdomäne unterdrückt, da diese in direktem Kontakt mit der katalytischen Subdomäne steht. Die autoinhibitorische Subdomäne enthält eine Aminosäuresequenz, die eine Substratbindung imitiert und als sogenanntes Pseudosubstrat bezeichnet wird (Alverdi et al. 2008). Dieselbe N-terminale Subdomäne beinhaltet mehrere Autophosphorylierungsstellen. Diese Phosphorylierung führt zur Erhöhung der cGMP-Affinität und Kinaseaktivität bei niedrigeren cGMP-Konzentrationen (Francis et al. 2010). Die N-terminale Leucin-Zipper-Domäne von PKGI α ermöglicht die Homodimerisierung und vermittelt Substratspezifität. Sie ist außerdem für die subzelluläre Lokalisierung der Kinase zuständig und verstärkt die Affinität für cGMP (Surks et al. 1999, Sharma et al. 2008). Diese Domäne umfasst fünf Heptad-Wiederholungen, die durch hydrophobe Reste und ein ausgedehntes Netz von Wasserstoffbrücken stabilisiert wird (Sharma et al. 2008).

1.4.2 ROS und ihr Einfluss auf regulatorische Signalwege

Die endogene Produktion von Oxidantien kann durch verschiedene zelluläre Prozesse erfolgen. Die Entstehung von ROS steht dabei im Mittelpunkt der oxidativen Modifikation von Signalwegen. ROS sind hochreaktive chemische Spezies, die Sauerstoff enthalten und physiologisch in den Zellen als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels oder als toxische Moleküle der Immunabwehr entstehen (Nishikawa et al. 2000, Thomas et al. 2008, Mittal et al. 2014). Dazu gehören Spezies mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen wie Hydroxyl (OH^\cdot)- oder Superoxidanionen (O_2^\cdot) und Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) das weiterhin zu Hydroxylradikalen abgebaut werden kann. Sauerstoff kann sowohl zur Bildung anderer ROS wie H_2O_2 und OH^\cdot führen als auch mit NO zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagieren (Pacher et al. 2007). Unter normalen physiologischen Bedingungen können ROS als Signalmoleküle fungieren und unterschiedliche Kriterien der dynamischen Regulierung der Proteinfunktion erfüllen (DeYulia et al. 2005, Veal et al. 2007). Die Konzentration an ROS wird dabei durch enzymatischen Abbau streng kontrolliert. Beim oxidativen Stress kommt es zu einer Dysregulation zwischen der Produktion von ROS und den endogenen antioxidativen Abwehrmechanismen, resultierend in einem starken Anstieg an ROS und einer erschöpften Reduktionsaktivität (D'Oria et al. 2020). Oxidativer Stress ist nachweislich von entscheidender Bedeutung für die Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Diabetes, Bluthochdruck, Krebs, neurodegenerativen und inflammatorischen Erkrankungen (Sorescu und Griendling 2002).

Im Organismus gibt es eine Vielzahl von Quellen aus denen ROS freigesetzt werden kann, darunter Mitochondrien, Xanthinoxidoreduktase, NOS und NOX. In Mitochondrien entsteht ROS als Nebenprodukt der Respiration. ROS wird dabei hauptsächlich am Komplex I und III der Elektronentransportkette gebildet. Die Xanthinoxidoreduktase induziert die Produktion von ROS unter proinflammatorischen Bedingungen, indem sie die Funktion einer Oxidase einnimmt und Xanthin zu Harnsäure unter Freisetzung von H_2O_2 und O_2^\cdot umwandelt (Kuwabara et al. 2003, Nishino et al. 2005). NOX produziert ROS während der Reduktion von Sauerstoff zu O_2^\cdot unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator (Lambeth 2004). NOX spielt eine entscheidende Rolle bei der Entkopplung von eNOS. Unter oxidativem Stress erhöht eine NOX-Aktivierung die lokale Produktion von ROS, welche BH_4 oxidieren und so einen BH_4 -Mangel auslösen (Smith et al. 2013) kann. BH_4 unterstützt den Zusammenbau von eNOS-Monomeren zu einem aktiven Dimer. Ein Mangel an BH_4 führt dazu, dass der Elektronentransfer von der C-terminalen Reduktasedomäne zur N-terminalen

Oxygenasedomäne des anderen eNOS-Monomers unterbunden wird, resultierend in einer Destabilisierung der Synthase (Bauersachs und Schäfer 2005, Cai et al. 2005). Die Elektronen werden dabei zu molekularem Sauerstoff anstatt zu L-Arginin umgeleitet, was zur O_2^- -Bildung und zur Entkopplung von eNOS führt (Xia et al. 1996, Kuzkaya et al. 2003). Dadurch produziert eNOS vermehrt O_2^- anstelle von NO (Zweier et al. 2011). Die O_2^- Produktion durch die entkoppelte eNOS hält den oxidativen Stress im Gefäßsystem weiter aufrecht. Das hochreaktive O_2^- verbindet sich mit NO zu $ONOO^-$ und fördert zusätzlich die Oxidation von BH_4 zu BH_2 (Incalza et al. 2018). Dies resultiert in endothelialer Dysfunktion, beeinträchtigter endothelabhängiger Vasorelaxation und erhöhtem Blutdruck (Li et al. 2015). In Gefäßen von hypertensiven Tieren sind vor allem die entkoppelte eNOS und die NOX für die ROS-Bildung verantwortlich. Zudem konnte gezeigt werden, dass die NOX hauptsächlich für die O_2^- Produktion in Gefäßen verantwortlich ist. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II die NOX-Aktivität sowohl in kultivierten VSMCs als auch in Gefäßen von Angiotensin II infundierten Ratten stimulieren kann. Eine wichtige Folge der vaskulären ROS-Bildung ist die Hypertrophie der VSMCs (Harrison und Gongora 2009). Mäuse mit NOX-Überexpression zeigten dementsprechend eine Hypertrophie der vaskulären Gefäßmuskulatur. Eine vermehrte Entstehung von H_2O_2 und Aktivierung von NADPH, welche zu einer prohypertrophen Wirkung führen, konnte nach Stimulation von VSMCs mit Angiotensin II *in vitro* gezeigt werden. Die Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur ist eine entscheidende Komponente des Gefäßumbaus bei Bluthochdruck.

In VSMCs kann die sGC ebenfalls durch ROS inaktiviert werden, indem ihre Fe^{2+} -Häm Gruppe zu Fe^{3+} oxidiert wird. Dabei dissoziiert die Häm-Gruppe von der sGC. Die Cyclase wird dadurch desensibilisiert und kann nur eingeschränkt NO binden (Roy et al. 2008, Sharina und Martin 2017). Die Konzentrationen von oxidiertem oder hämfreier sGC sind beim Menschen mit bestimmten kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 sowie in Tiermodellen von Bluthochdruck und Hyperlipidämie erhöht (Gladwin 2006, Stasch et al. 2006).

Die Therapie oder Prophylaxe mit Antioxidantien zeigten keine protektiven Effekte in klinischen Studien, beispielsweise bei der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder bei Bluthochdruck (Kim et al. 2002, Czernichow et al. 2005). Dies liegt möglicherweise daran, dass diese Medikamente nicht zielgerichtet wirken und nicht nur schädliche ROS entfernen, sondern auch solche, die an der normalen Zellsignalisierung beteiligt sind (Harrison und Gongora 2009). Dafür wäre es wichtig, die kompartmentenspezifischen Wirkungen von ROS

als schädliche Spezies vs. Signalmoleküle bei der Aufrechterhaltung physiologischer Körperfunktionen auf der subzellulären Ebene besser zu verstehen. Selbst wenn Oxidantien eine kausale Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen, gibt es inzwischen eine Vielzahl an Studien, die zeigen, dass diese Spezies auch als zelluläre Botenstoffe dienen und eine entscheidende Rolle bei der Funktion gesunder Gewebe oder bei der Anpassung an akute und chronische Stresssituationen spielen, die das Fortschreiten von Krankheiten begrenzen (Eaton 2006, Burgoyne et al. 2012a).

1.4.3 Oxidative Modifikation von PKGI α

Neben der klassischen NO-abhängigen Aktivierung durch cGMP kann PKGI α unabhängig von cGMP durch oxidative posttranslationale Mechanismen aktiviert werden (Landgraf et al. 1991, Burgoyne et al. 2007). Die Kinase enthält Cysteinthiole, die in deprotonierter, reaktiver Thiolatform (RS⁻-Form) vorliegen und durch ihre lokale Umgebung stabilisiert werden. Eine enge Nachbarschaft zu den basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin senkt den pK_a-Wert der Cysteinthiole und erhöht somit ihre Reaktivität. Diese Thiole verleihen der Kinase die Funktion eines Redox-Sensors (Landgraf et al. 1991, Burgoyne et al. 2007), indem sie eine Vielzahl verschiedener Modifikationen durchlaufen können. Die oxidative Modifikation eines Proteins kann generell zu einer Veränderung des Signalweges führen, abhängig von der strukturellen Proteinveränderung, aufgrund der unterschiedlichen Form und Ladungseigenschaften, die durch die Oxidation erzeugt werden (Burgoyne und Eaton 2010). Oxidative Cystein-Modifikationen, induziert durch H₂O₂ oder NO, führen zu Sulfoxidation, S-Nitrosylierung, S-Glutathionylierung und Bildung von Disulfidbindungen in Zielproteinen (Burgoyne et al. 2012a, Kemp-Harper et al. 2021). Viele dieser oxidativen posttranslationalen Modifikationen sind reversibel und können durch zelluläre reduzierende Enzyme wie Thioredoxin, Superoxid-Dismutase, Peroxiredoxin und Glutaredoxin wieder rückgängig gemacht werden (Bindoli et al. 2008).

PKGI α besitzt insgesamt 11 Cysteine (Takio et al. 1984), von denen 5 oxidativ modifiziert werden können (Prysyazhna und Eaton 2015). Die Abb. 1.5 fasst einige wichtige posttranslationale Modifikationen am Cystein 42 (C42), C117 und C195 zusammen. Die Oxidation benachbarter Cysteine 42, welche sich in der N-terminalen Leucin-Zipper Domäne der beiden Monomere von PKGI α befinden, ermöglicht die Ausbildung einer Interdisulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren. Die oxidative Modifikation an C42 führt zu einer erhöhten Substrataffinität und somit zu einer subzellulären Translokation der Kinase

(Burgoyne et al. 2007). Ein direkter Nachweis für die Erhöhung der katalytischen Aktivität der Kinase als Folge der Oxidation von C42 konnte jedoch *in vitro* bislang nicht erbracht werden (Kalyanaraman et al. 2017). Vielmehr wird davon ausgegangen, dass der Redox-Zustand dieses Thiols für die Modulation der Interaktion zwischen Kinase und ihren Substraten einen wichtigen Beitrag leistet (Prysyazhna und Eaton 2015, Scotcher et al. 2016). Auch die Knock-in (KI) Mäuse, bei denen das C42 zu nicht oxidierbarem Serin (C42S) ausgetauscht wurde, bestätigen die wichtige Funktion der Leucin-Zipper Domäne. Die C42S KI-Mäuse haben bereits basal einen erhöhten Blutdruck und zeigen eine beeinträchtigte Vasorelaxation (Prysyazhna et al. 2012). Interessanterweise sind diese Mäuse von den pathologischen Konsequenzen einer Sepsis durch Hypotonie, Organminderperfusion und Organschädigung geschützt (Rudyk et al. 2013). Die C42S KI-Mäuse sind außerdem gegen nachlastinduzierte Hypertrophie und Herzinsuffizienzentwicklung geschützt (Nakamura et al. 2015). Ein anderes Mausmodell, das auf der konstitutiven Expression von C42S basiert, zeigte eine verminderte PKGI α -abhängige Phosphorylierung von PLN an Ser16, die zu einer eingeschränkten kardialen Relaxation während der Diastole und somit zu einem beeinträchtigten Frank-Starling Mechanismus führt (Scotcher et al. 2016). Eine ausführliche *in vitro* Charakterisierung der PKGI α -C42S zeigte, dass eine 5-fach höhere cGMP Konzentration für die halbmaximale Kinaseaktivierung (auch EC₅₀ Wert oder K_{Akt} genannt) benötigt wird (Kalyanaraman et al. 2017). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise auch der *in vivo* Phänotyp dieser Mäuse zumindest teilweise durch die beeinträchtigte cGMP abhängige Aktivierbarkeit zustande kommt. Eine weitere wichtige Erklärung für die gestörte Funktion ist die Fehllokalisierung der Kinase aufgrund einer fehlenden Ausbildung der Interdisulfidbrücke und daraus resultierender verminderter Interaktion zwischen Kinase und ihren Substraten wie zum Beispiel MYPT1 und BK_{Ca}-Kanal (Burgoyne et al. 2007).

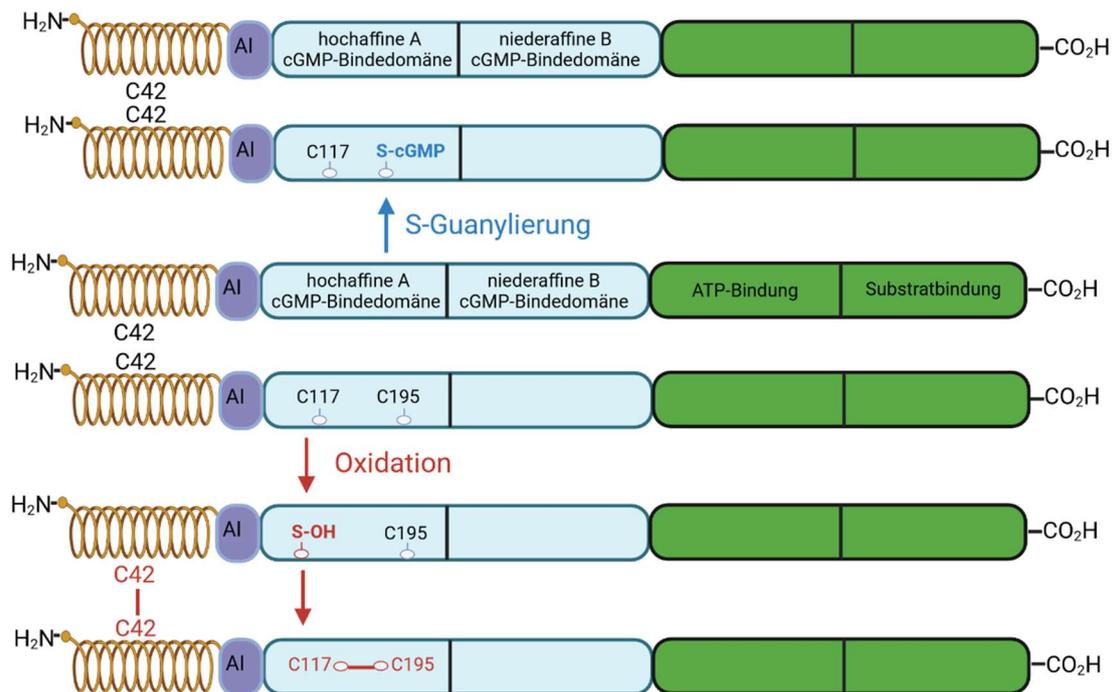


Abb. 1.5: Schematische Darstellung von PKGI α und den relevanten oxidativen Modifikationen.

Oxidantien unterschiedlicher Natur führen zur Sulfenierung von C117 und Ausbildung einer Intradisulfidbrücke zwischen C117 und C195 bzw. Interdisulfidbrücke zwischen C42 der beiden Monomere. Außerdem kann C195 in einer Reaktion mit 8-NO₂-cGMP S-guanyliert werden. Modifiziert nach Cuello und Eaton (2019) und erstellt mit BioRender.com.

In ihrer Studie untersuchten Donzelli et al. die oxidativen Modifikationen von PKGI α nach Nitroxyl (HNO) Exposition. Sie konnten nicht nur wie Burgoyne et al. (Burgoyne et al. 2007) eine HNO induzierte Interdisulfidbrücke an C42 zwischen den beiden Monomeren beobachten, sondern auch eine Intradisulfidbrücke zwischen C117 und C195, die in der hochaffinen cGMP-Bindungsstelle von PKGI α induziert wird. Die Interdisulfidbrücke liegt bereits unter basalen Bedingungen (ohne cGMP und HNO-Donor) vor und wird unter HNO Stimulation verstärkt ausgebildet. Die Intradisulfidbrücke ist jedoch besonders interessant, da sie die cGMP-Bindung imitieren kann und zur Aktivierung der Kinase führt. Die oxidative Aktivierung ist jedoch entkoppelt von der klassischen Aktivierung durch cGMP, da die Oxidation die cGMP-Affinität der Kinase senkt (Donzelli et al. 2017). Daher scheint die HNO-induzierte Intradisulfidbrücke eine interessante alternative therapeutische Strategie zur Aktivierung des PKGI α Signalwegs unter den pathophysiologischen Bedingungen zu sein. Als Beispiel sind Hypertonie und Herzinsuffizienz (Kovács et al. 2016) zu nennen, die funktionell durch

abgeschwächte sGC Aktivität und verminderte cGMP Spiegel charakterisiert sind (van Heerebeek et al. 2012, Greene et al. 2013, Pieske et al. 2014).

Die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Dostmann (Sheehe et al. 2018) konnte in ihren Arbeiten zeigen, dass die Oxidation von C117 nach Stimulation mit H_2O_2 notwendig und ausreichend ist für die konstitutive Aktivierung der Kinase, unabhängig von der Oxidation an C195. Nach ihrem Modell führt die Oxidation von C117 zu einer Bildung von Sulfensäureresten an diesem Cystein (Abb. 1.6). Diese Reste können weiter zu freien Thiolen reduziert oder zu Disulfidbrücken oxidiert werden. Die Sulfensäure kann außerdem weiter zu Sulfinensäure und Sulfonsäure irreversibel oxidiert werden. C195 kann dagegen nur eine Disulfidbrücke bilden.

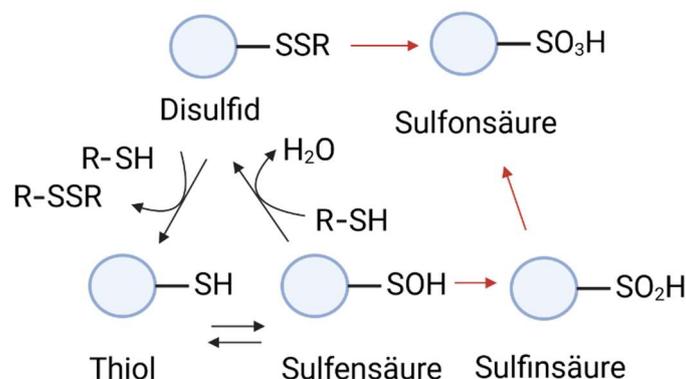


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Oxidation eines Cysteins. Das Cysteinthiol kann bei Kontakt mit einem Oxidanz multiple Modifikationen erfahren. Zusammen mit einem oxidativen Stimulus wie z.B. H_2O_2 kann das Thiol zu Sulfensäure (PSOH) reagieren. Wenn ein freies Thiol in unmittelbarer Nähe vorhanden ist, reagiert PSOH zu einem Disulfid oder wird weiterhin irreversibel zu Sulfin- (PSO₂H)- und Sulfonsäure (SO₃H) oxidiert. Modifiziert nach Sheehe (2018) und erstellt mit BioRender.com.

Die Untersuchungen der Kristallstruktur zeigten, dass C117 proximal zu einer Linker-Region ausgerichtet ist, welche die hochaffine cGMP-Bindedomäne A mit der autoinhibitorischen Domäne verbindet (Osborne et al. 2011). Diese Linker-Region enthält die basischen Aminosäuren Arginin 82 und Lysin 83. Nach dem publizierten Modell bilden diese basischen Aminosäurereste Wasserstoffbrücken oder eine Salzbrücke mit Schwefelsäureresten am C117. Dies führt zu einer Wechselwirkung zwischen C117 und der Linker-Region in PKGI α , was in einer Konformationsänderung des Linkers resultiert. Diese Veränderung führt zu einer Freisetzung des autoinhibitorischen Segments von der katalytischen Domäne, resultierend in einer konstitutiven Aktivierung.

Die Gruppe von Akaike (Akashi et al. 2016) berichtete über die S-Guanylierung von PKG α am C195. 8-Nitro-cGMP ist ein endogenes Nitroderivat von cGMP, das erstmalig im Jahr 2007 in Säugetierzellen entdeckt wurde (Sawa et al. 2007). Dieses Derivat wird unter Bedingungen gebildet, die mit der simultanen Produktion von reaktiven Stickstoffspezies und NO einhergehen. Es reguliert die zelluläre Signalübertragung und induziert posttranslationale Modifikationen, indem es als elektrophiler Second Messenger wirkt und mit redoxempfindlichen Proteinthiolen interagiert. Die Nitrogruppe von 8-Nitro-cGMP wird durch eine Thiolgruppe der Cysteinreste ersetzt. Dabei werden Nitritionen freigesetzt und es kommt zur irreversiblen Bildung von cGMP-Addukten. Dieser Vorgang wird als S-Guanylierung bezeichnet (Sawa et al. 2007, Akashi et al. 2016) und basiert darauf, dass zunächst 8-Nitro-cGMP an die hochaffine A cGMP-Bindestelle bindet, gefolgt von der S-Guanylierung am C195. Diese Reaktion bewirkt durch kovalente Bindung eine dauerhafte Aktivierung der PKG α . Auch durch *in vivo* Experimente konnte bereits unter basalen Bedingungen eine S-Guanylierung der Kinase nachgewiesen werden. Eine signifikant verstärkte S-Guanylierung der PKG α und daraus resultierende Phosphorylierung von VASP konnte nach Lipopolysaccharid-Behandlung von Mäusen gezeigt werden (Akashi et al. 2016).

Eine Vielzahl an biomedizinisch relevanten, exogen angewandten Substanzen können oxidative Modifikationen an PKG α induzieren. Dazu gehören redoxaktive Metalle (Kupfer, Silber, Eisen) und Metallionen (Landgraf et al. 1991), aber auch H₂O₂ (Burgoyne et al. 2007), Nitrosothiole (Burgoyne und Eaton 2009), Nitroglycerin (Rudyk et al. 2012), HNO (Donzelli et al. 2017), Schwefelwasserstoff oder dessen oxidierte Persulfid-Derivate (Stubbert et al. 2014) und Schwefeldioxid (Yao et al. 2016). In Zellen kann die Kinase durch Hormone, hohen Glukosegehalt, Endotoxämie, Entkopplung der NOS (Kap. 1.4) oder bei Stressszenarien wie Sepsis (Rudyk et al. 2013) oder chronischer Nachlasterhöhung durch Aortenverengung oxidativ modifiziert werden (Cuello und Eaton 2019). Dabei können verschiedene Oxidationsmittel unterschiedliche Modifikationen hervorrufen. Dies ist zurückzuführen auf die verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen und Wechselwirkung der einzelnen Proteinthiole aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktivität und Zugänglichkeit in Abhängigkeit von ihrer Umgebung (Prysyazhna und Eaton 2015). Zusammenfassend ist die oxidative PKG α -Aktivierung ein wichtiger Mechanismus, der zu einer Vasorelaxation und somit zur Blutdruckregulation führt. Jedoch sind weitere Untersuchungen zu den genauen Mechanismen der oxidativen Modifikationen erforderlich.

1.5 HNO als neue therapeutische Strategie

Auf Grund von vielfältigen Mechanismen der Blutdruckregulation wäre es sinnvoll, neuartige, spezifische und lokalwirkende Medikamente zur Behandlung von SAH zu entwickeln, die in Kombination mit den Erstlinientherapeutika die Effizienz der Behandlung erhöhen und ggf. durch die Dosisreduktion die Häufigkeit der Nebenwirkungen verringern könnten. Außerdem könnten auch die therapierefraktären Patient:innen dadurch normotensiv eingestellt werden. Eine vielversprechende mögliche therapeutische Alternative zu NO und anderen Vasodilatoren könnte HNO sein. HNO ist die ein-Elektron reduzierte und protonierte Form von NO, die eine Vasorelaxation induziert, ohne dabei eine Toleranzentwicklung hervorzurufen (Fukuto et al. 2008, Andrews et al. 2015). HNO wird durch ROS nicht inaktiviert (Miranda et al. 2002). Es behält seine Wirkung sowohl unter gesunden als auch unter pathologischen Bedingungen bei (Orescanin et al. 2007, Bullen et al. 2011, Donzelli et al. 2013). HNO moduliert im Gegensatz zu NO unterschiedliche Signaltransduktionswege und hat dadurch verschiedene biochemische und pharmakologische Eigenschaften, die sich positiv auf das Herz-Kreislaufsystem auswirken (Paolucci et al. 2007, Irvine et al. 2008).

Die endogene Produktion von HNO ist weiterhin umstritten. Dies liegt zum Teil daran, dass bis jetzt keine selektiven und empfindlichen Analyseverfahren für HNO Detektion in Zellen entwickelt werden konnten, da HNO ein kurzlebiges, hochreaktives Elektrophil ist (DeMaster et al. 1995, Miranda et al. 2003). Es reagiert bevorzugt mit nukleophilen Thiolen und bildet ein instabiles Zwischenprodukt, das N-Hydroxysulfenamid, das in Gegenwart eines weiteren Thiols entweder zur Bildung einer Disulfidbrücke unter Freisetzung von Hydroxylamin (NH_2OH) führt oder in einer konkurrierenden Reaktion zu Sulfinamid umgelagert wird (Doyle et al. 1988). Bislang wurden noch keine HNO produzierenden Enzyme identifiziert. Es wird postuliert, dass unter bestimmten Verhältnissen, wie Hypoxie oder oxidativer Stress, bei gleichzeitiger Anwesenheit von NO und Hydrogensulfid (SH^-) HNO endogen entstehen kann, insbesondere durch Reduktion von NO oder durch Oxidation von Aminen (Crawford et al. 2004). Solche Bedingungen können z.B. bei der Sepsis vorliegen (Rudyk et al. 2013) oder bei der Hypertonie, wo der NO/sGC/cGMP Signalweg desensibilisiert ist (Greene et al. 2013). Infolgedessen könnte dabei die endogene HNO-Produktion stimuliert werden.

Es wurden mehrere Mechanismen für die HNO-vermittelte Vasorelaxation vorgeschlagen. Zum einen führt die Aktivierung der sGC durch HNO zur Erhöhung zellulärer cGMP Spiegel und damit zur Aktivierung der klassischen cGMP/PKG-abhängigen Signaltransduktion

(Miller et al. 2009). Zum anderen kann HNO unabhängig von cGMP zur Öffnung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv) und somit über die Hyperpolarisation zur Vasorelaxation führen. HNO wurde dabei als ein endothelialer hyperpolarisierender Faktor (EDHF) beschrieben (Andrews et al. 2009). Weiterhin ist HNO in der Lage, den systemischen Blutdruck zu senken, ohne den cGMP-Spiegel im Plasma zu erhöhen (Paolocci et al. 2001). Auch die Hemmung von sGC durch einen chemischen Inhibitor 1H-(1,2,4)-Oxadiazolo-(4,3-a)-chinoxalin-1-on (ODQ) konnte die HNO-vermittelte Vasorelaxation in Aortenringen nur zum Teil aufheben (Donzelli et al. 2013), was darauf hindeutet, dass es weitere sGC-unabhängige Mechanismen geben muss, insbesondere die direkte Oxidation der Proteine durch HNO ohne enzymatische Beteiligung.

HNO verbessert die myokardiale Kontraktilität und Relaxation unabhängig von β -adrenerger Stimulation oder Veränderungen des cGMP-Spiegels. In Kardiomyozyten beschleunigt HNO die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, indem es mit Thiolgruppen vom Ryanodinrezeptor (RyR) direkt interagiert (Tocchetti et al. 2007), ohne die Funktion der L-Typ Calciumkanäle zu beeinflussen (Kohr et al. 2010). Weiterhin führen HNO-vermittelte Cystein-Modifikationen an PLN (Froehlich et al. 2008, Sivakumaran et al. 2013) und SERCA (Tocchetti et al. 2007, Lancel et al. 2009) zu einer Entthemmung von SERCA und somit zu einer verbesserten diastolischen Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR.

Mittlerweile existieren mehrere HNO-Donoren, deren Effekte größtenteils vergleichbar sind. Es kann jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen HNO-Freisetzungskinetik und den dabei entstehenden Nebenprodukten zu verschiedenen Reaktionen und Wirkungen kommen. Deshalb wurden in dieser Arbeit zwei HNO-Donoren verwendet, um spezifische Effekte dieser Substanzklasse zu charakterisieren.

1.5.1 1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA)

NCA ist ein langwirkender HNO-Donor mit einer Halbwertszeit von 800-900 Minuten, der durch die Arbeitsgruppe von Dr. Bruce King entwickelt wurde (Sha et al. 2006). NCA ist eine hellblaue, ölige Lösung und gehört zu den Acylo-Nitroso-Verbindungen. Bei neutralem pH-Wert hydrolysiert NCA zu Essigsäure und Cyclohexanon und setzt dabei kontinuierlich HNO frei. Weiterhin wurde gezeigt, dass die HNO Freisetzung aus NCA gleichzeitig einen geringen Anteil an NO (<1%), Nitrat und Nitrit (3-4%) produzieren kann (Sha et al. 2006, Shoman et al. 2011, Mohamed et al. 2015).

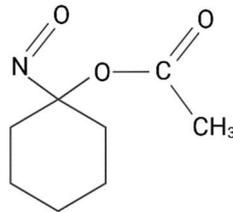


Abb. 1.7: Chemische Strukturformel des HNO-Donors 1-Nirosocyclohexylacetat (NCA), erstellt mit BioRender.com

In isolierten adulten ventrikulären Mauskardiomyozyten erhöhte NCA die Amplitude des Ca^{2+} Transienten, verbesserte die Kontraktion der Sarkomere und beschleunigte die diastolische Ca^{2+} Wiederaufnahme, was mit einer verbesserten, dosisabhängigen Kontraktilität (positive Inotropie) und Relaxation (positive Lusitropie) der Zellen einherging. Diese Effekte wurden sowohl mit verbessertem Ca^{2+} -Cycling als auch mit einer erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente erklärt (El-Armouche et al. 2010). NCA wirkt hier direkt auf die Myofilamentproteine, indem es Disulfidbindungen zwischen sarkomerem Tropomyosin und Aktin induziert und die Interaktion zwischen Myosin-Schwer- und Leichtketten verbessert (Ding et al. 2011, Gao et al. 2012). Interessanterweise war der NCA Effekt auch in Kardiomyozyten mit desensibilisierten β -Adrenozeptoren als Folge chronischer Isoprenalingabe erhalten. NCA induzierte dabei eine vergleichbare Verkürzung der Sarkomere bei gesunden und β -Adrenorezeptor-desensibilisierten Kardiomyozyten. Weiterhin konnte der positiv inotrope Effekt auch im Langendorff-Modus perfundierten Mausherzen beobachtet werden (El-Armouche et al. 2010).

Donzelli et al. konnten eine NCA-vermittelte und dosisabhängige Relaxation der aortalen Ringe beobachten. Die Relaxation war dabei durch ODQ-Vorbehandlung nur teilweise aufgehoben. Es konnte außerdem eine Endothel-unabhängige NCA-vermittelte Vasorelaxation in isolierten Aorten aus Mäusen mit endothelialer Dysfunktion (ApoE KO Modell) und an Endothel-denudierten Aorten beobachtet werden. Außerdem zeigte NCA eine hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation (Donzelli et al. 2013).

1.5.2 CXL-1020

Eine weitere für diese Arbeit relevante Substanz ist CXL-1020. Dieser HNO-Donor setzt schnell und spontan unter physiologischen Bedingungen HNO mit einer Halbwertszeit von

2 Minuten frei. Dabei entsteht HNO und ein biologisch inertes organisches Nebenprodukt CXL-1051, das renal eliminiert wird (Sabbah et al. 2013). Daher wird CXL-1020 als ein „reiner“ HNO-Donor betrachtet. CXL-1020 wurde von der Firma Cardioxyl Pharmaceuticals synthetisiert, durch das Pharmaunternehmen Bristol-Myers Squibb übernommen und bereits in klinischen Studien der Phase I-II untersucht.

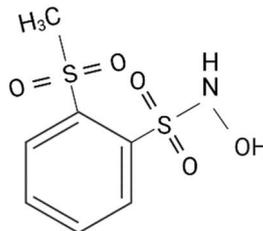


Abb. 1.8: Chemische Strukturformel des HNO-Donors CXL-1020, erstellt mit BioRender.com

In isolierten murinen ventrikulären Herzmuskelzellen führte Exposition mit CXL-1020 zu einem positiv inotropen und lusitropen Effekt. Ähnlich zu NCA erhöhte CXL-1020 die Amplitude der Ca^{2+} Transienten, bewirkte eine Sarkomerverkürzung und beschleunigte die diastolische Ca^{2+} Wiederaufnahme ins SR. *In vivo* wurde sowohl bei Mäusen als auch bei Hunden mit experimenteller Herzinsuffizienz die positive inotrope (Steigerung der Auswurfraction und $\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$) und lusitrope Wirkung (verbesserte diastolische Funktion) bei einem moderaten Blutdruckabfall bestätigt (Sabbah et al. 2013). Außerdem senkte CXL-1020 den Blutdruck und verbesserte die diastolische Herzfunktion in Ratten nach chronischer Isoprenalingabe (Roof et al. 2017).

In sGC KO-Mäusen konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die positiv inotrope Wirkung von CXL-1020 unabhängig von sGC war, während die Vasorelaxation in Aortenringen zum größten Teil (ca. zu 80%) sGC abhängig verlief (Zhu et al. 2015). Die Vasorelaxation unter CXL-1020 Gabe wurde weiterhin in isolierten Mesenterialgefäßen aus PKGI α -C195S KI-Mäusen untersucht. CXL-1020 induzierte eine vergleichbare Vasodilatation sowohl in Wildtyp (WT) als auch in PKGI α -C195S KI-Mäusen, die fast komplett mit ODQ inhibiert werden konnte (Kamynina et al. 2022). Das bestätigt die zuvor beschriebene Annahme, dass die Vasodilatation unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich sGC abhängig verläuft.

Bei Patienten mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz verbesserte die intravenöse Infusion von CXL-1020 sowohl die systolische als auch die diastolische Herzfunktion, ohne dabei die Herzfrequenz zu beeinflussen. Der Druckabfall verlief hierbei moderat und

asymptomatisch, und resultierte in einer Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes (Sabbah et al. 2013).

Ein wesentlicher Nachteil von CXL-1020 ist seine kurze Halbwertszeit (Sabbah et al. 2013). Deshalb wurde weiterhin an CXL-Prodrugs mit einer besseren Pharmakokinetik und einer längeren Halbwertszeit gearbeitet, unter anderem an CXL-1427 mit einer Halbwertszeit von ~40-144 min (Coward et al. 2015). Die ersten klinischen Daten bei intravenöser Gabe von CXL-1427 bei Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz zeigten die gewünschte positive inotrope und lusitrope Wirkung, ohne Blutdruckabfall (Kemp-Harper et al. 2016). Allerdings wurden seitdem keine weiteren klinischen Studien veröffentlicht.

1.6 FRET und Biosensoren für cGMP

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Zellbiologie durch die Entwicklung von Live Cell Imaging Methoden revolutioniert. Dies gelang zunächst durch die Entdeckung, Klonierung und Optimierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). In der Arbeitsgruppe um Roger Tsien wurden zahlreiche Mutanten vom GFP mit veränderten Fluoreszenzspektren entwickelt, die es ermöglichten, mit Hilfe von Biosensoren dynamische Verfolgung von Signaltransduktion in lebenden Zellen oder Geweben zu untersuchen (Rodriguez et al. 2017). Solche Biosensoren beruhen auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), auch Förster-Resonanz-Energie-Transfer genannt.

1.6.1 Grundlagen von FRET

FRET ist ein quanto-mechanisches Phänomen, welches eine strahlungslose Energieübertragung zwischen zwei fluoreszierenden Molekülen beschreibt, die sich in unmittelbarer räumlicher Nähe befinden (Förster 1948). Als wichtige Voraussetzungen für den Energietransfer müssen die beiden Moleküle, auch Fluorophore genannt, überlappende Fluoreszenzspektren aufweisen. Das Emissionsspektrum des emittierenden Fluorophors (Donor) mit einer niedrigeren Wellenlänge überlappt dabei mit dem Exzitationsspektrum des emittierenden Fluorophors (Akzeptor) einer höheren Wellenlänge. Außerdem müssen die räumliche Orientierung der Fluorophore, ähnlich zu der Dipol-Dipol Interaktion, optimal sein und die Entfernung in der Regel weniger als 10 nm bzw. 100 Å betragen (Sahoo 2011). Dabei

$$E_{\text{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

ist die Effizienz der Energieübertragung (E_{FRET}) invers proportional dem 6. Grad der Entfernung (R) zwischen den beiden Fluorophoren. Die Entfernung, bei der 50% der Energieübertragung stattfindet, wird Förster Radius (R_0) genannt.

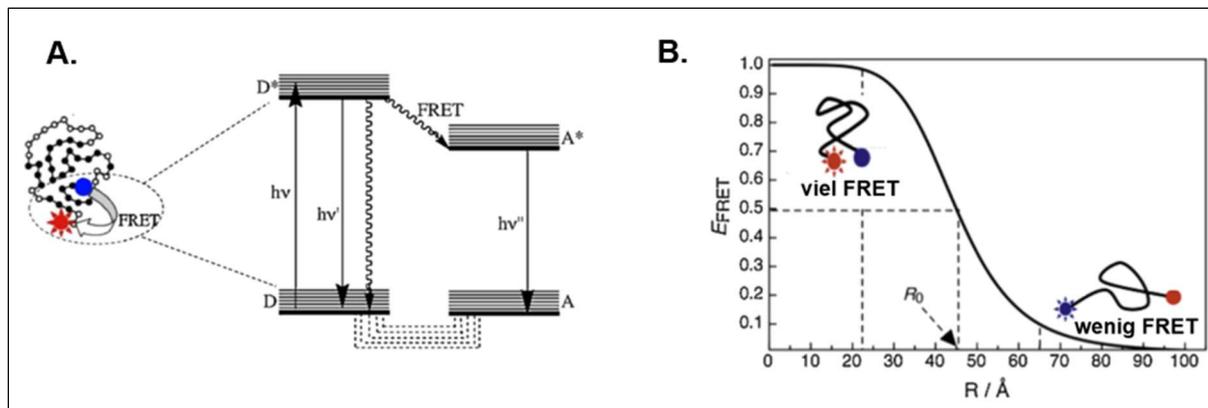


Abb. 1.7. Physikalische Grundlagen von FRET. Schematische Darstellung der strahlungslosen Energieübertragung vom Donor- (D, in blau) auf Akzeptor (A)-Fluorophor (in rot). **A.** Energietransfer vom angeregten Donor (von D zu D*) führt zu Exzitation des Akzeptors (von A zu A*) und Emission der Akzeptorfluoreszenz im Jablonski-Diagramm. Durchgezogene Linien zeigen Strahlen (Fluoreszenz) generierende, die gestrichelten Linien dagegen strahlungslose Prozesse. **B.** FRET Effizienz (E_{FRET}) ist stark abhängig von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor (R). Modifiziert nach Sahoo et al. 2011.

Durch die Entwicklung von GFP Mutanten wurden vor allem Cyan- (CFP) und das gelb fluoreszierende Protein (eng. YFP) als ein weit verbreitetes Donor-Akzeptor-Paar etabliert. Diese können genetisch in die Sequenzen verschiedener Proteine eingeführt werden, um FRET Biosensoren zu generieren.

1.6.2 FRET-basierte cGMP Biosensoren

Einer der ersten entwickelten cGMP Biosensoren war Cygnet-2. Dieser Sensor enthält einen großen Anteil der PKGI α Sequenz, ohne die ersten 77 N-terminalen Aminosäuren ($\Delta 1-77$) der Leucin-Zipper - und AI-Domänen, fusioniert zwischen CFP und YFP (Honda et al. 2001). Um die Kinaseaktivität des Sensors und damit verbundene Effekte auf intrazelluläre Signaltransduktion auszuschalten, wurde eine zusätzliche Punktmutation (T516A) in die katalytische Domäne eingeführt. cGMP-Bindung induziert eine Konformationsänderung des Sensors und führt zu einer räumlichen Entfernung von CFP und YFP und dadurch zu einer

cGMP-abhängigen Abnahme des FRET Signals. Die cGMP-Bindung und Konformationsänderung im Sensor sind dynamisch und reversibel. Sobald cGMP Spiegel in der Zelle sinkt, werden die Bindedomänen des Sensors frei. Steigt cGMP Spiegel in der Zelle erneut an, kommt es wieder zum FRET Abfall (Honda et al. 2001).

In dieser Arbeit wurde der durch Michael Russwurm et al. entwickelte cGi500 Biosensor verwendet, um NO/cGMP und HNO-induzierte Konformationsänderungen in den cGMP Bindedomänen der PKGI α in Echtzeit zu verfolgen. Dieser Biosensor stellt eine verkürzte Version des Cygnet-2 Sensors dar, welche lediglich die beiden cGMP Bindedomänen A und B der Kinase zwischen Aminosäuren Q79 und Y345 enthält, fusioniert zwischen CFP und YFP.

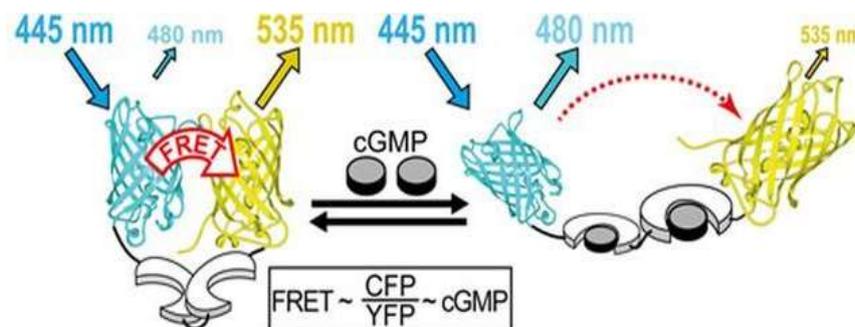


Abb. 1.8: Struktur und Funktionsprinzip des cGi500 Biosensors. CFP und YFP sind an den cGMP Bindestellen A und B der PKGI α fusioniert. cGMP-Bindung führt zu Konformationsänderung und Entfernung der beiden Fluorophore. Die daraus resultierende Abnahme des FRET Signals (als YFP/CFP Ratio gemessen) ist invers proportional der intrazellulären cGMP Konzentration (Thunemann et al. 2013b).

Dieser Sensor zeigt bis zu 77% Änderung von YFP/CFP Ratio unter voller Stimulation und 470 nM EC₅₀ Wert für cGMP. Daher trägt dieser Sensor den Namen cGi500 (Russwurm et al. 2007). Die Amplitude und Affinität des cGi500 Sensor sind wesentlich höher als beim Cygnet-2, welcher nur 40% FRET-Änderung und 1.9 μ M EC₅₀ Wert für cGMP zeigt. Außerdem weist cGi500 viel schnellere Kinetik der cGMP Signale auf. Dies gilt nicht nur für Messungen in isolierten Zellen, sondern auch für Experimente in intakten Geweben und Gefäßen der transgenen Mäuse, welche auch neulich erfolgreich etabliert wurden (Thunemann et al. 2013b). Ein wichtiger Vorteil des cGi500 Sensors für solche Anwendungen ist seine kompakte Struktur und das Fehlen von katalytischen bzw. anderen großen Proteindomänen, die transgene Expression erschweren bzw. intrazelluläre Signalwege beeinflussen könnten

(Thunemann et al. 2013a). Für diese Arbeit ist außerdem von besonderer Bedeutung, dass der cGi500 Sensor die hochaffine cGMP Bindestelle A mit den beiden zu Intradisulfidbrücke oxidierbaren Cysteinen 117 und 195 enthält.

1.7 Ziele der Arbeit

PKGI α gehört zu den Hauptregulatoren der Vasorelaxation. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass PKGI α nach HNO Exposition posttranslational modifiziert werden kann und eine aktivatorische Intradisulfidbrücke zwischen den C117 und C195 in der hochaffinen cGMP-Bindungsdomäne ausbildet (Donzelli et al. 2017). Dabei wird der klassische Aktivierungsweg über die sGC und die Produktion von cGMP umgangen. Intradisulfidbrückenbildung beeinflusst die Bindung von cGMP an die Kinase und moduliert ihre Aktivität. Der individuelle Beitrag, den die Cysteine 117 und 195 bei diesen Vorgängen leisten, ist das Thema wissenschaftlicher Diskussion.

Die Ziele dieser Arbeit waren daher:

- (1) Die Charakterisierung der HNO-induzierten Intradisulfidbrückenbildung in PKGI α und des individuellen Beitrags der Cysteine 117 und 195.
- (2) Die Aufklärung der funktionellen Relevanz der Intradisulfidbrückenbildung
- (3) Die Untersuchung der HNO-vermittelten Effekte und der Rolle dieser Cysteine anhand neuer KI-Mausmodelle, die C117 oder C195 oder C117/195 zu nicht-oxidierbarem Serin exprimieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Eukaryotische Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie	Quelle
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) One Shot™ TOP10, chemisch kompetent	Thermo Fisher Scientific
HEK293A (menschliche embryonale Nierenzellen, eng. Human Embryonic Kidney cells)	Thermo Fisher Scientific
HEK293T (hoch transfizierbarer Subklon)	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Mauslinien

Mauslinie	Genetischer Hintergrund	Quelle
Prkg1-C117S	C57BL/6J	Dr. Boris Skryabin
Prkg1-C195S	C57BL/6J	Dr. Boris Skryabin
Prkg1-C117/195S	C57BL/6J	Dr. Boris Skryabin

2.1.3 Plasmide

Plasmide	Quelle
cGi500	Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev
GKAR	Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev
pcDNA-PKGI-WT	Prof. Dr. Philip Eaton
pcDNA-PKGI-C117S	Prof. Dr. Friederike Cuello
pcDNA-PKGI-C195S	Prof. Dr. Friederike Cuello
pcDNA-PKGI-C117/195S	Prof. Dr. Philip Eaton
pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α WT	Prof. Dr. Friedrich Herberg

2.1.4 Plasmide generiert in dieser Doktorarbeit

Plasmide	Antibiotika Resistenz
CAG-cGi500-C117S	Ampicillin/Neomycin
CAG-cGi500-C195S	Ampicillin/Neomycin
CAG-cGi500-C177/195S	Ampicillin/Neomycin
pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α C117/195S	Ampicillin/Kanamycin

2.1.5 DNA Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA Oligonukleotide wurden für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und für die TaqMan Polymerase Kettenreaktion (TaqMan PCR) eingesetzt. Die DNA Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins Genomics bestellt.

DNA Primer	Sequenz	Verwendung
1. cGiEcoRI forward	5'-CTGGAATTCGTGACCGC-3'	PCR
2. cGiClal reverse	5'-TCTATCGATGACAAGGCAGG-3'	PCR
3. Cys117Ser forward	5'-GATTGTGGATTCTATGTACCCAG-3'	PCR
4. Cys117Ser reverse	5'-CTGGGTACATAGAATCCACAATC-3'	PCR
5. hPKGCys117Serfor	5'-AGATTGTGGATAGTATGTACCCG-3'	PCR
6. hPKGCys117Serrev	5'-CGGGTACATACTATCCACAATCT-3'	PCR
7. Cys195Ser forward	5'-GATCGACAATCTTTTCAGACGA-3'	PCR
8. Cys195Ser reverse	5'-TCGTCTGAAAAGATTGTCGATC-3'	PCR
9. hPKGSer195Cysfor	5'-CATTGATCGACAAAGTTTTCAAACAA-3'	PCR
10. hPKGSer195Cyrev	5'-TTGTTTGAAAACTTTGTCGATCAATG-3'	PCR
11. hPKGMfelfor	5'-AAACAATTGACCATGGATTATAAAGATGAT GATGATAA-3'	PCR
11. hPKGXcmlrev	5'-ATATATTCTCCATTTTCATAGTGGGTC-3'	PCR
12. PrkgEX2_D1-WT/MUT	5'-GAAGGATCTATAAAGGAGGCTATC-3'	TaqMan
13. PrkgEX2_R1-WT/MUT	5'-AGTGACCCACATCGCTTC-3'	TaqMan
14. PrkgEX4_D1-MUT	5'-TAATTTCCCCTCCTTGCTT-3'	TaqMan
15. PrkgEX4_R1-MUT	5'-AAATTCCATGTACTIONCGGTATGCTT-3'	TaqMan
16. PrkgEX4_D2-WT	5'-AGCTCTTGTAATGTGAAACTCTGG-3'	TaqMan
17. PrkgEX4_R1-WT	5'-AAATTCCATGTACTIONCGGTATGCTT-3'	TaqMan

2.1.6 Substanzen

Die nachfolgenden Substanzen wurden zur Stimulation der Zellen eingesetzt, sowohl für HEK293- als auch für primäre VSMCs. Zudem wurde 1H-(1,2,4)oxidiazolol(4,3-a)quinoxaline-1-on (ODQ) als Inhibitor der sGC verwendet.

Name	Herstellen, Katalognummer
1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA)	Axon Medchem #2603
Cardioxyl-1020 (CXL-10120)	Axon Medchem #2653
Natrium-Nitroprussid (SNP)	Sigma-Aldrich #228710
ODQ	Sigma-Aldrich #O3636
SNAP	Cayman #82250

2.1.7 Universelle TaqMan PCR Sonden

In dieser Arbeit wurden spezifische Sonden für die TaqMan PCR eingesetzt. Die Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanine 3 Phosphoramidite (Cy3) und mit einem Fluoreszenzquencher Black Hole Quencher 1 (BHQ1) markiert. Die Sonden wurden von Dr. Boris Skryabin entwickelt und bei der Firma Eurofins Genomics bestellt. Das Zeichen + vor einer Base zeigt eine sogenannte geschlossene Nukleinsäure (eng. Locked Nucleic Acid). Diese Sonden sind dadurch kurz und hochspezifisch.

Sonden	Sequenz
5'-Cy3/3'-BHQ1 # Prkg1-C117S	5'-GTG+GAC+AG+TA+TG+TA-3'
5'-Cy3/3'-BHQ1 # Prkg1-C117	5'-GTG+GAC+TG+TA+TG+TA-3'
5'-Cy3/3'-BHQ1 # Prkg1-C195S	5'-A+TC+GA+CAA+AG+TT+TT-3'
5'-Cy3/3'-BHQ1 # Prkg1-C195	5'-AT+C+GA+CAA+TG+TT+TT-3'

2.1.8 Enzyme und Enzympuffer

Name	Hersteller, Katalognummer
Clal	New England BioLabs #R0197
Collagenase	Sigma-Aldrich #C0130

CutSmart® Buffer	New England BioLabs #B7204
EcoRI	New England BioLabs #R0101
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich #H3506
Papain	Sigma-Aldrich #9001-73-4
Pfu DNA Polymerase	Promega #M7741
Pfu DNA Polymerase Reaction Buffer 10x	Promega #M776A
T4 DNA Ligase	New England BioLabs #M0202S
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England BioLabs #B0202

2.1.9 Antikörper

Primäre und sekundäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz, Immunoblot Analyse bei *in vitro* Kinase Assays, dem Nachweis des cGi500 Sensors, von PKGI und zur VASP Detektion in isolierten primären VSMCs und verschiedenen aus der Maus isolierten Organen eingesetzt.

2.1.10 Primäre Antikörper für Western Blot Analyse

Name	Verdünnung	Spezies	Hersteller, Katalognummer
Anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	1:160.000	Mouse	HyTest #5G4
Anti-His	1:1000	Rabbit	Cell Signaling #2365S
Anti-Phospho PKA Substrat	1:1000	Rabbit	Cell Signaling #9624
Anti-Phospho VASP (S239)	1:1000	Rabbit	Cell Signaling #3114S

Anti-PKG	1:1000	Rabbit	Cell Signaling #3248S
Anti-VASP IG731	1:1000	Rabbit	ImmunoGlobe #0012-02

2.1.11 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz Analyse

Name	Verdünnung	Gattung	Hersteller, Katalognummer
Anti- α -glattes-Muskel-Aktin [eng. Anti- α -smooth muscle actin (α -SMA)]	1:100	Mouse	CiteAb #M0851
Anti-glatte-Muskulatur-Myosin- schwerkette 11 [eng. smooth muscle-myosin heavy chain 11 (SM-MHC11)]	1:100	Rabbit	Abcam #AB53219

2.1.12 Sekundäre Antikörper für Western Blot Analyse

Name	Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
Anti-mouse	1:2500	Biorad #170-5047
Anti-rabbit	1:2500	Biorad #170-5046

2.1.13 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz und Fluoreszenzfarbstoffe

Name	Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)	1:20	Sigma-Aldrich # D9542
Midori Green Direct Stain	1:17	Nippongenetics #MG06
Anti-mouse, Alexa Fluor™ Plus 488	1:100	Thermo Fisher Scientific #A32731
Anti-rabbit, DyLight® 550	1:100	Abcam #AB96884

2.1.14 Kits

Name	Hersteller, Katalognummer
ECL Select™ Western Blotting-Detektionsreagenzien	Amersham™ #12644055
LightCycler 480 Probes Master Kit	Roche #04707494001
Pierce™ Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific #23227
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen #12941
QIAGEN Plasmid Plus Mini Kit	Qiagen #12123
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen # 28706X4
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen #28104
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Biorad #5000201
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific #R0531
Twin-Strep-tag® Capture Kit	IBA Lifesciences #2-4370-000

2.1.15 Zellkultur

Name	Hersteller, Katalognummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich #D5546
Fetales Kälberserum (eng. fetal calf serum [FCS])	Capricorn #FBS-11A
Geneticin G418 Sulfate	Genaxxon bioscience #M3118.0050
LB-Agar-Pulver nach Miller	Carl Roth #X969.2
L-Glutamin Lösung 200 mM	Sigma-Aldrich #G7513
Lipofectamine 2000	Invitrogen #11668-027
Opti-MEM™ I Serumreduziertes Medium	Thermo Fisher Scientific #31985070
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 10.000 U/10 mg pro ml	Sigma-Aldrich #P0781
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0.25%/0.02%) in Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	PAN Biotech #P10-020100

2.1.16 Chemikalien

Name	Hersteller, Katalognummer
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem # A1069,0500
2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Arcos)	Sigma Aldrich #C0926
2-Propanol	Chemsolute #1136
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma Aldrich #M1254-1KG

3,3',3''-Phosphinidin-tripropionsäure- hydrochlorid, (TCEP)	Merck #C4706
30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1	Bio Rad #1610158
Aceton	Merck, #100013
Agarose universal peqGold	VWR #35-1010
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad #1610700
Ampicillin Natriumsalz	Sigma #A9518
Aqua (Apothekenwasser)	B. Braun Ecotainer #82479E-E
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma #A9647
Bromphenolblau	Merk #8122
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich #449709
Chloroform	J.T. Baker #7386
cOmplete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail	Roche #11836153001
Coomassie Brilliant Blue G 250 (C.I. 42655)	Sigma-Aldrich #1.15444
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) Mix	Promega #U1511
Desoxyribonukleinsäure (DNA) Leiter - 1000 Basenpaare (b.p.)	New England BioLabs #B7025
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem #A3672
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth #6908.2
Dulbecco's Phosphate Buffered saline	
DPBS (1x)	Thermo Fisher Scientific #14190-094
EDTA	Sigma-Aldrich #E5134
Essigsäure (Eisessig 100%)	Merck #100063
Ethanol absolut	Chemsolute #1136

Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure Tetranatriumsalz (EGTA)	Sigma-Aldrich #E8145
Gel Ladepuffer lila (6x)	New England BioLabs #B7024A
Glycerin	Carl Roth #6967.2
Kaliumchlorid (KCl)	Merck #7447407
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck #1.04877
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich #M8266
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Merck #1.05886.0500
Maleimid	Sigma Aldrich #129585
Milchpulver	Carl Roth #T145.1
Natriumchlorid (NaCl)	Baker Analyzed #0278
Natriumdeoxycholat (NaDOC)	Thermo Fisher Scientific #89904
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich #201154
Natriumhydroxid (NaOH)	Chemsolute #1340
Natriumlaurylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth #CN30.3
Ni-NTA Agarose Perlen	Thermo Fisher Scientific #R90115
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific #26619
PhosSTOP™ EasyPack	Roche #4906837001
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma #P364
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich #6226-79-5
Precision Plus Protein Dual Color Standards	BioRad #1610374
Triton™ X-100	Carl Roth #3051.2
Trizma®-Base (Tris)	Sigma-Aldrich #10708976001

Trypan Blue Stain (0.4%)	Thermo Fisher Scientific #15250-061
Tween® 20	Sigma-Aldrich #P1379
Unimat KombiPackung, Entwickler- und Fixierkonzentrat	Unimat # 69791

2.1.17 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Attofluor™ Zellkammer	Fisher Scientific #A7816
Cellstar® Tube 15, 50 ml	Greiner bio one
Dampf-Indikatorband	3M™ Comply™
Filterpipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt
Hamilton Spritze	Hamilton
Kosmetiktücher	Tapira Plus
Kryo-Röhrchen 1,5, 2 ml	Thermo Fisher Scientific
Multikanalpipette plus	Eppendorf
NAP10-Säulen	GE Healthcare
Nitril Handschuhe M	Dermagrip Ultra Plus
Nitrocellulose Blotting-Membran	GE Healthcare
Omnifix® -F Luer Solo Spritze, 1 ml	B. Braun
Parafilm	Bemis
PCR-Tubes	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen 10 ml, Combitips advanced	Eppendorf
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Sarstedt
Platte 6, 12, 24, 48, 384-well	Thermo Fisher Scientific

Platte 96-Well	Corning #266130422
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Blotting-Membran	GE Healthcare
Reagiergefäß trüb/braun 1, 2, 5 ml	Sarstedt
Schaber für Zellkultur, steril	Sarstedt
Schale 60x15, 100, 150 mm	Sarstedt
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml	Sarstedt
Sterican Einmal-Injektionskanüle 17 - lila Ø 0,55 x 25 mm 24G / 100 Stück	B. Braun
Sterican Einmal-Injektionskanüle 20 - grau Ø 0,40 x 20 mm 27G / 100 Stück	B. Braun
TC-Schale 100	Sarstedt
Vernichtungsbeutel	Labsolute

2.1.18 Geräte

Name	Hersteller
Accu-Jet Pro Pipette	Brandtech
Analysenwaage	Sartorius
Autoklav VARIOKLAV®	Sartorius
Bioruptor® Plus sonication device	Diagenode
Bioruptor® Plus Sonication Gerät	Diagenode
ChemiDoc™ Touch Imaging System	BioRad
CO ₂ Inkubator HeraCell™ 240	Thermo Fisher Scientific
Dewar-Transportgefäß	KGW Isotherm
Drahtmyograph 510A	Danish Myograph Technologies (DMT)

E-box Gel Dokumentationssystem	Vilber
Electrophoresis Kammer Western Blot Mini-PROTEAN® Tetra Vertical	BioRad
FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices
Gelelektrophoresesystem Mupid One	Nippongenetics
Hitze Block Dri-Block® DB-1	Techne® VWR
Konfokalmikroskop	Zeiss LSM 800 airyscan
Kühlschrank	Liebherr
Kühltruhe	Kryotec
Labcyclers 96-Well-Block	Sensoquest
Lampe KL 1500 compact	Schott
Medical film processor (SRX-101A)	Konica Minolta
Mikrowelle	Panasonic
Minishaker MS1 IKA	Sigma-Aldrich
Nanodrop	DeNovix
Orbital Shaker MaxQ 4450	Thermo Fisher Scientific
Polymerase Kettenreaktion (PCR) Maschine	
Gene Touch	BioRad
QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Schüttelgerät Thermostat plus 1.5 ml	Eppendorf
Sicherheitswerkbank HeraSafe™ HS 12 class II	Thermo Fisher Scientific
Specord 205 spectral photometer	Analytik Jena AG
TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Biosciences
Thermomixer comfort	Eppendorf

Ultrazentrifuge CS150FNX	HITACHI
UV-Transilluminator	Whatman Biometra TI 1
Waage Scout Pro	Ohaus
Wasserbad	GFL Technology
Western Blot PowerPac™ HC Power Supply	BioRad
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus

2.1.19 Mikroskopie

Name	Hersteller
Arduino digital-to-analog input-output board	Arduino
CMOS camera (OptiMOS) DV2 Cube 05-EM, (505 dcxr, D480/30m, D535/40m)	QImaging
Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ 8100E	Keyence
LED pE-100, 440 nM	CoolLED
Leica DMI 3000 B Mikroskop	Leica
Leica DMI1 Mikroskop	Leica
Zeiss LSM 800 Konfokalmikroskop	Zeiss

2.1.20 Software

Name	Hersteller
A plasmid Editor (ApE)	M. Wayne Davis, University of Utah
CLARIOstar Mars Data Analysis 3.41	BMG Labtech
CLARIOstar Reader Software 5.61	BMG Labtech
E-box gel documentation software	Viber
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software, Inc.
ImageJ 1.44	National Instruments of Health
Labview	National Instruments of Health
Omega Reader Software 5.5 BMG Labtech	BMG Labtech
Origin 8.5G	MicroCal, Inc.
QuantStudio 5 qPCR-Datenanalyse-Software	Thermo Fisher Scientific
SoftMax® Pro Software	Molecular Devices
Tbase, 4D	4D SAS
WinAspect	Analytik Jena AG
ZEN Mikroskopie-Software	Zeiss

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierungstrategie zur Herstellung von Redox-defizienten Mutanten

Die Herstellung der rekombinanten Redox-defizienten Einzelmutanten C177S und C195S sowie der Doppelmutante C117/195S erfolgte mittels einer klassischen Klonierung. Dafür wurde der bereits gut untersuchte und etablierte FRET-Sensor cGi500 (Abb. 2.1 A.), der die cGMP-Bindedomänen der PKG1 α (729 b.p.) enthält, verwendet. Um die Bindedomäne aus dem Vektor zu entfernen, wurde zuerst der Vektor mit den Restriktionsenzymen EcoRI und ClaI geschnitten.

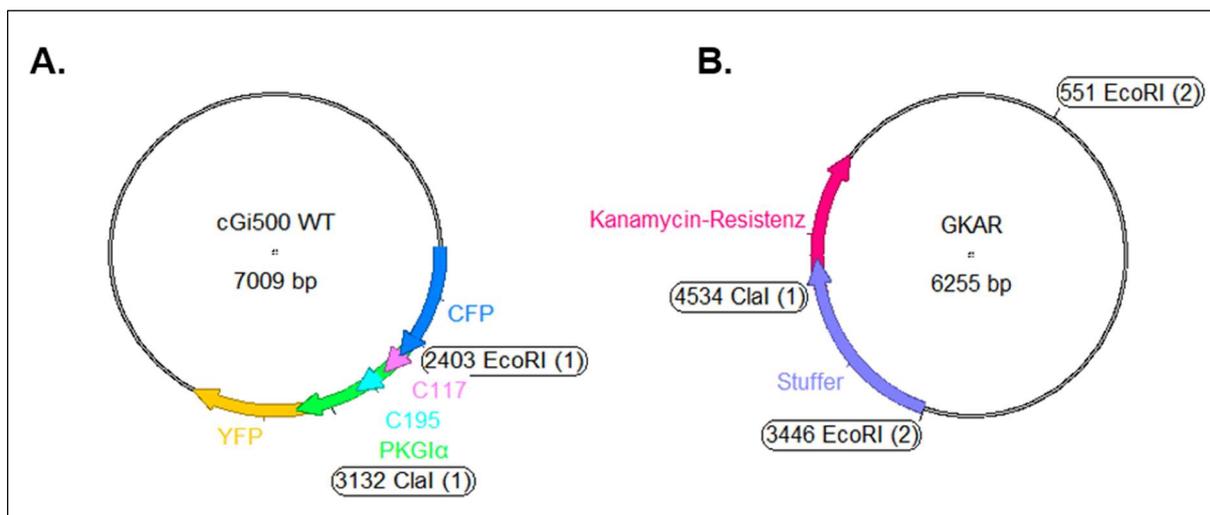


Abb. 2.1: Herstellung von Mutanten C117S, C195S und C195S. **A.** cGi500 WT Vektor mit den beiden Aminosäuren C117 und C195. In Grün ist die regulatorische Domäne von PKG1 α dargestellt, die zwischen CFP (blau) und YFP (gelb) Fluoreszenzfluorophoren fusioniert ist. **B.** GKAR Vektor beinhaltet den Stuffer und eine Sequenz für Kanamycin-Resistenz. Beide Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und ClaI geschnitten.

Zudem wurde der Vektor GKAR (Abb. 2.1 B.) ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Ein Teil dieses Vektors enthält einen Abschnitt von 1088 b.p., der als Stuffer in den Vektor cGi500 eingesetzt wurde. Da dieser Abschnitt um 359 b.p. länger ist als die PKG1 α Bindedomäne, lässt sich dieser gut unterscheiden von dem mutierten PKG1 α Abschnitt,

welcher zum Schluss wieder eingesetzt wurde an Stelle des Stuffers. Nach dem Restriktionsverdau mit ClaI und EcoRI erfolgte eine Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese auf einem 1% Agarosegel, visualisiert durch MidoriGreen und anschließende Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit.

Der geschnittene Vektor cGi500 und der Stuffer wurden zusammengebracht und durch das Enzym T4 DNA-Ligase ligiert. Zur Vervielfältigung der DNA erfolgte die Transformation des neu entstandenen Plasmids in die Top10 *E. coli* Bakterien. Im Anschluss wurden die transformierten Zellen auf einer Agarplatte mit Zusatz des Antibiotikums Ampicilin ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Einzelne Klone wurden mit einer sterilen 100 µl Pipettenspitze isoliert und weiterhin in 15 ml Röhrchen mit je 3 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin im Schüttler bei 37°C bei 200 rpm vervielfältigt. Es erfolgte nun eine Plasmidisolierung mittels des QIAGEN Plasmid Plus Mini Kits. Um sicherzustellen, dass die Klonierung erfolgreich war, wurde im Anschluss ein Kontrollverdau mit EcoRI und ClaI durchgeführt. Der Ansatz wurde hierzu auf das Gel aufgetragen und ein Foto von den Banden mit dem Gerät E-box Gel Dokumentationssystem aufgenommen. Positive Klone wurden im Anschluss in 50 ml LB-Medium über Nacht propagiert und mittels des QIAGEN Plasmid Plus Midi Kits aufgereinigt. Es erfolgte erneut ein Kontrollverdau mit EcoRI und ClaI. Zur Sequenzierung wurde das Stuffer-Zwischenkonstrukt an die Firma Eurofins Genomics verschickt. Dabei wurde 2,5 µg Plasmid in 20 µl Wasser gelöst und zusammen mit dem Primer cGiClal reverse versendet.

Das cGi500 Stuffer-Zwischenkonstrukt mit einer Größe von 7368 b.p. konnte nun zur Klonierung der Einzel- und Doppelmutante eingesetzt werden. Die Cysteine 117 und 195, die sich in der cGMP-Bindedomäne befinden, wurden durch eine Mutation zu Serin ausgetauscht. Dabei wurde das Cystein-Basen-Triplett TGT zu dem für Serin kodierenden Basentriplett TCT ausgewechselt. Durch diesen Austausch entstanden drei neue Redox-defiziente Plasmide C117S, C195S und C177/195S. Für das mutierte Konstrukt C117S wurden insgesamt drei PCR-Ansätze durchgeführt, wobei bei der dritten PCR die Produkte der ersten und zweiten PCR mit den Primern Nr. 1 und Nr. 2 (Kap. 2.1.5) zusammengeführt wurden. Bei der ersten und zweiten PCR wurde als Template der Vektor cGi500 WT verwendet. Die erste PCR wurde mit den Primern Nr. 1 und Nr. 4 und die zweite mit Nr. 3 und Nr. 2 (Kap. 2.1.5) durchgeführt.

Die Mutation C195S wurde auch mittels drei PCR-Ansätze hergestellt. Auch hier wurde als Template für die erste und zweite PCR der Vektor cGi500 WT verwendet. In der dritten PCR wurden die Produkte der ersten und zweiten PCR mit den Primern Nr. 1 und Nr. 2

zusammengeführt. Bei der ersten PCR wurden die Primer Nr. 1 und Nr. 6 und bei der zweiten Nr. 5 und Nr. 2 eingesetzt.

Die Klonierung der Mutation C117/195S erfolgte in vier PCR-Ansätzen. In der vierten PCR wurden die PCR-Produkte der ersten, zweiten und dritten PCR mit den Primern Nr. 1 und Nr. 2 zusammengeführt. Bei der ersten, zweiten und dritten PCR wurde als Template der Vektor cGi500 WT verwendet. Die erste PCR wurde mit den Primern Nr. 1 und Nr. 4, die zweite mit Nr. 5 und Nr. 2 und die dritte mit Nr. 3 und Nr. 6 durchgeführt.

Die einzelnen Produkte von der ersten und zweiten PCR für die Mutation C117S und C195S wurden im Anschluss auf das Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt. Die Fragmente mit der Größe 151 und 613 b.p. für das C117S Konstrukt, 385 und 378 b.p. für das C195S Konstrukt wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Für das doppelmutierte Konstrukt C117/195S wurden die Produkte der ersten, zweiten und dritten PCR auf das Gel aufgetragen und die Fragmente mit der Größe 151, 257 und 378 b.p. ausgeschnitten und ebenfalls aufgereinigt.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden als Template zur Durchführung der dritten bzw. vierten (für die Doppelmutante) PCR verwendet, bei der die einzelnen Stücke zusammengeführt wurden. Es erfolgte im Anschluss der Verdau des Stuffer-Zwischenkonstruktes und des dritten/vierten PCR-Produktes mit den Enzymen EcoRI und ClaI mit anschließender Auftragung auf das Agarosegel und Aufreinigung mittels des QIAquick Gel Extraction Kits. Nun konnte der geschnittene Vektor und das geschnittene dritte/vierte PCR-Produkt durch das Enzym T4 DNA Ligase zusammen ligiert werden. Das so neu entstandene Redox-defiziente Sensorplasmid mit der Mutation C117S oder C195S oder C117/195S wurde nun in die kompetenten *E. coli* Bakterien transformiert, auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht kultiviert. Die im Anschluss gepickten Klone der einzelnen Mutanten wurden in je 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin im Schüttler bei 37°C bei 200 rpm über Nacht vervielfältigt. Es erfolgte eine Minipräparation der Plasmid-DNA und ein Kontrollverdau mit EcoRI und ClaI.

Eine Übernachtskultur (50 ml) mit den jeweils positiven Klonen von C117S, C195S oder C117/195S wurde angeimpft und im Anschluss die Plasmid-DNA aufgereinigt. Die Konzentration der jeweiligen Plasmide wurde mit einem NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt. Die jeweiligen Plasmide mit der darin enthaltenen Mutation wurden durch Sequenzierung bestätigt.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung eines kurzen, genau definierten Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnittes (Template). Die Reaktion verläuft in drei aufeinanderfolgenden Schritten:

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge.
- Annealing von Primern an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.
- Amplifikation der Einzelstränge mit Hilfe der eingesetzten Polymerase, ausgehend von den Primern.

Mit jedem Zyklus wird die DNA Menge zwischen den beiden Primern verdoppelt. Dies führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Diese Abfolge wird in 30 Zyklen wiederholt, mit anschließender Aufreinigung des PCR Produktes mittels des QIAquick PCR Purification Kits nach Anleitung des Herstellers.

Der Reaktionsansatz zur Herstellung des gewünschten DNA-Abschnitts und die dafür entsprechenden Einstellungen des Thermocyclers sind in der Tab. 2.1 zusammengestellt. Die Anzahl an Zyklen betrug dabei 30.

Tab. 2.1: PCR-Ansatz (A) und das dazugehörige PCR-Programm (B).

A. Ansatz	Menge
Pfu Polymerase	1 µl
10x Pfu Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	2.5 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	2.5 µl
Template DNA	0.3 µg
Wasser	ad. 100 µl

B. Schritt	Temperatur	Zeit
Vorheizen	95	5'
Denaturierung	95	0'30"
Annealing	55	0'30"
Amplifikation	72	1'20"/ 2' pro 1000 b.p.
Finale Amplifikation	72	5'

2.2.1.3 Restriktionsverdau

Die Restriktionsenzyme ClaI und EcoRI schneiden die doppelsträngige Plasmid-DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Die meisten Enzyme erkennen eine palindromische Sequenz von vier bis acht Basenpaaren. Nach dem Restriktionsverdau entstehen am 5`- und 3`-Ende die sogenannten überhängenden Enden (eng. sticky ends). Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes sowohl für das PCR-Fragment als auch für den Zielvektor ist in der Tab. 2.2 aufgeführt:

Tab. 2.2 Restriktionsansatz für den Vektor- oder PCR-Fragmentverdau.

Zusammensetzung	Menge
Zielvektor/ PCR-Fragment	10 µg/ 40 µl
10x Puffer Smart Cut	5 µl
Restriktionsenzym I	2.5 µl
Restriktionsenzym II	2.5 µl
H ₂ O	ad. 40 µl

Der Ansatz wurde zusammengemischt und bei 37°C im Thermomixer für 6 Stunden inkubiert.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen nach ihrer Größe. Hierzu wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt und mit MidoriGreen (3 µl auf 50 ml Gel) versetzt. Der 50 µl Restriktionsverdau-Ansatz wurde mit 6x Gel Ladepuffer vermischt und in die Geltasche pipettiert. In die erste Tasche wurden 5 µl 1000 b.p. DNA Ladder hinzupipettiert. Die Proben wurden 30 Min bei 100 V laufengelassen. Die entsprechenden

Banden wurden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Hersteller-Protokoll isoliert und aufgereinigt.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wurde der Stuffer oder der mutierte Abschnitt mit dem linearisierten Zielvektor nach einer Ligationsreaktion durch das Enzym T4 DNA Ligase zu einem intakten, zirkulären Plasmid verknüpft. Der Ansatz wurde zusammenpipettiert und über Nacht im Thermomixer bei 14 °C inkubiert. Der Ligationsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 2.3 Ligationsansatz

Zusammensetzung	Menge
Stuffer/mutierter Abschnitt	~300 ng
Vektor	~150 ng
10x Ligase Puffer	1,5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

2.2.1.6 Transformation des Ligationsansatzes in TOP10 *E. coli* Zellen

Für die Transformation klonierter Plasmide wurden kompetente TOP10 *E. coli* Zellen verwendet. Hierfür wurden 65 µl Wasser und 20 µl des 5x KCM Puffers (Tab. 2.4) zum Ligationsansatz pipettiert und 5 Minuten auf Eis gehalten.

Tab. 2.4 Herstellung von 5x KCM Puffer.

Zusammensetzung	Menge (mM)
KCl	500
CaCl ₂	150
MgCl ₂	250

Zum Ligationsansatz wurden nun 100 µl aufgetaute chemisch kompetente Zellen gegeben und weitere 20 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Reaktionsmix wurde im Anschluss 50 Minuten bei 37 °C im Thermomixer bei 700 rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde

nach der Inkubation 3 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde verworfen und das Pellet im restlichen Medium (ca. 100 µl) resuspendiert. Für die Selektion transformierter *E. coli* Zellen wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml bei der Herstellung von LB-Platten zum LB-Agar gegeben. Die Zellen wurden auf LB-Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C für mindestens 12 Stunden inkubiert.

2.2.1.7 Vervielfältigung von transformierten Klonen - Mini-Präparation

Zur Vervielfältigung von transformierten Klonen in kleinen Mengen (Mini-Präparation) wurden 15 ml Greiner-Röhrchen vorbereitet, in denen je 3 ml LB-Medium mit dem Plasmid-spezifischen Antibiotikum vorgelegt wurde. Einzelne Kolonien wurden mit autoklavierten Pipettenspitzen gepickt, in die Greiner-Röhrchen gegeben und im Schüttler über Nacht bei 37°C, 200 rpm geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung der Plasmide mit dem QIAGEN Plasmid Plus Mini Sample Kit nach Herstelleranleitung.

2.2.1.8 Kontrollverdau

Zur Überprüfung der korrekt eingeführten Mutation in die Plasmide wurden diese einem Kontrollverdau unterzogen (Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Kontrollverdau der einzelnen Klone nach Mini-Präparation.

Zusammensetzung	Menge
einzelne Proben der Mini-Präparation	8 µl
Puffer Smart Cut (10x)	1,5 µl
Restriktionsenzym I	0,2 µl
Restriktionsenzym II	0,2 µl
H ₂ O	5,1 µl

Der Ansatz wurde zusammengemischt und bei 37 °C im Thermomixer für 30 Minuten inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 6x Ladepuffer dazupipettiert und auf einem 1%igen Agarose-Gel 30 Minuten bei 100 V aufgetrennt. Die positiven Klone wurden anhand der korrekten Bandengröße ausgewählt und in größeren Plasmidmengen (Midi-Präparation) vervielfältigt.

2.2.1.9 Vervielfältigung von positiven Klonen - Midi-Präparation

Für die Midi-Präparation wurden im Erlenmeyerkolben 50 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium vorgelegt, mit Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C, 220 rpm hochgezogen. Die Aufreinigung erfolgte mit QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit nach Herstelleranleitung.

2.2.1.10 Bestimmung der Plasmid-Konzentration

Der NanoDrop-Spektrophotometer wurde zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen durch Messung der optischen Dichte verwendet. Dabei wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von OD_{260nm} und OD_{280nm} gemessen. Anhand des Verhältnisses (OD_{260nm}/OD_{280nm}) konnte die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden, wobei ein Verhältnis von $> 1,8$ für eine reine DNA-Probe spricht.

2.2.1.11 Klonierungsstrategie zur Herstellung stabiler Klone

Die rekombinanten Redox-defizienten Einzelmutanten C177S, C195S als auch die Doppelmutante C117/195S sollten mit Hilfe eines FRET basierten Assays (Kap. 2.2.3) bezüglich der HNO-vermittelten Intradisulfidbrückenbildung untersucht werden. Hierzu wurden die einzelnen Sensorstrukturen durch eine Neomycin Antibiotika-Resistenz ergänzt. Im Anschluss wurden stabil exprimierende Zelllinien generiert.

Es erfolgte hierzu ein Restriktionsverdau von cGi500 WT- und den mutierten Plasmiden mit den Enzymen XhoI und EcoRV nach bereits in Kap. 2.2.1.3 aufgeführten Schritten. Dieser ausgeschnittene Abschnitt der DNA enthält die gesamte cGi500 Sensorsequenz (Insert) von WT oder Mutanten mit einer Größe von 2223 b.p.

Der Vektor pCAG-neo-redDE5 (Abb. 2.2), der die Neomycin Antibiotika-Resistenz beinhaltet, wurde ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Der geschnittene und linearisierte Zielvektor (ohne redDE5 Fragment) hatte dabei eine Größe von 6400 b.p. Nach der Aufreinigung der einzelnen DNA-Abschnitte wurde der linearisierte Zielvektor und das Insert zu einem intakten Plasmid ligiert. Der Ligationsansatz mit den jeweiligen Plasmiden wurde in die TOP10 *E. coli* transformiert und ausplattiert. Im weiteren Verlauf wurden die Klone gepickt, vervielfältigt und durch eine Mini- und Maxi Präparation aufgereinigt. Es erfolgte ein Kontrollverdau mit anschließender Sequenzierung.

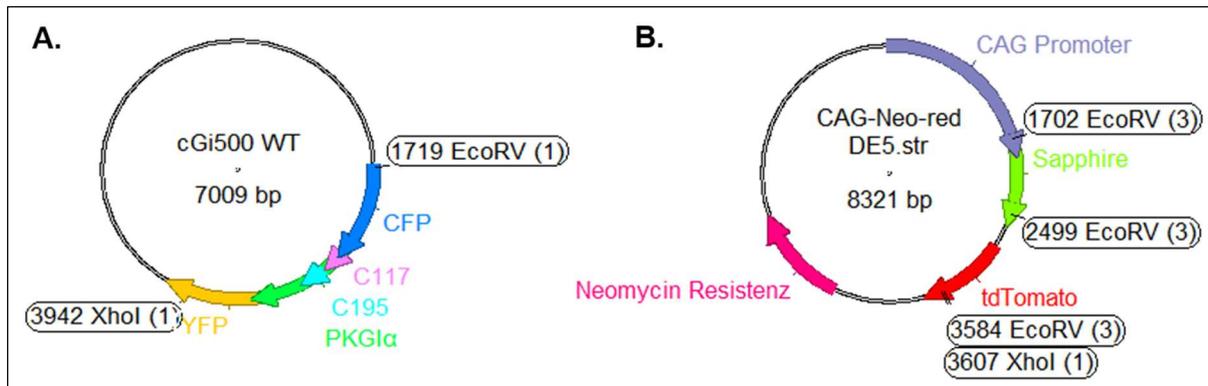


Abb. 2.2: cGi500 WT und CAG-Neo-redDE5 Vektor mit der Neomycin Antibiotika-Resistenz.

A. cGi500 WT Vektor mit den Schnittstellen EcoRV und XhoI. **B.** CAG-Neo-redDE5 Vektor enthält eine Neomycin-Kassette und die Fluoreszenzfluorophore „Sapphire“ und „tdTomato“. Die Schnittstellen von EcoRV und XhoI sind ebenfalls im Plasmid eingezeichnet.

Nach der Bestimmung der Konzentration wurden 3 µg der einzelnen Plasmide mit der Neomycin Antibiotika-Resistenz in die auf einer Zellkulturschale (Ø = 10 cm) ausplattierten HEK293-Zellen transfiziert (Kap. 2.2.2.5), und das Antibiotikum Geneticin (G418, 0.2 mg/ml) wurde nach 24 Stunden zum Medium gegeben. Geneticin wird in der Zellbiologie zur Selektion stabiler transfizierter Zellen, die das Neomycin-Gen tragen, verwendet. Die Zellen wurden über mehrere Wochen unter diesen Kultivierungsbedingungen selektioniert (Kap. 2.2.2.6) und auf vergleichbare Fluoreszenzintensität untersucht (Kap. 2.2.2.7). Nach der Selektion entstanden vier neue Zelllinien, die die Konstrukte cGi500-WT, cGi500-C117S, cGi500-C195S und cGi500-C177/195S stabil exprimieren, die durch die Neomycin Antibiotika-Resistenz erweitert wurden.

2.2.1.12 Klonierungsstrategie zur Herstellung des Twin-Strep-Tags® PKG1α-C117/195S Konstruktes

Das WT Konstrukt pcDNA 3.0-FSS+hPKG1α, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Friedrich Herberg (Universität Kassel, Abteilung Biochemie) zur Verfügung gestellt. Dieses wurde für die Aufreinigung von humaner PKG1α mit Hilfe der Twin-Strep-tag® Technologie verwendet. Außerdem wurde dieses Konstrukt ebenfalls zur Herstellung der humanen PKG1α-C117/195S Mutante verwendet.

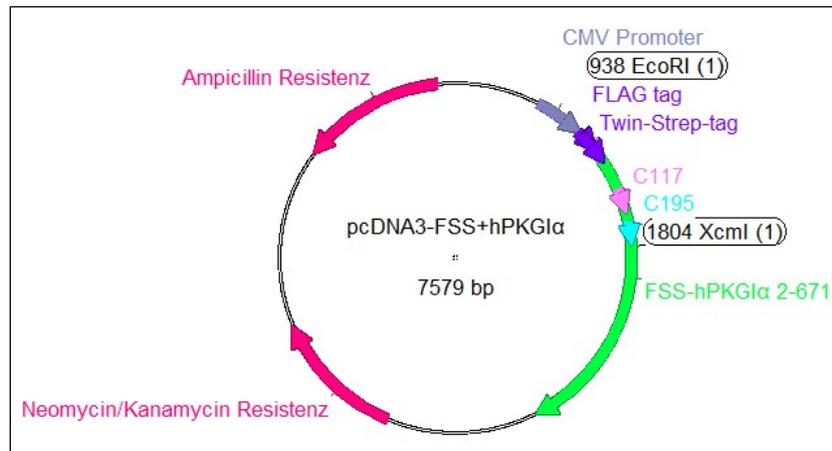


Abb. 2.3: Vektor pcDNA 3.0-FSS+hPKG1 α -WT mit einer Länge von 7579 b.p. Dieser Vektor enthält die komplette humane PKG1 α Sequenz (hellgrün) mit den darin enthaltenen cGMP-Bindungsdomänen und den Cysteinen 117 und 195, welche an den Cytomegalovirus- (CMV) Promotor gekoppelt ist. Zudem enthält der Vektor eine Neomycin/Kanamycin und Ampicillin-Resistenz. Die Schnittstellen für EcoRI und XcmI sind ebenfalls im Plasmid eingezeichnet. Über Twin-Strep-tag[®] lässt sich das WT PKG1 α Protein aufreinigen und über FLAG tag detektieren.

Zur Herstellung von pcDNA 3.0-FSS+hPKG1 α -C117/195S wurden die Cysteine 117 und 195, die sich in der cGMP-Bindungsdomäne A befinden, durch eine Mutation zu Serin ausgetauscht. Dabei wurde das für das Cystein kodierende Basen-Triplett TGT zu dem für das Serin-kodierende Basen-Triplett AGT ausgetauscht. Die Klonierung der Mutation C117/195S erfolgte in vier PCR-Ansätzen. Bei der ersten, zweiten und dritten PCR wurde als Template der Vektor pcDNA 3.0-FSS+hPKG1 α -WT verwendet. Die erste PCR wurde mit den Primern Nr. 1 und Nr. 4, die zweite mit Nr. 5 und Nr. 2 und die dritte mit Nr. 3 und Nr. 6 (Kap. 2.1.5) durchgeführt.

Die einzelnen Produkte der ersten drei PCRs wurden mittels Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Die Fragmente mit der Größe 513, 258 und 171 b.p. wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden zusammen gemischt und als Template für die vierte PCR verwendet. Die vierte PCR wurde mit den Primern Nr. 1 und Nr. 2 durchgeführt. Die Annealingtemperatur der Primer lag bei 55 °C. Es erfolgte im Anschluss der Verdau des Vektors pcDNA 3.0-FSS+hPKG1 α -WT mit den Enzymen EcoRI und XcmI und des PCR-Produktes mit den Enzymen MfeI und XcmI mit anschließender Auftragung auf das Agarosegel und die Gel-Aufreinigung. Nun konnten der geschnittene

Vektor und das geschnittene PCR-Produkt durch das Enzym T4 DNA Ligase ligiert werden. Die Sequenz von der Schnittstelle MfeI ist komplementär zur EcoRI Sequenz und passen somit zusammen, sodass die ursprüngliche EcoRI Schnittstelle im finalen Konstrukt nicht mehr zur Verfügung steht. Durch einen Kontrollverdau mit den Enzymen EcoRI und XcmI bzw. BamHI und XcmI konnte dieses Ergebnis überprüft werden. Nach der Midipräparation wurde das Konstrukt durch Sequenzierung verifiziert.

2.2.2 Zellkulturtechnik

Alle Arbeiten erfolgten unter der Sicherheitswerkbank HeraSafe™ HS 12 class II der Fa. Thermo Fisher Scientific und unter Einsatz von sterilen Materialien und Lösungen. Die HEK293- und VSMCs wurden in einem Kohlenstoffdioxid (CO₂) Inkubator HeraCell™ 240 der Fa. Thermo Fisher Scientific bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Eine mikroskopische Beurteilung der Zellen mit dem Mikroskop Leica DMI1 in Bezug auf Morphologie, Dichte und Differenzierungsgrad erfolgte täglich.

2.2.2.1 Kultivierung von Zellen

In dieser Arbeit wurden HEK-Zellen als eukaryotische Zelllinie eingesetzt. Hierzu wurden HEK293A Zellen für die Transfektion von WT- und mutierten Plasmiden eingesetzt. Die HEK293T Zellen wurden für *in vitro* Kinase Assays verwendet. Die primären aortalen VSMC wurden ebenfalls im selben Zellkulturmedium (Tab. 2.6) kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Das Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt und kurz vor Gebrauch auf 37 °C aufgewärmt.

Tab. 2.6: Herstellung des Zellkulturmediums.

Zusammensetzung	Menge
DMEM (mit 4,5 g/l Glucose)	440 ml
FCS	10%
L-Glutamin (200 mM)	1%
Pen/Strep (10.000 U/10 mg/ml)	1%

2.2.2.2 Auftauen von HEK-Zellen

Kryo-Röhrchen mit HEK-Zellen wurden kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Während dieser Zeit wurden 10 ml vorgewärmtes DMEM-Medium in einem 15 ml Greiner-Röhrchen vorgelegt. Die aufgetauten Zellen (ca. 1 ml) wurden ins Greiner-Röhrchen überführt, 5 Minuten bei 800 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale gegeben. Die Kultivierung erfolgte unter oben bereits aufgeführten Zellkulturbedingungen.

2.2.2.3 Passagieren von HEK-Zellen

Zellkulturmedium, Trypsin/EDTA und DPBS wurden zuerst auf 37 °C vorgewärmt. Das alte Medium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml DPBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden in einer neuen 10 cm Schale 10 ml frisches Medium vorgelegt. Die Zellen wurden im Anschluss mit 4 ml Medium abgelöst, resuspendiert und je nach gewünschter Zellzahl auf die neue Schale übertragen.

2.2.2.4 Einfrieren von HEK-Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen und Aufrechterhaltung der Zelllinien wurden die HEK-Zellen mit Hilfe des Einfriermediums (Tab. 2.7) in 1,5 ml Kryo-Röhrchen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Kryomedium wurde vorbereitet und auf Eis bis zur Verwendung gehalten. Dazu wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, von jeweils zwei 10 cm Schalen abgelöst und in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 15 ml Greiner-Tubes überführt und 5 Minuten bei 800 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Tab. 2.7: Herstellung von Einfriermedium.

Zusammensetzung	Menge
Kultivierungsmedium	50 ml
FCS	20%
DMSO	20%

Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 3 ml Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml wurden auf 3 Kryo-Röhrchen verteilt und in einen Gefrierbehälter überführt. Dieser Behälter wurde zuvor mit Isopropanol gefüllt und auf 4 °C abgekühlt. Der Behälter mit den gefüllten Kryo-Röhrchen wurde bei -80°C über Nacht gelagert und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt.

2.2.2.5 Transfektion von HEK-Zellen

Die Transfektion ist ein Verfahren, mit deren Hilfe exogene DNA in eukaryotische Zellen eingeführt und diese so genetisch verändert werden können (Kim und Eberwine 2010).

Für die *in vitro* Kinase Assays (Kap. 2.2.4) wurde eine transiente Transfektion durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mittels TurboFect mit den Plasmiden pcDNA-PKGI α -WT und respektiven Mutanten pcDNA-PKGI α -C117S, pcDNA-PKGI α -C195S und pcDNA-PKGI α -C177/195S transfiziert. Hierzu wurden auf einer 6-Well Platte je Well 240.000 Zellen ausplattiert und am nächsten Tag der Ansatz, bestehend aus 400 μ l Opti-MEM, 1 μ g Plasmid DNA und 6 μ l TurboFect nach 20-minütiger Inkubation dazugegeben.

Zur Aufreinigung der humanen WT Kinase und der Mutante C117/195S (Kap. 2.2.4.1) wurde eine Transfektion mittels Turbofect mit den Plasmiden pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α oder pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -C117/195S durchgeführt. Dabei wurden 2,25 Millionen HEK293T-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale transfiziert. Dafür wurde ein Ansatz aus 1 ml Opti-MEM, 10 μ g Plasmid DNA und 15 μ l TurboFect vorbereitet, 20 Minuten inkubiert und vorsichtig zu den Zellen gegeben.

Die Zellen wurden, wie für die *in vitro* Kinase Assays als auch für die Aufreinigung nach der Transfektion, unter bereits beschriebenen Kultivierungsbedingungen über Nacht gehalten. Am nächsten Morgen konnten die Zellen mit verschiedenen NO- oder HNO-Donoren stimuliert werden, oder die Zellen wurden abgelöst und für den nächsten Schritt eingefroren.

Zur Herstellung von stabilen Klonen (Abb. 2.4) wurde die Transfektion mittels Lipofektion angewendet. Hierzu wurden auf einer 10 cm Schale HEK293-Zellen ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. In einem 2 mL Reaktionsgefäß wurden 300 μ l DMEM, 3 μ g Plasmid DNA (cGi500-C117S, cGi500-C195S oder cGi500-C177/195S) und 7 μ l Lipofectamin pipettiert, kurz auf dem Vortexer gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine 10 cm Schale übertragen und bei 37 °C, 5% Kohlenstoffdioxid bis zu 30 Std kultiviert.

Sowohl die Transfektion mittels Lipofektion als auch mittels TurboFect eignen sich für alle hier beschriebenen Versuche. Diese Experimente wurden jedoch in verschiedenen Laboren durchgeführt. Deshalb wurde die jeweilige Methode gewählt, die in dem jeweiligen Labor etabliert ist.

2.2.2.6 Selektion stabiler Zelllinien mit Geneticin

Nach der Transfektion der HEK-Zellen mit den Plasmiden und einer Kultivierungszeit der Zellen von 24 bis zu 30 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und eine Zugabe des Selektionsantibiotikums Geneticin (0.2 mg/ml). Nach ca. 7-10 Tagen haben sich die meisten Zellen, die keine Antibiotikaresistenz enthielten, durch den Selektionsdruck abgelöst.

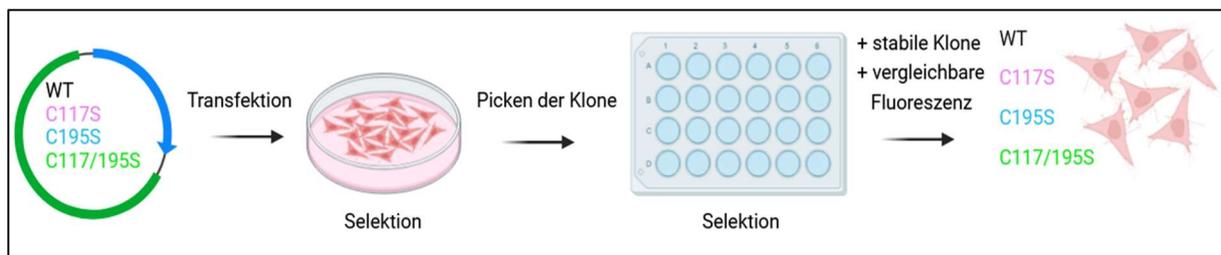


Abb. 2.4: Transfektion und Selektion stabiler Zelllinien mittels Antibiotika-Resistenz- und Fluoreszenzmikroskopuntersuchungen (erstellt mit BioRender.com).

Die überlebenden Zellen, die die Resistenz gegen das Antibiotikum in das Genom eingebaut hatten, bildeten kleine Kolonien. Die Zellen wurden mit einer 100 µl sterilen Pipettenspitze isoliert. Dazu wurde die Pipettenspitze mit 10 µl Medium gefüllt und gezielt auf einen gut sichtbaren Klon gerichtet. Durch das Auf- und Abpipettieren wurde der Klon gelöst und anschließend vorsichtig auf eine 48-Wellplatte übertragen, die bereits pro Well mit 500 µl Medium + Geneticin gefüllt war.

Zudem wurden die Zellen durch die Aufnahme von Fotos auf vergleichbare Fluoreszenzintensität überprüft (Kap. 2.2.2.7) und weiter propagiert, bis diese 80% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden mit 300 µl DPBS gewaschen und durch 100 µl Trypsin/EDTA gelöst. Auf diese Weise wurden die Zellen von einer 48-Wellplatte auf eine 24-danach 12- und 6-Wellplatte übertragen. Abschließend wurden die Zellen auf einer 10 cm Schale ausplattiert, gewartet, bis diese konfluent waren, und für die längere Lagerung in

Kryoröhrchen eingefroren. Somit konnten die Zellen mit einer Neomycin Antibiotika-Resistenz und vergleichbarer Fluoreszenz für entsprechende Folgeexperimente eingesetzt werden.

2.2.2.7 Selektion stabiler Zelllinien mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Biozero BZ 8100E der Firma Keyence hinsichtlich ihrer vergleichbaren Fluoreszenzintensität untersucht. Dazu wurden unter dem Mikroskop Aufnahmen einzelner Klone mittels „BZ Observation Application“ Software mit gleichen Einstellungen (insbesondere Belichtungszeit) angefertigt und miteinander verglichen. Die Sensorfluoreszenz der einzelnen Klone konnte mit dem Filter für das grün fluoreszierende Protein (GFP) ET525/50 nm detektiert werden. Die Klone, die eine geringe Fluoreszenzintensität gezeigt haben, wurden verworfen.

2.2.2.8 Konzentrationen, Inkubationszeiten und Herstellung von Inhibitor- und Stimulationslösungen für ein 6-Well Platten-Format

Als NO-Donor wurde SNP und als HNO-Donoren NCA und CXL-1020 verwendet. Die verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Substanzen wurden aufgrund der publizierten Angaben zu SNP (Nikolaev et al. 2006), NCA (Donzelli et al. 2017) und CXL-1020 (Diering et al. 2020) sowie aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (Kap. 3.2.2) ermittelt. Die saturierenden Endkonzentrationen betragen für HNO-Donoren NCA 100 μM , für CXL 300 μM und für den NO-Donor SNP 50 μM . Die Inkubationszeiten der einzelnen Donoren wurden aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten bzw. der HNO-Freisetzungskinetiken der Substanzen sowie der o.g. Publikationen gewählt. Die Stimulation der Zellen vor der Messung erfolgte für die HNO-Donoren NCA 30 Minuten, CXL-1020 20 Minuten und für den NO-Donor SNP 10 Minuten. Beim Einsatz des sGC-Inhibitors ODQ erfolgte eine 10-minütige Vorinkubation der Zellen mit ODQ, bevor die eigentliche Stimulation der Zellen mit NO- und den HNO-Donoren erfolgte. Die Endkonzentration von DMSO im Medium betrug dabei 0,1%.

- Zur Herstellung von 10 μM ODQ wurden 2 μl einer 100 mM ODQ Lösung in 18 μl DMSO verdünnt. Daraus wurden 2 μl entnommen und zu den 2000 μL Medium pro Well gegeben.
- Zur Herstellung einer 50 μM SNP-Lösung wurden 15 mg SNP eingewogen und in 1 ml DPBS (50 mM SNP-Lösung) gelöst. 2 μl einer 50 mM SNP-Lösung wurden in 2000 μl Medium gelöst.

- Die 100 μM NCA Lösung wurde hergestellt, indem zuerst 5 mg NCA in 10 μl DMSO (2 M NCA-Lösung) gelöst wurden. Aus dieser 2 M NCA-Lösung wurden 2 μl entnommen und mit 38 μl DMSO verdünnt. So entstand eine 100 mM NCA-Lösung. 2 μl der 100 mM NCA-Lösung wurde zu 2000 μl Medium übertragen und die Zellen somit mit 100 μM NCA-Lösung stimuliert.
- Zur Herstellung von 300 μM CXL-1020 wurden 1 mg CXL-1020 in 13,3 μl DMSO (300 mM CXL-1020 Lösung) gelöst. 2 μl der 300 mM CXL-1020 Lösung wurden zu den 2000 μl Medium pro Well dazugegeben.

2.2.2.9 Stimulation der HEK293 Zellen, die stabil die Sensoren cGi500 exprimieren

Zum Nachweis einer Intradisulfidbrücke wurden 240.000 HEK293 Zellen (Kap. 2.2.3.1), die stabil die Sensoren cGi500 WT und Mutanten C117S, C195S, C117/195S exprimieren in 2000 μl Medium auf einer 6-Well Platte ausplattiert und nach 24 Stunden mit 100 μM NCA, 300 μM CXL-1020 und 0,1% DMSO als Kontrolle mit und ohne ODQ Vorinkubation stimuliert (Kap. 2.2.2.8). Die Zellen wurden nach der Behandlung mit 1 ml reduzierendem oder nicht reduzierendem 3x Laemmli Probenpuffer abgelöst. Im Anschluss erfolgte eine Western Blot Analyse (Kap. 2.2.5).

2.2.3 FRET-Messungen

2.2.3.1 Vorbereitung einer 96-Well Assayplatte zur Messung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen und Einzelmessungen

Zur Stimulation und Messung der NO- und HNO-induzierten Konformationsänderung wurden die WT und Mutanten cGi500 stabil exprimierenden Zelllinien auf eine 96-Well Assayplatte der Firma Corning ausplattiert. Für die Bestimmung der Zellzahl und Umsetzung wurde eine 10 cm Schale mit konfluenten Zellen von cGi500 WT und Mutanten verwendet.

In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 5 ml Medium vorgelegt. Die Zellen wurden, wie in Kap. 2.2.2.3 beschrieben, von der Platte abgelöst und 5 ml der Zellsuspension zum vorgelegten Medium übertragen. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 40 μl Medium und 20 μl Trypan Blau vorgelegt. Im Anschluss wurden 40 μl Zellsuspension der Vorverdünnung dazupipettiert. Von dieser Lösung wurden 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellzahl bestimmt.

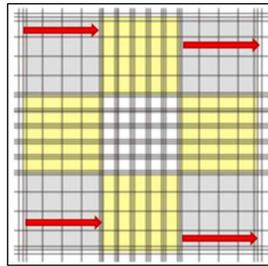


Abb. 2.5: Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauerkammer. Die mit roten Feilen markierten 16 Kästchen wurden zur Bestimmung der Zellzahl ausgezählt. Die Anzahl der Zellen wurde mit 104 Zellen pro 1 ml multipliziert und mit 2,5 x Verdünnungsfaktor verrechnet. Beispielsweise wurden 25 Zellen ausgezählt. Dies entspricht 250.000 Zellen pro 1 ml bzw. 25.000 Zellen pro 100 μ l, multipliziert mit Verdünnungsfaktor ergeben sich 62500 Zellen pro 100 μ l. Um 22.000 Zellen in 100 μ l zu erhalten, wurden $22.000/62.500 \times 100\mu\text{l} = 35,2 \mu\text{l}$ Zellsuspension und 68,8 μ l Medium in einem Well zusammen pipettiert.

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden 22.000 Zellen für die Messungen am nächsten Tag und 15.000 für den übernächsten Tag pro Well ausplattiert.

Kurz vor der Messung wurde die 96-Well Platte mit den Zellen aus dem Inkubator entnommen und das Medium von der Platte entfernt, indem die Platte über den Kopf gekippt wurde. Im Anschluss wurde zu den Zellen 170 μ l FRET-Puffer (Tab. 2.8) mit einer Multikanalpipette dazugegeben. Die Messung konnte nun erfolgen.

Tab. 2.8: Herstellung von FRET-Puffer. Alle Substanzen wurden zusammen gemischt, auf 1 l aufgefüllt und mit 10 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen 0,22 μ M Filter gefiltert und bei RT aufbewahrt.

Zusammensetzung	Menge
NaCl	144 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM

2.2.3.2 Vorbereitung einer „Compound“-Platte mit NO- und HNO-Donoren zur Messung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Zur Bestimmung von Konzentrationswirkungsbeziehungen für die WT und Mutanten cGi500 exprimierenden Zelllinien wurden FRET-Signalamplituden für die jeweiligen Konzentrationen von NO und HNO-Donoren aufgenommen. Als NO-Donor wurde SNP und als HNO-Donoren NCA und CXL-1020 verwendet. Die NO und HNO Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen und als Doppelbestimmung auf die „Compound“-Platte aufgetragen (Abb. 2.6).

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M	10 μ M
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Abb. 2.6: Pipettiermuster der „Compound“-Platte für NO- und HNO-Donoren.

Da von der „Compound“-Platte 30 μ l der NO/HNO-Donorlösung durch das Hochdurchsatzplattengerät FlexStation3[®] zu den Zellen mit 170 μ l FRET-Puffer übertragen wurden, ergab sich ein Verdünnungsfaktor von 6,67. Die Compounds selbst mussten deshalb in einer 6,67-fach höheren Konzentration auf der Platte vorbereitet werden. Hierzu wurden zunächst zur Herstellung einer 200 mM Stammlösung 5 mg NCA in 100 μ l DMSO gelöst. In einem 5 ml Reaktionsgefäß wurden zur Herstellung einer 300 μ M bzw. 2000 μ M NCA-Lösung 3960 μ l FRET-Puffer vorgelegt und 40 μ l von der 200 mM NCA-Lösung zusammengemischt. Nach diesem Rechnungsbeispiel wurden die restlichen Konzentrationen berechnet.

Für die Herstellung einer 200 mM CXL-Stammlösung wurden 5 mg CXL-1020 in 100 μ l DMSO gelöst und nach dem vorherigen Rechenbeispiel weiterhin verdünnt und auf die Platte übertragen. CXL-1020 muss aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit stets kurz vor der Messung in FRET-Puffer verdünnt werden. Das bedeutete, dass jede einzelne Konzentration von CXL-1020 einzeln auf der Platte vermessen werden musste.

Der NO-Donor SNP wurde in gewünschter Menge abgewogen und direkt in FRET-Puffer gelöst. Zur Herstellung von 1 ml einer 200 mM Stammlösung wurden 0,0596 g SNP

eingewogen. Nachdem die Verdünnungen angesetzt wurden, konnten diese auf die „Compound“-Platte aufgetragen werden.

2.2.3.3 FRET-Messungen mit dem FlexStation3[®] Hochdurchsatzplattengerät

Die Stimulation und Messung der WT und Mutante cGi500 stabil exprimierender Klone wurde mittels des Hochdurchsatzplattengerätes FlexStation3[®] (Abb. 2.7) durchgeführt. Dieses Gerät ist nicht nur in der Lage eine simultane Messung von 8 Wells durchzuführen, sondern auch die Donoren von der „Compound“-Platte mittels der im Gerät eingebauten 8-Kanalpipette auf die 96-Well Platte mit den zuvor ausplattierten Zellen zu übertragen. Die Stimulation mit NO/HNO führt zur Abnahme der YFP- und zu einem Anstieg der CFP-Fluoreszenz. Das Verhältnis von CFP/YFP reflektiert dabei den Anstieg der cGMP Konzentration oder die Konformationsänderung des Sensors durch Oxidation.

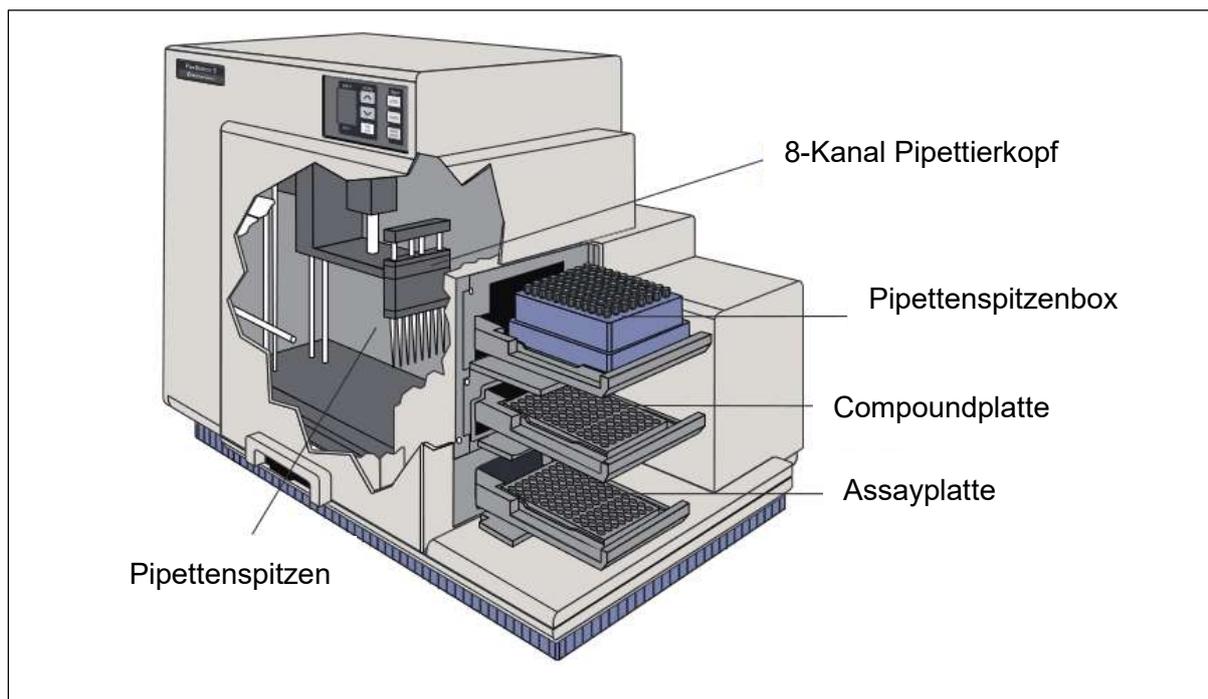


Abb. 2.7: Hochdurchsatzplattengerät FlexStation3[®]. Das Gerät besitzt eine Multikanalpipette mit auswechselbaren Pipettenspitzen zur Verminderung von Kreuzkontaminationen und drei verschiedenen automatisch ausziehbaren Vorrichtungen für Pipettenspitzen, Compoundplatte und Assayplatte.

Die Einstellung „Flex-Read“ wurde ausgewählt. Das Ausgangsvolumen der Assayplatte betrug dabei 170 μl pro Well. Die Eintauchhöhe der Pipette betrug 150 μl und es wurden 30 μl der zuvor angesetzten Donorsubstanzen von der „Compound“-Platte auf die Assayplatte transferiert. Die Geschwindigkeit der Zugabe betrug dabei ~ 31 $\mu\text{l/s}$ mit der Einstellung „Rate 2“. Für die Auslesung der Daten wurde die Einstellung „Fluoreszenz“ ausgewählt. Die FRET Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Wellenlänge 1: Exzitation 440 nm, Emission 485 nm, Cutoff 455 nm.

Wellenlänge 2: Exzitation 440 nm, Emission 535 nm, Cutoff 455 nm.

Die Messzeit pro Experiment betrug dabei 1200 Sekunden mit einem Messintervall von 10 Sekunden. Für die automatische Anzeige und Berechnung der Ergebnisse wurde die Wellenlängenkombination „Lm1/Lm2“ ausgewählt. Die kinetische Reduktion wurde als „Max – Min“ dargestellt und die Basislinie in Prozent (%) angezeigt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Origin8.5G. Hierzu wurden die resultierenden FRET Signale auf die bei der höchsten Konzentration gemessene maximale Amplitude normalisiert und als „% max“ dargestellt.

2.2.3.4 FRET-Messungen in Zelllysaten

Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen und FRET-Messungen in Zelllysaten nach Gabe einer definierten HNO-Donor Konzentration, wurden HEK293 Zellen mit stabil exprimierten Sensoren cGi500 WT und Mutanten C117S, C195S, C117/195S auf vier 10 cm Schalen pro Konstrukt ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml FRET-Puffer pro Zellkulturschale gewaschen. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen für 20 Min mit 100 μM NCA bzw. 10 Minuten mit 300 μM CXL-1020 im FRET Puffer bei RT. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut vorsichtig mit FRET Puffer gewaschen. Im Anschluss daran wurden 1 ml FRET-Puffer zu den Zellen gegeben und alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte entfernt, die Zellsuspension in 2 ml Eppis überführt und für 20 Sekunden mittels des Ultraturrax-Gerätes (Stufe 4) aufgeschlossen. Die Lysate wurden anschließend in die Untrazentrifugationsröhrchen überführt und 20 Minuten bei 80.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Zur Bestimmung der CFP/YFP Ratio wurden direkt 200 μl von den Überständen auf die 96-Wellplatte übertragen und mit der FlexStation3[®] vermessen.

Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für cGMP wurden Zellysate ohne vorherige Stimulation hergestellt, auf der 96-Wellplatte mit aufsteigenden Konzentrationen von cGMP (0,01; 0,1; 1; 10; 100 μM) *in vitro* stimuliert und direkt gemessen.

2.2.4 PKGI α Aktivitätsassays

2.2.4.1 *In vitro* PKGI α Assay mit rekombinantem Substrat C1-M-C2

Die Aktivität der PKGI α -WT und Mutanten wurde anhand der Phosphorylierung des mit His₆-tag markierten rekombinant exprimierten und gereinigten Substrates C1-M-C2 (13,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in Gegenwart von ATP *in vitro* untersucht (Donzelli et al. 2017). Das Substrat ist ein rekombinantes Protein, bestehend aus den N-terminalen C1-, M- und C2-Domänen des kardialen Myosin-Bindeproteins C, das die Aminosäuren 153-450 enthält. Das Myosin-Bindeprotein wurde als Substrat der PKGI α beschrieben (Thoonen et al. 2015).

Für den Assay wurden 240.000 HEK293T-Zellen pro Well mit 1 μg pcDNA-PKGI α -Plasmiden WT, C117S, C195S und C177/195 mittels TurboFect transfiziert (Kap. 2.2.2.5). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 0,1% DMSO als Kontrolle und den NO- und HNO-Donoren stimuliert (Kap. 2.2.2.8). Im Anschluss erfolgte die Ablösung der Zellen in 500 μl Lysis Puffer (Tab. 2.10). Jeweils 50 μl der einzelnen Proben wurden für den *in vitro* PKGI α Assay verwendet. Diese Proben wurden 1:1 mit Assay Puffer (Tab. 2.9), der 100 μM ATP als Endkonzentration enthielt, verdünnt. Die restlichen 450 μl wurden in zwei einzelne Proben aufgeteilt und mit reduzierendem (9% β -Mercaptoethanol, [Tab. 2.11]) oder nicht reduzierendem 3x Laemmli Probenpuffer (100 mM Maleimid, [Tab. 2.11]) verdünnt.

Um die Phosphorylierung zu starten, wurden 20 μg /Reaktion des an die Ni-NTA Agarose Perlen gebundenen Substrates C1-M-C2, das in Assay Puffer umgepuffert war, zu den 50 μl Proben dazugegeben. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 30 °C im Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 2000 g für 1 Minute. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Agarose Beads in 75 μl reduzierendem 3x Laemmli Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 75 °C hitzeinaktiviert und im Anschluss erfolgte eine Western Blot Analyse (Kap. 2.2.5).

Tab. 2.9: Herstellung von *in vitro* Kinase Assay Puffer.

Zusammensetzung	Menge
Tris pH 7.4	30 mM
MgCl ₂	15 mM

Tab. 2.10: Herstellung von Lysis Puffer für *in vitro* Kinase Assay.

Zusammensetzung	Menge
Tris pH 7.4	30 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
NaF	2 mM
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette

Tab. 2.11: Nicht reduzierender 3x Laemmli Puffer mit Maleimid und reduzierender 3x Laemmli Puffer mit β -Mercaptoethanol

Zusammensetzung	Menge	Menge
Tris pH 6.8	187.5 mM	187.5 mM
Glycerol	30% (v/v)	30% (v/v)
SDS	6% (w/v)	6% (w/v)
Bromophenol blau	0,03% (w/v)	0,03% (w/v)
± Maleimid	100 mM	
± β -Mercaptoethanol		9% (v/v)

2.2.4.2 Spektrophotometrischer Kinase Aktivitätsassay mit gereinigter PKG1 α und synthetischem Substrat VASptide

Die Aufreinigung sowie der Cook-Assay wurden mit freundlicher Unterstützung im Institut für Biochemie in Kassel bei Prof. Dr. Friedrich Herberg durchgeführt.

2.2.4.2.1 Aufreinigung der humanen PKG α -WT und C117/195S

Zur Aufreinigung humaner WT- (hPKG α -WT) und C117/195- (hPKG α -C117/195S) Kinasen erfolgte zuerst die Transfektion der Volllängen pcDNA 3.0-FSS+hPKG α -WT und pcDNA 3.0-FSS+hPKG α -C117/195S Plasmide in HEK293 Zellen nach Kap. 2.2.2.5. Die Aufreinigung konnte danach aufgrund des vorhandenen und im Expressionsplasmid eingebauten Twin-Strep-tags[®] durchgeführt werden. Das rekombinante Protein bindet spezifisch mit dem Twin-Strep-tag[®] an die StrepTactin[®]XT Matrix der Säule. Dadurch können alle nicht gebundenen, unspezifischen Proteine durch den physiologischen Waschpuffer entfernt werden. Die Elution erfolgt mittels hoher Konzentration an Biotin im Elutionspuffer, welches mit dem gewünschten Protein um die Bindestelle in der Matrix konkurriert. Bei der Elution wird das rekombinante Protein in einem 1,5 ml Gefäß aufgefangen und die Konzentration im Anschluss bestimmt.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben. Die Säule für die Aufreinigung des Proteins wurde mit der Strep-Tactin Superflow[®] Agarose beladen und mit dem Lysepuffer equilibriert. Das Zellpellet wurde aufgetaut und in 10 ml Lysepuffer (Tab. 2.12) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mittels einer Metallspritze homogenisiert, 30 Minuten bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert und anschließend bei 40.000x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,22 μ m Filter gefiltert, auf die zuvor präparierte und äquilibrierte Säule aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen. Nicht gebundene und unspezifische Proteine wurden in vier Waschrufen mit jeweils 2 ml Puffer von der Säule entfernt. Der erste Waschrufen erfolgte mit Lysepuffer, der zweite mit Phosphatpuffer bei RT und der dritte und vierte mit Waschpuffer bei 4 °C. Das Zielprotein PKG α wurde mit Elutionspuffer in vier bis fünf Schritten von der Säule eluiert. Im ersten, dritten, vierten und fünften Schritt wurde mit 400 μ l und im zweiten mit 700 μ l eluiert. Nach jeder Elution erfolgte eine Probenahme und Überprüfung der jeweiligen Proteinkonzentration via Bradford-Proteinassay-Schnelltest. Dazu wurden 47 μ l Bradford Reagenz (Bio-Rad) mit 3 μ l der jeweiligen Elutionsfraktion gemischt. Die Elutionsproben mit der höchsten Konzentration wurden miteinander vereint und für den Austausch des Puffers zu Lagerungspuffer auf eine Nap-10 Säule übertragen. Anschließend wurde ebenfalls die Proteinkonzentration mit dem Bradford-Proteinassay bestimmt. Zur Überwachung des Aufreinigungsprozesses und der Überprüfung der Reinheit des exprimierten Proteins wurden Proben entnommen und mittels SDS-Page detektiert. Dazu wurden 20 μ l der Probe "Zelllysat" (C), "Überstand" (S), "Pellet" (P), "Durchfluss" (F), "Waschen" und "Elution" mit 80 μ l 5x SDS Probepuffer vermischt. Auch 20 μ l der Proben der einzelnen Wasch- und Elutionsschritte

sowie der Probe nach dem Austausch des Puffers wurden mit 20 µl 5x SDS Probepuffer versetzt und auf das 12% Gel aufgetragen.

Tab. 2.12: Herstellung von Aufreinigungs- und Lagerungspuffer.

Lyse- + Waschpuffer 1	Waschpuffer 2	Elutionspuffer	Lagerungspuffer
50 mM Tris pH 7,3	366 mM Na ₂ HPO ₄	200 mM Tris pH 8,0	50 mM Tris pH 7,3
150 mM NaCl	134 mM NaH ₂ PO ₄	300 mM NaCl	150 mM NaCl
0,5 mM TCEP	0,5 mM TCEP	2 mM EDTA	0,5 mM TCEP
1 Tablette cOmplete-Protease Inhibitor Cocktail		5 mM Desthiobiotin	
1 Tablette PhosSTOP™-EasyPack			
0,4% Tween20			

2.2.4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradford-Proteinassay wurde durch M. Bradford 1976 (Bradford 1976) entwickelt und ermöglicht eine schnelle, genaue Bestimmung der Proteinkonzentration mittels spektrophotometrischer Analyse. Dazu wurde ein Mix aus 8 µl Proteinlösung und 800 µl ddH₂O hergestellt, mit 200 µl der 5x Bradford Reagens vermischt und das Gemisch für 15 Minuten abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch bei einer Extinktion von 595 nm im Spektralphotometer Specord 205 von Analytik Jena vermessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zuerst eine Eichgerade aus Serumalbumin (BSA) ermittelt. Anhand der daraus entstandenen Steigung wurde die Konzentration des gewünschten Proteins ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde mindestens drei Mal bestimmt und der Mittelwert dieser Messung berechnet.

2.2.4.2.3 Untersuchung der PKG α Aktivität mittels eines spektrophotometrischen Assays (Cook Assay)

Die Charakterisierung der enzymatischen Parameter, sowohl der spezifischen Aktivität als auch der Aktivierungskonstante k_{akt} von hPKG α -WT und hPKG α -C117/195S, erfolgte mittels eines spektrophotometrischen Assays nach Cook P. F. (Cook et al. 1982). In drei miteinander gekoppelten biochemischen und im stöchiometrischen Gleichgewicht ablaufenden Reaktionen wurde die Phosphorylierung des synthetischen Peptidsubstrats VASptide (GeneCust Europe) unter Verbrauch von ATP indirekt über NADH+H⁺ Messung photometrisch detektiert. NADH+H⁺ kann im Gegensatz zu oxidiertem NAD⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm das Licht absorbieren und somit bei dieser Wellenlänge vermessen werden. Das ATP, welches im ersten Schritt aus der Phosphorylierung des Substrates durch PKG α entstand, wird im nächsten Schritt durch das Enzym Pyruvatkinase und den Zusatz von Phosphoenolpyruvat (PEP) erneut zu ATP regeneriert. Zusätzlich zu ATP entsteht bei der Reaktion das Produkt Pyruvat. In der abschließenden Reaktion wird das Pyruvat mit Zusatz von NADH+H⁺ durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat und NAD⁺ umgesetzt. Die spezifische Aktivität der PKG α konnte über die Extinktionsänderung pro Zeit nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt werden:

$$\text{spezifische Aktivität} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\Delta E_{340nm} \cdot \left(\frac{V_G}{V_{PKG}} \right)}{\epsilon_{NADH} \cdot c_{PKG\alpha} \cdot d}$$

$V_G/V_{PKG\alpha}$:	Verdünnungsfaktor des Proteins (Gesamtvolumen (V_G) / Volumen der PKG α ($V_{PKG\alpha}$))
ΔE_{340} :	Steigung der Absorptionskurve bei 340 nm
ϵ_{NADH} :	Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm ($6,2810^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
$c_{PKG\alpha}$:	Massenkonzentration der eingesetzten PKG α (mg/ml)
d:	Dicke der Küvette (1 cm Durchmesser)
U/mg:	Units/mg ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)

Die spezifische Aktivität gibt die Menge des Substrats an, das pro Zeiteinheit von einem mg Enzym umgesetzt wurde. Zur Bestimmung der Aktivierungskonstante k_{Akt} , welche die Menge an cGMP angibt, bei der die halbmaximale Aktivität des Enzyms erreicht wurde, wurde cGMP in ansteigender Konzentration eingesetzt. Kalkulierte Werte der spezifischen Aktivität wurden gegen logarithmische cGMP Konzentrationen aufgetragen und mit einer sigmoidalen Kurve durch die GraphPad Prism 8.0.1 Software gefittet. Der EC_{50} Wert dieser Kurve entspricht k_{Akt} .

Für den Cook-Assay (2x) wurden die in der Tab. 2.13 aufgeführten Reagenzien zusammen pipettiert und vor Beginn der Messung das Mikroplattenlesegerät CLARIOstar oder POLARstar mit NADH (7,6 mg/ml) zwischen 0,9 und 1 geeicht.

Tab. 2.13: Herstellung von Cook-Assay Mix mit Substrat VASPtide.

Zusammensetzung	Menge
MgCl ₂	20 mM
MOPS (PH 7.0)	100 mM
PEP	2 mM
LDH	2750 U/ml
ATP	2 mM
Pyruvatkinase	2000 U/ml
VASPtide	2 mM

In einer 96-Well Platte wurde der Cook-Assay Mix zu der bereits aufgetragenen cGMP Verdünnungsreihe gegeben. Um die Reaktion zu starten, wurde hPKGI α -WT oder hPKGI α -C117/195S (Endkonzentration: 2,5 nM) mit oder ohne dem HNO-Donor NCA (Endkonzentration: 100 μ M) pipettiert, so dass ein Verdünnungsverhältnis zwischen Cook-Assay Mix, cGMP und Protein von 2:1:1 entstand. Die Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm für 15-20 Minuten vermessen.

2.2.4.3 Untersuchung der PKGI α Aktivität durch endogene VASP-Phosphorylierung

Die Untersuchung der Aktivität von PKGI α -WT und Mutante erfolgte mittels Phosphorylierung des endogen exprimierten Substrats VASP in primären aortalen VSMCs. Hierzu wurden VSMCs aus Aorten der Maus (Kap. 2.2.6.3) isoliert und kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz, wurden diese mit 0,1% DMSO als Kontrolle, NO- und HNO-Donoren mit und ohne ODQ stimuliert (Kap. 2.2.2.8). Die Zellen wurden im Anschluss mit 100 μ l Lysis Puffer (Tab. 2.14) abgelöst. Davon wurden 80 μ l des Lysats in 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und mit 40 μ l des reduzierenden 3x Laemmli Puffer versetzt. Im Anschluss wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C gekocht und bis zur Western Blot Analyse (Kap. 2.2.5) eingefroren.

Tab. 2.14: Herstellung von Lysis Puffer für *ex vivo* Kinase Assay.

Zusammensetzung	Menge
Tris pH 7.4	187.5 mM
Triton X-100	1% (v/v)
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	6% (w/v)

2.2.5 Proteinanalyse

2.2.5.1 SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (eng. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis [SDS-PAGE]) ist eine analytische, gelelektrophoretische Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse. Ein Gel bestehend aus Stapel- und Laufgel wurde unmittelbar vor der Analyse gegossen. Dieses bestand aus 10 bis 15 Probetaschen in einer Dicke von 1,0 mm. Zur Detektion von PKG1 α wurde ein Laufgel von 7,5% Acrylamid angesetzt. Zur Analyse von VASP und C1-M-C2 wurde ein Laufgel von 10-10,5% und ein 12%iges Gel zur Detektion des Aufreinigungsprozesses von PKG1 α angefertigt. Die Zusammensetzung der Gele ist in der Tab. 2.15 aufgeführt. Alle reduzierten Proben wurden kurz vor der Auftragung bei 95°C für 5 Minuten bzw. bei 75°C für nicht reduzierte Proben gekocht. Auf das Gel wurden 10-15 μ l pro Probe aufgetragen. Der Proteinmarker (5 μ l) wurde an die erste Position des Gels aufgetragen. Die Proben wurden bei 200 V für ca. 50 Minuten im Laufpuffer (Tab. 2.17) aufgetrennt. Die Proben, in denen VASP detektiert wurde, wurden gesondert behandelt und bei 100 V für 30 min und 130 V für 1 Stunde aufgetrennt. Die Proben der Aufreinigung C, S, P, und F wurden ebenfalls gesondert behandelt, auf das Gel aufgetragen und bei 300 V für 35-40 min laufen gelassen. Das Gel mit den aufgetrennten Aufreinigungsproben wurde ins deionisierte Wasser übertragen und drei Mal für 1 Minute bei 600 W in der Mikrowelle erhitzt. Das Wasser wurde nach jedem Schritt der Erhitzung gewechselt und im Anschluss erfolgte eine Färbung des Gels mit Coomassie Blau Lösung. Die Gele von *in vitro* Kinase Assays und VASP-Phosphorylierung wurden für die Western Blot Analyse (Kap. 2.2.6) verwendet.

Tab. 2.15: Herstellung von Stapel- und Laufgel mit unterschiedlichen Acrylamid Konzentrationen.

Zusammensetzung	Laufgel (7,5%)	Laufgel (10%)	Laufgel (12%)	Stapelgel
Acrylamid (30% w/v)	2,5 ml	3,3 ml	4 ml	1,16 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	3 ml	2,5 ml (pH 6,8)
H ₂ O	4,98 ml	4,2 ml	3,2 ml	6,23 ml
APS (10% w/v)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tab. 2.16: Herstellung von 4x Tris/SDS.

Zusammensetzung	4x Tris/SDS (Laufgel)	4X Tris/SDS (Stapelgel)
Tris	1.5 M (pH 8,8)	0,5 M (pH 6,8)
SDS	0,4% (v/w)	0,4%(v/w)

Tab. 2.17: Herstellung von SDS-Lauf- und Coomassie Blue Färbung.

Zusammensetzung	SDS-10x Laufpuffer	Zusammensetzung	Coomassie Blue Färbung
Tris	0,25 M	Phosphorsäure	12%
Glycin	1,92 M	Ethanol	4%
SDS	0,4% (v/w)	2-Hydroxypropyl-β- cyclodextrin (Arcos)	2% (w/v)
		Coomassie Brilliant Blue G250	0,05% (w/v)

2.2.5.2 Western Blot-halbtrockener/tankbasierter Proteintransfer

Die Western Blot Analyse dient zur Übertragung von Proteinen auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, die während des SDS-PAGE Verfahrens nach ihrer Größe aufgetrennt worden sind. Diese Membran wird im Anschluss zur Immunodetektion verwendet. Die Western Blot Analyse für *in vitro* Kinase Assays mit rekombinantem Substrat C1-M-C2, Detektion der Expression von PKG α aus Proben verschiedener Organe sowie die cGi500 Detektion erfolgte mittels halbtrockenen Transfers. Experimente mit VSMCs und

endogenem Substrat VASP wurden mittels eines tankbasierten Transfers analysiert. Das tankbasierte Verfahren lässt erfahrungsgemäß die Phosphorylierung von VASP am besten detektieren (Kobsar et al. 2012).

Sowohl für den halbtrockenen als auch für den tankbasierten Proteintransfer wurden zunächst Membranen und Filterpapier in einer Größe von 8,5 x 5,5 cm für den halbtrockenen bzw. 9 x 7 cm für den tankbasierten Transfer zugeschnitten. Membranen aus PVDF wurden kurz vor Anwendung in Methanol für 10 Sekunden aktiviert und im Anschluss in Transferpuffer gespült. Membranen aus Nitrocellulose und Filterpapier wurden direkt in Transferpuffer getränkt und bis zur Anwendung dort inkubiert. Die Auswahl der Membran erfolgte nach der Angabe des Herstellers für den jeweiligen Antikörper. Für den Transfer wurde ein symmetrisches Western Blot Sandwich, bestehend aus jeweils 8x Filterpapierstücken, Membran und Gel hergestellt. Dabei werden die Membran und das Gel zwischen 8 Lagen von Filterpapier (je 4 Filterpapierstücke pro Seite) gelegt. Dieses Western Blot Sandwich wurde für den tankbasierten Transfer in einen Western Blot Rahmen gelegt und anschließend in die vertikale Elektrophorese Zelle Western Blot Mini-PROTEAN® Tetra Vertical, gefüllt mit kaltem 1x Transferpuffer (tankbasiert, Tab. 2.18) befestigt. Für den halbtrockenen Transfer wurde das Sandwich direkt auf die TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Einheit gelegt. Dabei wurde auf die Oberflächen des Gerätes etwas 1x Transferpuffer (halbtrocken, Tab. 2.18) aufgetragen. Die Membran in beiden Geräten wurde in Richtung Anode ausgerichtet, so dass die negativ geladenen Proteine zu der Anode migrieren konnten. Der halbtrockene Transfer der Proteine erfolgte für 2 Stunden bei konstantem Strom von 45 mA per Membran, dagegen dauerte der tankbasierte Transfer 1 Stunde bei 100 V.

Tab. 2.18: Herstellung von Transferpuffer, halbtrocken und tankbasiert.

Zusammensetzung	10x Transferpuffer, halbtrocken	10x Transferpuffer, tankbasiert
Tris	0,048 M (pH 8,3)	0,33 M Tris (pH 7,6)
Glycine	0,038 M	1,9 M NaCl
SDS	0,037% (w/v)	
Methanol	20% (v/v)	20% (v/v)

2.2.5.3 Immunoblotting

Das Immunoblotting dient zur halbquantitativen Detektion der Proteine nach Abschluss der Übertragung von Proteinen auf die Membran. Die unspezifisch bindenden Proteine auf der Membran wurden mit Hilfe eines Blockierungspuffers bestehend aus 0,5%-10% (w/v) Milch oder 5% (w/v) BSA in 1x TBST (eng. Tris-buffered saline with Tween® 20 [Tab. 2.18]) für 30 Minuten blockiert. Im Anschluss wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und mit den primären Antikörpern bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal in 1x TBST für 10 Minuten gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, der spezifisch an den primären bindet, für 1 Stunde inkubiert und im Anschluss erneut 3-mal für 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper wurden in 0,5%-1% Milch oder in 5% BSA angesetzt. Die BSA- und Milchkonzentration als auch die Verdünnung des Antikörpers sind abhängig vom verwendeten Antikörper und sind der Anweisung des Antikörper-Herstellers zu entnehmen bzw. in Kap. 2.1.10 und 2.1.11 zusammengefasst.

Die Entwicklung der Membran und Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz in einem ChemiDoc System oder durch Benutzung von Fotofilmen in Kombination mit Entwickler- und Fixierlösung. Dazu wurde die Membran 2 Minuten in 2 ml Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) Lösung inkubiert. Es wurden unterschiedliche Belichtungszeiten ausprobiert und die Aufnahmen mit der bestmöglichen Qualität ausgewählt.

Tab. 2.19: Herstellung von TBST für Immunoblotting.

Zusammensetzung	10x TBS	Zusammensetzung	1x TBS mit Tween® 20 (TBST)
Tris	0,2 M	10x TBS (v/v)	10%
NaCl	1,37	Tween® 20 (v/v)	0,1%

2.2.6 Mausexperimente

Dr. Boris Skryabin (TRANsenic animal Model facility in Münster) generierte mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie heterozygote Mäuse mit den Mutationen Prkg1-C117S, Prkg1-C195S und Prkg1-C117/195S. Zur Untersuchung der *in vivo* oxidativ induzierten Intradisulfidbrücke zwischen C117 und C195 wurde das C117 im Exon 2 oder das C195 im

Die Verwaltung der Mäuse erfolgte durch die Tbase Software. Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Schwanzbiopsien durch Tierpfleger entnommen und nach Kap. 2.2.6.1 getestet. Weibliche und männliche Mäuse wurden im Alter von 12-16 Wochen für Experimente verwendet. Die geltenden tierschutzrechtlichen Vorschriften für die Maushaltung und Organentnahmen wurden befolgt.

2.2.6.1 Genotypisierung

Genotypisierung ist eine molekulargenetische Methode zur Bestimmung der eingeführten genomischen Veränderung bei einem Lebewesen. In dieser Doktorarbeit wurden transgene Mäuse mit Punktmutationen im *Prkg1* Gen analysiert. Hierzu erfolgte die Extraktion der DNA aus der Schwanzbiopsie und die Bestimmung des Genotyps mittels TaqMan Polymerasen Ketten Reaktion (TaqMan PCR).

2.2.6.1.1 DNA Isolation

Für die Isolation der genomischen DNA aus den Schwanzbiopsien wurde der Direct PCT-Tail Puffer (100 µl), der die Proteinkinase K (500µg/ml) enthält, verwendet. Schwanzbiopsien wurden dabei bei 55 °C und 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) [eng. revolution per minute] über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Proben 20 Minuten bei 85 °C hitzeinaktiviert und im Kühlschrank gelagert.

2.2.6.1.2 Durchführung der TaqMan PCR

Die TaqMan PCR ist eine quantitative Methode, die in der Lage ist, in Echtzeit spezifische Amplifikationsprodukte darzustellen, aufgrund der verwendeten fluoreszierenden DNA-Sonden, die mit einem Reporter- am 5'- und einem Quencher-Farbstoff am 3'-Ende ausgestattet sind. Mit dieser Methode ist es möglich zwischen WT (+/+), heterozygoten (d/+) und homozygoten (d/d) Tieren zu unterscheiden. Die Sonden lagern sich komplementär zu einem internen Abschnitt der Ziel-DNA an. Zusätzlich werden zum PCR Ansatz Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tab. 2.1.5) hinzugefügt, die ebenfalls an das 5'- und 3'-Ende der DNA binden und das gewünschte Fragment in Gegenwart der Taq Polymerase amplifizieren. Wenn die Quencher- und Reporter-Farbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander sind, wird die Fluoreszenz des Reporters von dem Quencher aufgenommen. Sobald die TaqMan Polymerase den neuen DNA Strang synthetisiert, baut diese die komplementär angelagerten

TaqMan Sonden ab. Die Degradierung der Sonden führt zur Separierung der Fluorophore und somit zur Reduzierung des Quenching-Signals. Dies führt zur Erhöhung der Intensität des emittierten Lichts vom Reporter-Farbstoff, welches detektiert werden kann (Kalinina et al. 1997). Die Sonden (Tab. 2.1.7) wurden mit dem Reporterfluoreszenzfarbstoff Cyanine 3 Phosphoramidite (Cy3) und mit einem Fluoreszenzquencher Black Hole Quencher 1 (BHQ1) markiert. Die Entwicklung der Sonden erfolgte durch Dr. Boris Skryabin. Diese wurden bei der Firma Eurofins Genomics bestellt.

Für die TaqMan PCR Reaktion wurde das Light Cycler 480 Master Kit von der Firma Roche nach Gebrauchsanleitung des Herstellers verwendet. Die Proben wurden in Duplikaten vermessen. Als Referenz diente eine WT-, eine heterozygote DNA- und eine Blindprobe mit ddH₂O. Die Zusammensetzung des TaqMan Assays ist in der Tab. 2.20 A und B dargestellt.

Tab. 2.21 Ansätzen von TaqMan Master Mix. A. TaqMan PCR Assay mit Vorwärts- (D1) und Rückwärts- (R1) Primern und der spezifischen Probe WT und Mutante mit dem dazugehörigen PCR-Programm (**B**).

A. Herstellung des Mastermixes für die TaqMan PCR.

Zusammensetzung pro Well	Stock	Menge
5x LightCycler® 480 Probes Master Mix		4 µl
Primer D1 WT/Mutante	10 pmol/µl	0,2 µl
Primer R1 WT/Mutante	10 pmol/µl	0,2 µl
Probe WT/Mutante		0,2 µl
Genomische DNA	100 ng	1 µl
RNase freies Wasser		14,4 µl

B. TaqMan PCR Programm. Die TaqMan PCR wurde im Gerät QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System durchgeführt. Das verwendete PCR Programm ist in der Tab. 2.20 aufgeführt. Die Annealing Temperatur für Prkg1-C195 (Exon 4) Reaktion betrug 57 °C und 60 °C für Prkg1-C117 (Exon 2). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Datenanalyse Software QuantStudio 5 qPCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Vorheizen	95	12'
Denaturierung	95	0'15"
Annealing	57/60	0'30"
Anzahl an Zyklen	50	
Finale Amplifikation	40	10'

2.2.6.2 Isolation von Organen

Zur Isolation der Organe wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter zwischen 12 und 14 Wochen mit dem genomischen Hintergrund C57BL/6J verwendet. Mit Hilfe der Organentnahme konnten die Expression der PKG1 α in C117S und C195S KI-Mäusen und deren WT Geschwistertieren nachgewiesen und untereinander verglichen werden. Hierzu wurden Mäuse in einem geschlossenen Gefäß platziert, mit einem CO₂/O₂ Gemisch anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Der Bauch- und Brustraum wurden in Rückenlage geöffnet und die Organe Aorta, Herz, ein kleiner Abschnitt des Dünndarms, Milz, Lunge, Leber und Niere entnommen. Die Organe wurden in kaltem DPBS gewaschen, wenn notwendig, vom Fett und nicht benötigtem Gewebe befreit.

Auch die Tibia wurde aus der Maus herauspräpariert und ihre Länge mit einem Messschieber vermessen. Das Herz wurde auf einer Feinwaage gewogen und das Gewicht sowie die Länge der Tibia notiert. Im Anschluss wurden die Organe in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Herstellung der 10%igen (w/v) Organ-Homogenate wurden die Organe im gefrorenen Zustand in einem gekühlten Metallmörser und Pistill pulverisiert. Anschließend wurde das gefrorene Pulver gewogen und mit der benötigten Menge an Lysispuffer (Radio-Immuno-Präzipitationsassay [RIPA] Puffer, Tab. 2.21) vermengt. Somit wurden für 10 mg Pulver 100 μ l Puffer benötigt.

Tab. 2.22: Herstellung von RIPA-Puffer.

Zusammensetzung	Stock	Menge
Tris pH 7,5	1 M	20 mM
Triton X-100	100%	1%
NaCl	1 M	150 mM
EDTA pH 8.0	0,5 M	1 mM
SDS	20% (v/v)	0,1% (v/v)
NaDOC	10% (w/v)	1%
cOmplete™ Mini		1 Tablette
Proteasehemmer-Cocktail		

Zu den Proben wurden jeweils 1-2 Metallkugeln (\varnothing 2 mm) hinzugefügt und kurz auf dem Schüttler gemischt. Danach wurden die Proben auf dem Bioruptor® Plus Sonication Gerät bei 25 Herz (Hz) zwei Mal für 30 Sekunden homogenisiert. Aus den Homogenaten wurden 80 μ l entnommen, in ein neues Reagenzgefäß überführt und mit reduzierendem 3x Laemmli Probenpuffer (Tab. 2.1) versetzt. Für eine reduzierte Viskosität der Proben und somit für einen besseren Lauf der Proben durch das Acrylamid-Gel wurden diese durch eine Sterican Einmal-Injektionskanüle (Größe 17, \varnothing 0,55 x 25 mm) gezogen und mehrmals trituriert. Die Proben wurden im Anschluss auf ein 7,5% Acrylamid-Gel aufgetragen und eine Western Blot Analyse (Kap. 2.2.5) durchgeführt.

2.2.6.3 Isolation von VSMCs aus der Aorta

Jeweils 3 Aortenabschnitte von ca. 10 mm Länge wurden aus den WT- und KI-Mäusen nach Kap. 2.2.6.2 isoliert. Die Aorten wurden nach der Reinigung im kalten DPBS Puffer gewaschen und in die Enzymlösung 1 (Tab. 2.22) für 45 Minuten bei 37 °C überführt. Danach wurden die Aorten in der Enzymlösung 2 (Tab. 2.22) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Alle 5 Minuten wurde die Lösung mit einer 1000 μ l Pipette resuspendiert, um das Aortengewebe zu zerkleinern.

Tab. 2.23: Basislösung für Ca²⁺-freies Medium zum Ansetzen der Enzymlösung 1 und 2. Der pH-Wert wurde nach dem Ansetzen auf 7,4 eingestellt. Jeweils 500 µL Aliquote wurden hergestellt und bei -20 °C eingefroren.

Zusammensetzung	Menge	Enzymlösung 1	Enzymlösung 2
Mononatriumglutamat	85 mM	0,7 mg/ml Papain	0,7 mg/ml Hyaluronidase
NaCl	60 mM	1 mg/ml BSA	1 mg/ml Collagenase
HEPES	10 mM	1 mg/ml DTT	1 mg/ml BSA
KCl	5,6 mM		
MgCl ₂	1 mM		

Die Zellsuspension wurde im Anschluss in 15 ml Greiner-Röhrchen, in dem 10 ml Zellkulturmedium vorgelegt worden war, überführt. Zur Sedimentierung des Zelldebris wurde die Zellsuspension 3 Minuten stehen gelassen. Danach wurden 9 ml des Überstands in ein neues Greiner-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 850 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und in 12 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden im Anschluss mit jeweils 2 ml pro Well auf eine 6-Well Platte (mit Deckgläschen für Immunfluoreszenz) ausplattiert. Bis zu 14 Tagen wurden die Zellen in Zellkultur unter sterilen Bedingungen und unter täglicher mikroskopischer Beurteilung (Kap. 2.2.2) gehalten, bis diese ca. 80-90% der Konfluenz erreicht hatten. Das weitere Vorgehen zur Untersuchung der PKG1α Aktivität mittels endogener VASP Phosphorylierung ist im Kapitel 2.2.4.3 beschrieben.

2.2.6.4 Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie

Um zu bestätigen, dass VSMCs erfolgreich isoliert und kultiviert werden konnten, wurden die Zellen mit verschiedenen spezifischen Markern für VSMCs angefärbt. Die Zellen wurden hierzu mit DPBS gewaschen und mit einer -20 °C kalten Methanol:Aceton Lösung (1:1) fixiert. Nach der Inkubationszeit von 20 Minuten bei -20 °C wurde die Lösung entfernt und mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden im nächsten Schritt mit 2 ml pro Well einer 0,2% Triton X-100 Lösung, angesetzt in DPBS für 5 Minuten permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 Minuten in DPBS gewaschen. Die Ränder des Deckgläschens wurden vorsichtig mit einem Tupfer getrocknet und mit einem Wachsstift versiegelt. Zur Blockierung der unspezifisch bindenden Proteine wurde pro Well mit 100 µl des 5% (v/v) unspezifischen Ziegenerums im 1% BSA-Immunfluoreszenzpuffer (Tab. 2.23) für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen

wurden im Anschluss mit 100 µl des primären Antikörpers (Kap. 2.1.9), verdünnt im 1% (w/v) BSA-Immunfluoreszenzpuffer auf einem Schüttler in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells drei Mal für 5 Minuten mit DPBS gewaschen und danach mit 100 µl des sekundären Antikörpers als auch mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, beides angesetzt im 1% BSA-Immunfluoreszenzpuffer für drei Stunden auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Es erfolgte erneutes dreifaches Waschen mit DPBS für 5 Minuten. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Zellen unter dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 800 in einer Attofluor™ Zellkammer bei einer 63x Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv. Die Auswertung der Bilder wurde mit der Zeiss Zen Mikroskopie Software durchgeführt.

Tab. 2.24: Herstellung von 1% BSA-Immunfluoreszenzpuffer.

Zusammensetzung	Menge
Tris pH 7.5	10 mM
NaCl	155 mM
EGTA	2 mM
MgCl ₂	2 mM
BSA (w/v)	1%

2.2.6.5 *Ex vivo* Messung der Vasorelaxation in *Arteria femoralis* mittels Drahtmyographen

In Kollaboration mit Prof. Cor de Wit und Dr. Kjestine Schmidt am Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck wurden physiologische Effekte der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke auf die Vasorelaxation in intakten Gefäßen untersucht. Dazu wurden Abschnitte frisch isolierter Femoralarterien der Mäuse Prkg1-C117S, Prkg1-C195S und deren WT Geschwistertiere im Organbad myographisch analysiert (Abb. 2.7 A. und B.). Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Gabe einer Überdosis Pentobarbital getötet. Es erfolgte eine beidseitige Resektion der Arterie aus dem Oberschenkel der Maus über eine Länge von ca. 5 mm. Im Drahtmyographen wurden insgesamt 69 isolierte Abschnitte (1,3 bis 1,9 mm lang) der *Arteria femoralis* mit einem mittleren Durchmesser von 200 µm aus vier verschiedenen Mausgruppen untersucht. Hierzu wurde die Arterie auf einem 40 µm dicken Draht aufgespannt und mit dem Myographen verbunden. Die Arterie wurde dabei in 1x physiologischer Kochsalzlösung (engl.

physiological saline solution [PSS]) bei 37 °C gehalten und mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast (Tab. 2.24).

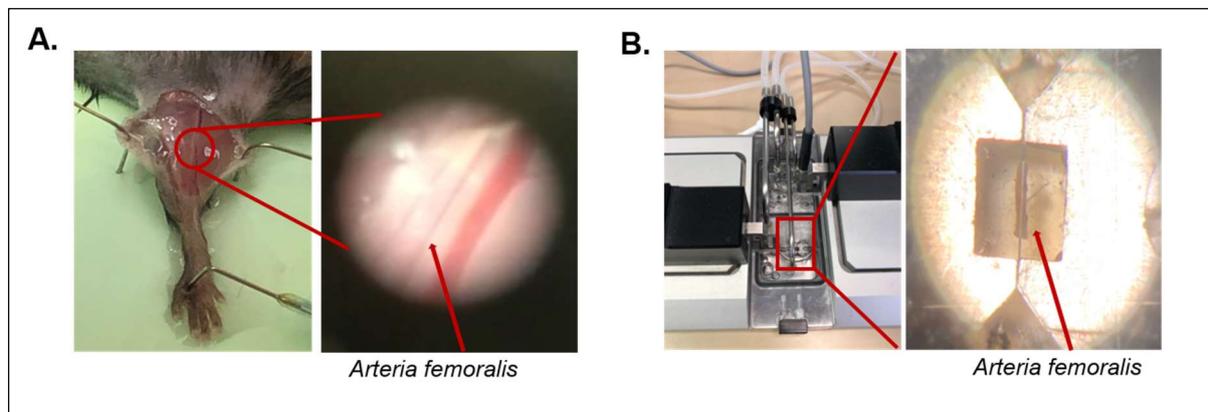


Abb. 2.7: Isolation und Aufspannung der *Arteria femoralis*. **A.** Präparation des Gefäßes aus dem Oberschenkel der Maus unter einem Stereomikroskop. **B.** *Arteria femoralis*, verbunden durch einen Draht mit dem Myographen.

Zu Beginn eines jeden Versuchs wurden die Gefäße automatisch durch den Myographen normalisiert. Dabei sollte ein Zielwert des transmuralen Druckes von 13,3 Kilopascal (kPa) erreicht werden. Die Vasorelaxationen wurden durch die Gabe von Acetylcholin (0,3 und 3 μ M), dem NO-Donor SNAP (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3 μ M) und dem HNO-Donor CXL-1020 (0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 μ M) nach Vorkontraktion mit 3 μ M Noradrenalin induziert (Boettcher und de Wit 2011). Die Konzentrationen einer jeden Substanz wurden additiv ins Organbad pipettiert. Zwischen den einzelnen Substanzen erfolgten mehrere Waschschrte mit 1x PSS. Eine Relaxation auf Acetylcholin spricht für ein intaktes Endothel und das erfolgreiche Aufziehen des Gefäßes auf den Draht im Myographen. Im zweiten Teil des Experimentes wurde das Gefäß mit 30 μ M ODQ für 45 Minuten vorinkubiert, um die sGC des NO-Signalweges zu inhibieren. Daraufhin erfolgte eine wiederholte Gabe von ACh, SNAP und CXL-1020 in permanenter Anwesenheit von ODQ.

Jede Gefäßantwort auf ein Vasorelaxans wurde 2-5 Minuten lang gemessen und mit Hilfe einer Software, geschrieben im Labor von Prof. Cor de Wit und aufbauend auf einer kommerziell erhältlichen Software Labview mit 2 Hz aufgezeichnet. Die Werte der letzten 15 Sekunden jeder Behandlung wurden als Mittelwert zusammengefasst und zur vorhergehenden Vasokonstriktion ins Verhältnis gesetzt, so dass alle Beobachtungen als Relaxation in % in der Auswertung angegeben wurden. Aus diesen Messungen konnten nun Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. Für jede Konzentration wurde eine Relaxationsamplitude berechnet und als % von der Noradrenalin-Maximalantwort dargestellt.

Tab. 2.25: Herstellung einer 25x PSS-Lösung und Verdünnung auf 1x PSS. Lösung 1 (400 ml), Lösung 2 und 3 jeweils 35 ml werden nach der Herstellung zusammengemischt, auf ein Endvolumen von 500 ml mit ddH₂O aufgefüllt und steril filtriert. Zu Beginn eines Versuches erfolgt die Herstellung einer 1x PSS Lösung. Dabei werden 20 ml 25x PSS-Lösung mit 500 ml ddH₂O verdünnt, wobei noch zusätzlich NaHCO₃ (Endkonzentration (25 mM) und Glucose (Endkonzentration (5,5 mM) zugefügt werden.

Zusammensetzung	Menge	Zusammensetzung	Menge	Zusammensetzung	Menge
Lösung (1)	(mM)	Lösung (2)	(mM)	Lösung (3)	(mM)
NaCl	118,99	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,17	EDTA	0,03
KCl	4,69	KH ₂ PO ₄	1,18		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5				

2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit GraphPad Prism 8.0 durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Verfahrens getestet. Beim Vergleich von nur 2 Gruppen der normalverteilten Daten wurde ein ungepaarter „two-tailed“ t-Test benutzt. Bei mehreren Gruppen wurde One-way ANOVA, gefolgt von „Sidak's multiple comparison Test“ angewendet. Bei p-Werten <0,05 wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet. Alle Daten sind stets als Mittelwerte ± Standardfehler (SD) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Validierung von Redox-defizienten FRET-Sensoren

3.1.1 Generierung von C117S, C195S und C117/195S FRET-Sensoren

PKG1 α wird durch HNO Exposition posttranslational modifiziert. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Intradisulfidbrücke zwischen den Cysteinen 117 und 195 in der hochaffinen cGMP-Bindungsdomäne von PKG1 α (Donzelli et al. 2017). Damit kann zusätzlich oder unter Umgehung des klassischen Aktivierungswegs, der über die sGC-Aktivierung und die Produktion von cGMP erfolgt, die Kinase alternativ in ihrer Aktivität moduliert werden. Die Beobachtung der oxidativ-induzierten Intradisulfidbrücke wurde erst kürzlich beschrieben und insbesondere der individuelle Beitrag der Cysteine 117 und 195 zur cGMP-unabhängigen Vasorelaxation ist noch nicht ausreichend untersucht und charakterisiert worden. Deshalb wurden Redox-defiziente cGi500 FRET Sensoren zu Beginn des Projektes hergestellt. Dabei wurden die im Sensor enthaltenden Cysteine (C117, C195, C117/195) zu nicht-oxidierbarem Serin (C117S, C195S, C117/195S) mutiert, einzeln und in Kombination. Abb. 3.1 zeigt die Validierung der Plasmide nach erfolgter Plasmidpräparation und dem anschließenden Restriktionsverdau mit EcoRI und ClaI. Die Klone mit dem korrekten Restriktionsbandenmuster von 735 b.p. für den mutierten Abschnitt und 6274 b.p. für den cGi500 Vektor wurden ausgewählt und durch Sequenzierung die korrekte Sequenz bestätigt.

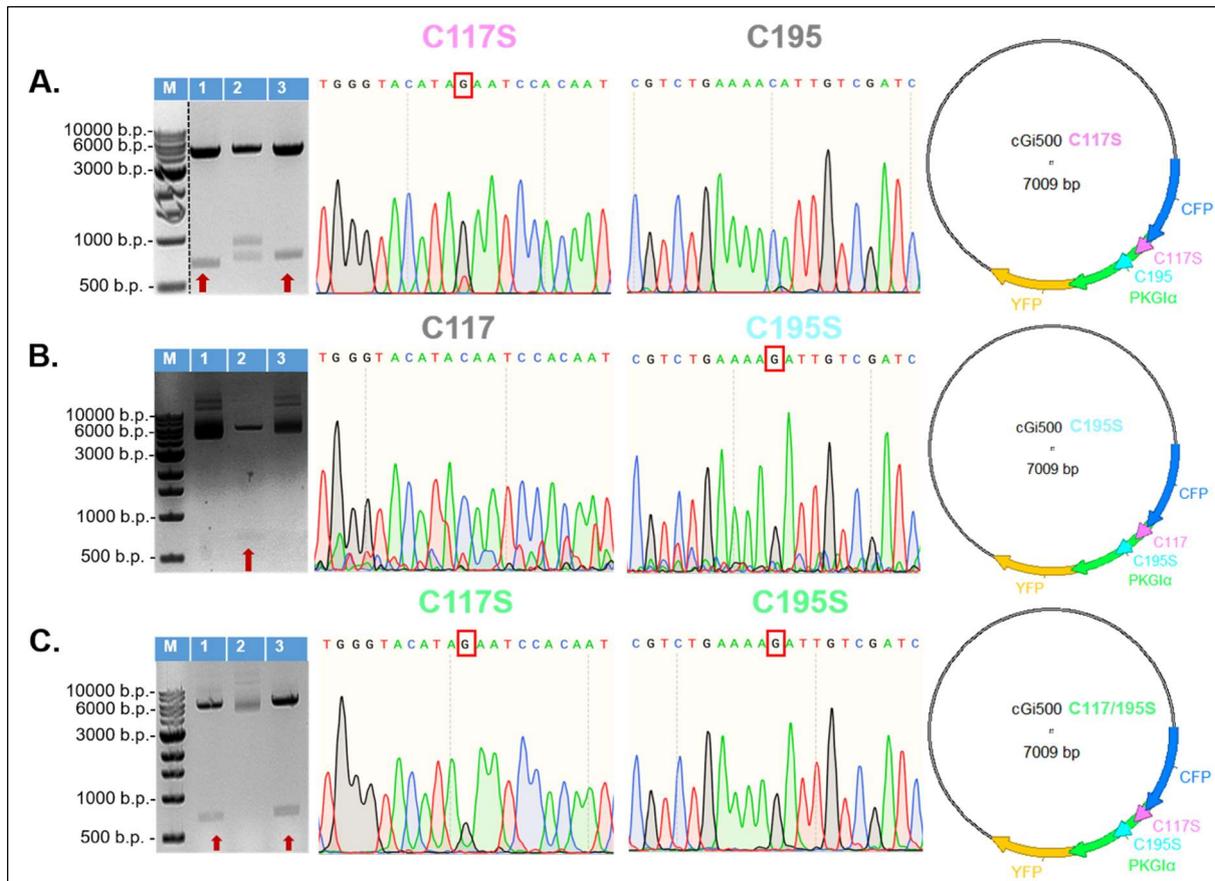


Abb. 3.1: Validierung der cGi500-Sensorplasmide mit den einzelnen Mutationen und der Doppelmutation (A. C117S, B. C195S, C. C117/195S). Links: Agarosegele nach Restriktionsverdau einzelner Klone mit EcoRI und ClaI, wobei die Klone mit der Nr. 1 und 3 in A. und C. sowie der Klon Nr. 2 in B. (rote Pfeile) das korrekte Restriktionsbandenmuster mit 735 b.p für das entsprechend mutierte PKGla-Fragment und 6274 b.p für den cGi500 Vektor zeigen. Mitte: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Validierung der korrekten Sequenzen. Diese wurden mit einem Rückwärtsprimer durchgeführt und zeigen daher den komplementären DNA Strang. Dabei ist Serin als AGA und Cystein als ACA Tripletts erkennbar. Die Punktmutationen sind rot umrandet. Rechts: Entsprechende Plasmidkarten.

3.1.2 Generierung und Selektion stabiler Zelllinien

Zur Vereinfachung der FRET-basierten Analysen und um die Möglichkeit zu schaffen, automatisierte FRET Messungen zur Untersuchung der HNO-vermittelten Intradisulfidbrückenbildung durchzuführen, wurden stabile Zelllinien generiert. Hierzu wurden das cGi500 WT Plasmid und die rekombinanten Redox-defizienten Mutanten C117S, C195S und C117/195S um eine Neomycin Antibiotika-Resistenz ergänzt. Durch diese Klonierung entstanden nachfolgende Plasmide WT-Neo, C117S-Neo, C195-Neo und C117/195S-Neo. Zur Validierung der Klone wurde nach der Minipräparation ein Restriktionsverdau der Plasmide

mit den Enzymen XhoI und EcoRV durchgeführt und auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.2 A). Die Klone mit dem korrekten Restriktionsbandenmuster von 2223 b.p. für den cGi500 Sensor und 6400 b.p. für den Vektor pCAG-neo-redDE5 wurden ausgewählt und die korrekte Sequenz durch Sanger-Sequenzierung bestätigt.

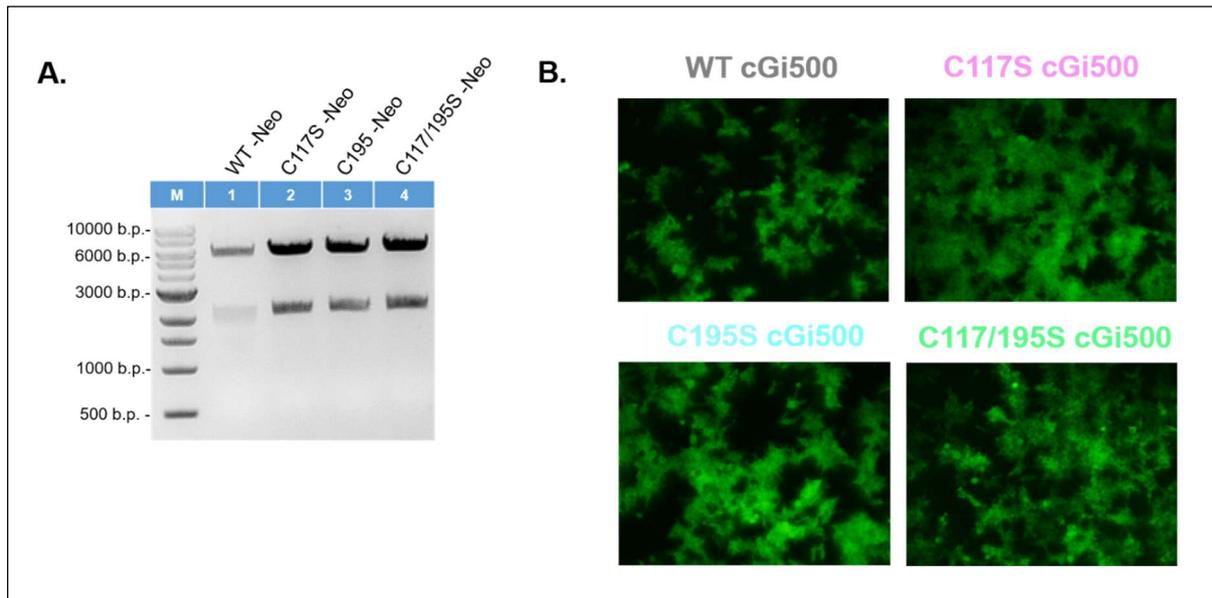


Abb. 3.2: Validierung der neu hergestellten Plasmide nach Einbau einer Neomycin Antibiotika-Resistenz Kasette in cGi500 WT und in die einzelnen Mutanten (WT-Neo, C117S-Neo, C195S-Neo, C117/195S-Neo). **A.** Alle vier Klone, geschnitten mit XhoI und EcoRV, zeigen das korrekte Restriktionsbandenmuster von 2223 b.p. für cGi500-Insert und 6400 b.p. für den pCAG-neo Vektor. **B.** Die Fluoreszenz der einzelnen Klone wurde unter einem Mikroskop untersucht und miteinander verglichen. Die Klone der 4 stabilen Zelllinien mit ähnlicher Fluoreszenzintensität wurden ausgewählt und für weitere Analysen verwendet.

Die „Neo“ Plasmide wurden im Anschluss in HEK293-Zellen transfiziert und auf einer 10 cm-Schale ausplattiert. Durch die Zugabe des Antibiotikums Geneticin wurden nicht transfizierte HEK293 Zellen eliminiert. Die positiven Klone, die eine Neomycin Antibiotika-Resistenz enthielten, überlebten den Selektionsprozess und wurden bezüglich ihrer vergleichbaren Fluoreszenzintensität untersucht (Abb. 3.2 B.). Die erfolgreiche Selektion ergab vier neue Zelllinien, die die Konstrukte cGi500-WT-Neo, cGi500-C117S-Neo, cGi500-C195S-Neo und cGi500-C177/195S-Neo stabil exprimierten. Zur vereinfachten Schreibweise wurde das Wort „Neo“ für die Beschreibung der neuen vier Ziellinien nachfolgend nicht mehr verwendet.

3.2 Analyse der cGi500 WT und Mutanten FRET-Sensoren nach NO- und HNO-Stimulation

Zur Untersuchung der NO- und HNO-vermittelten Konformationsänderung der cGi500 WT und Mutanten Sensoren wurde ein FRET basierter Assay durchgeführt. Die Stimulation mit einem NO-Donor führt zur sGC-abhängigen cGMP Bildung und zur cGMP-Bindung an die cGMP Bindestellen A und B des cGi500 FRET-Sensors, welche zwischen den beiden Fluorophoren CFP und YFP lokalisiert sind. Frühere Publikationen (Zhu et al. 2015, Donzelli et al. 2017) konnten zeigen, dass die HNO-Behandlung von HEK293 Zellen oder VSMCs zu einer Aktivierung von PKG α führt. Deshalb wurde beim Design des FRET-Assays vorausgesetzt, dass es nach einer HNO-Exposition ebenfalls zur Aktivierung des Sensors durch die oxidative Bildung der Intradisulfidbrücke zwischen C117 und C195 kommt, die sich in der hochaffinen cGMP Bindestelle A befinden. Durch die Herstellung der Redox-defizienten FRET-Sensoren sollte es folglich möglich sein, den individuellen Beitrag dieser Cysteine bei der Bildung der Intradisulfidbrücke zu untersuchen.

Die NO- und HNO-Donoren induzierten eine Konformationsänderung des WT FRET-Sensors. Dies führte zur Entfernung der beiden Fluorophore voneinander. Die daraus resultierende Zunahme der CFP/YFP Ratio ist proportional der intrazellulären cGMP Konzentration (Thunemann et al. 2013b) bzw. der oxidativen Stimulation. Durch das Hochdurchsatzplattengerät FlexStation3[®] konnte die Konformationsänderung in Echtzeit verfolgt werden.

3.2.1 cGMP-Affinitätsbestimmungen von WT- und Mutanten FRET-Sensoren

Für die cGMP-Affinitätsbestimmungen von WT sowie C117S, C195S und C117/195S cGi500 FRET-Sensoren wurden die stabil exprimierenden HEK293 Zellen der jeweiligen Linien auf einer 96-well Platte ausplattiert und nach 24 Stunden Inkubationszeit in steigenden Konzentrationen mit dem NO-Donor SNP stimuliert (Abb. 3.3 A.). Die Änderung der FRET Ratio in den Zellen wurde dabei mit dem Hochdurchsatzplattengerät verfolgt. Alle Sensoren zeigten vergleichbare SNP-Effekte mit nicht signifikant unterschiedlichen EC₅₀ Werten (WT: 20,1 \pm 3,9 μ M; C117S: 20,3 \pm 2,9 μ M; C195S: 16,1 \pm 7,3 μ M und C117/195S: 15,9 \pm 1,2 μ M).

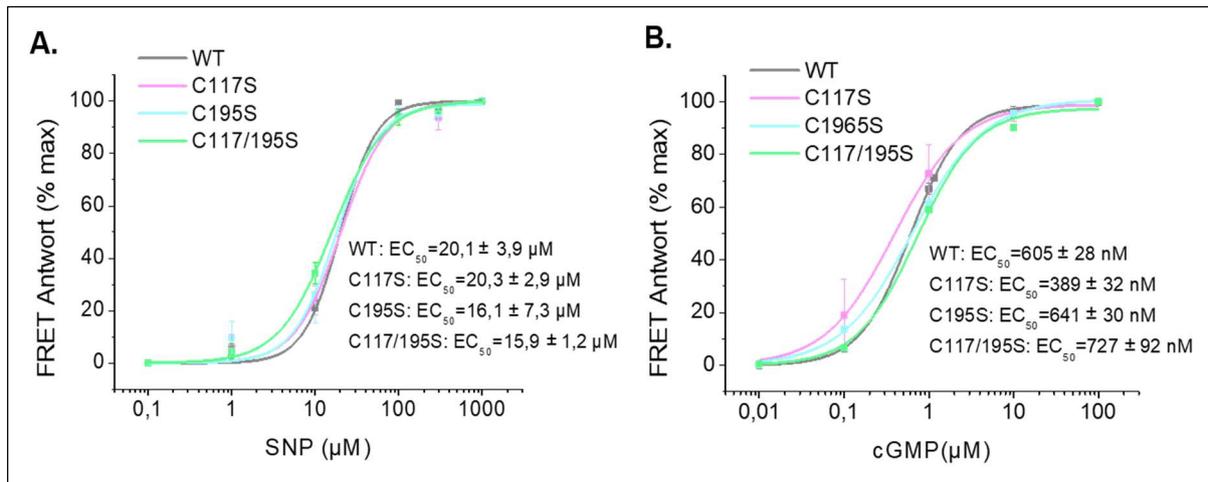


Abb. 3.3: cGMP Affinitätsbestimmungen mit dem FlexStation³ Hochdurchsatzplattengerät.
A. Stimulation der Zellen mit SNP (0,1; 1; 10; 100 und 300 μM) und daraus resultierende Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für WT und Mutanten mit vergleichbaren EC_{50} Werten. **B.** *In vitro* Messungen in Zelllysaten unter Zugabe von ansteigenden cGMP Konzentrationen (0,01; 0,1; 1; 10; 100 μM) zeigen nahe zu deckungsgleiche Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für alle Sensor-Konstrukte. Die FRET-Signalamplitude für die jeweiligen Konzentrationen wurde auf die maximale Amplitude bei der höchsten cGMP Konzentration normalisiert und als „% max“ dargestellt. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. $n=5-8$ Messungen pro Konzentration und Substanz. Getestet wurde mit One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test.

Für die Messung der cGMP-Effekte *in vitro* in Zelllysaten wurden stabil exprimierende Zellen auf einer 10 cm Schale ausplattiert und bis zur Erreichung der Konfluenz kultiviert. Im Anschluss wurden Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden ebenfalls auf einer 96-well Platte ausplattiert und unter Zugabe ansteigender cGMP Konzentrationen die FRET Ratio ermittelt (Abb. 3.3 B.). Dabei waren die EC_{50} Werte von $605 \pm 28 \text{ nM}$ für WT, $389 \pm 32 \mu\text{M}$ für C117S, $642 \pm 30 \mu\text{M}$ für C195S und $727 \pm 92 \mu\text{M}$ für C117/195S für alle 4 Sensoren vergleichbar.

Der cGi500 Sensor trägt diesen Namen aufgrund seines EC_{50} -Wertes für cGMP von 500 nM (Russwurm et al. 2007). Durch cGMP Affinitätsbestimmungen konnte bestätigt werden, dass alle Sensoren vergleichbare Affinitäten für cGMP aufwiesen. Weiterhin konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass die Einführung der Mutationen keinen Effekt auf die Bindungsaffinität von cGMP hat. Daher können die Signale von allen Sensoren hinsichtlich der Amplitude und der Kinetik direkt miteinander verglichen werden.

3.2.2 Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen in HNO-stimulierten cGi500 WT und Mutanten FRET-Sensoren

Da eine optimale Funktionsfähigkeit der Sensoren nachgewiesen wurde, konnten im nächsten Schritt Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die HNO-Donoren NCA bzw. CXL-1020 ermittelt werden. Hierzu wurden Zellen der 4 stabilen Linien auf einer 96-Wellplatte mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Donoren versetzt und vermessen. Dabei konnten vergleichbare EC_{50} Werte ohne signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien gemessen werden. Sie betragen für NCA: WT: $9,1 \pm 1,5 \mu\text{M}$; C117S: $4,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$; C195S: $15,3 \pm 7,3 \mu\text{M}$ und C117/195S: $4,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$; und für CXL-1020: WT: $73,0 \pm 13,7 \mu\text{M}$; C117S: $28,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$; C195S: $61,1 \pm 9,0 \mu\text{M}$ und C117/195S: $21,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$.

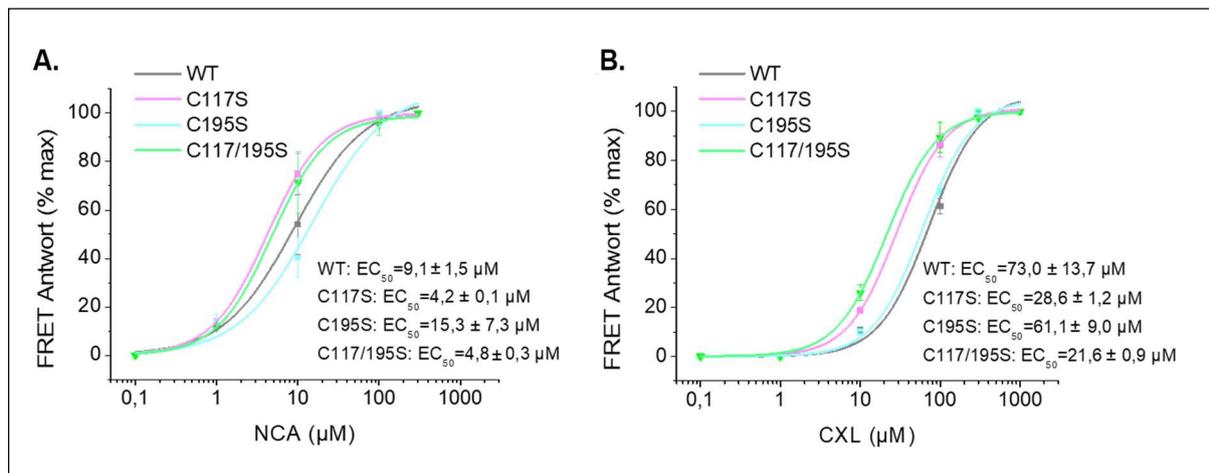


Abb. 3.4: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für WT und cGi500 Mutanten. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von NCA (0,1; 1; 10; 100; 1000 μM) (**A.**) und CXL (0,1; 1; 10; 100; 300; 1000 μM) (**B.**) stimuliert. Die Effekte wurden auf die maximale Antwort normalisiert. Die 4 Sensorkonstrukte weisen vergleichbare EC_{50} -Werte nach der Stimulation mit HNO-Donor-Substanzen auf. $n=6$ Messungen pro Konzentration und Substanz. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Getestet wurde mit One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test.

Aus den Ergebnissen konnten saturierende Konzentrationen von 100 μM für NCA und 300 μM für CXL-1020 ermittelt werden, die für weitere Experimente verwendet wurden. Diese Konzentrationen stimmen mit den bereits veröffentlichten Daten von Donzelli et al. (Donzelli et al. 2017) und Diering et al. (Diering et al. 2020) überein.

3.2.3 Analyse der HNO-induzierten Konformationsänderung in WT- und Mutanten FRET-Sensoren

Die Abb. 3.5 A. und 3.5 B. zeigen repräsentative FRET-Spuren einzelner Experimente, nach Stimulation der Sensoren mit saturierenden Konzentrationen von 100 μM NCA und 300 μM CXL. In der Abb. 3.5 C. und 3.5 D. ist die Auswertung mehrerer Experimente zu sehen. Es konnten bei allen Bedingungen robuste FRET-Änderungen von 30-45% festgestellt werden, jedoch ohne statistische Signifikanz für beide HNO Donoren zwischen den 4 Sensor-Linien.

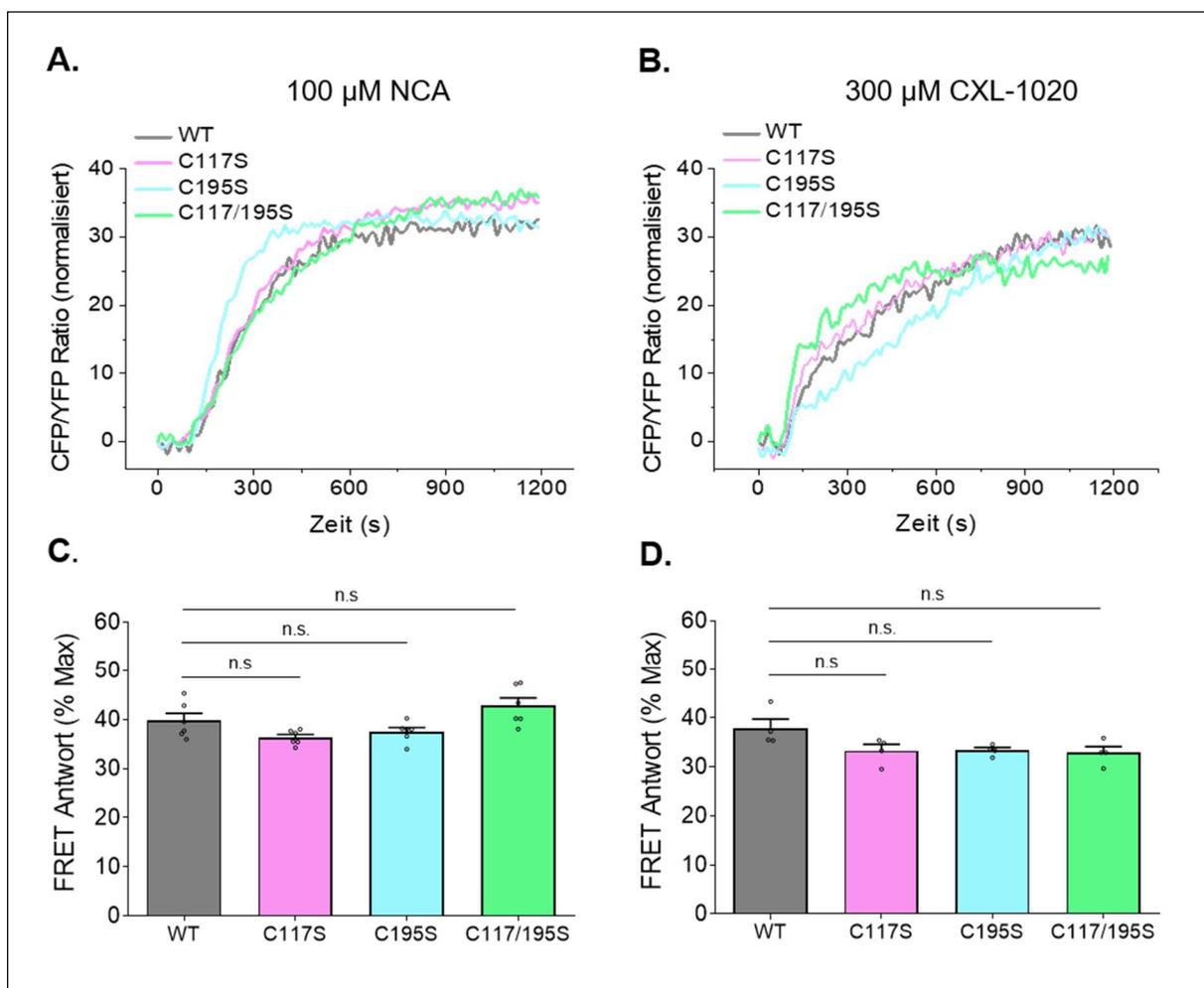


Abb. 3.5: Konformationsänderungen der Sensoren nach HNO-Donor Exposition. Stimulation der stabil transfizierten HEK293 Zelllinien WT und Mutanten C117S, C1195S und C117/195S durch 100 μM NCA (A.,C.) und 300 μM CXL-1020 (B.,D.). A und B zeigen repräsentative Aufzeichnungen der einzelnen Experimente innerhalb von 1200 Sekunden, wobei nach 100 Sekunden die Zugabe von NCA oder CXL-1020 erfolgte. Die Balkendiagramme C. und D. zeigen die Auswertungen von mehreren Experimenten (n=4-6) und Ergebnisse der statistischen Testung (One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test). n.s.-nicht signifikant.

Eine mögliche Erklärung könnte die in der Literatur (Sabbah et al. 2013) bereits beschriebene HNO-abhängige Oxidation und dadurch bedingte Aktivierung der sGC sein. Diese führt zur cGMP-Synthese und direkten Sensoraktivierung, vergleichbar in allen 4 Zelllinien.

Deshalb wurden diese Experimente erneut in Gegenwart eines Inhibitors der sGC - ODQ durchgeführt (Abb. 3.6). Dazu wurden die Zellen vor der Stimulation mit den HNO-Donoren für 10 Minuten mit 10 μ M ODQ vorbehandelt. Durch die Inhibierung der sGC konnten nun unterschiedlich stark verminderte Effekte von NCA und CXL im Vergleich zu den Zellen ohne ODQ Vorinkubation beobachtet werden. Während der NCA-Effekt nur in C117S und C117/195S Zellen um ~6-10% FRET Änderung signifikant vermindert wurde (Abb. 3.6 C.), zeigte der CXL-Effekt eine signifikante Reduktion bei allen Mutanten im Gegensatz zum WT Sensor (Abb. 3.6 D.). Dieser war um ~5% bei C117S und ~8% FRET Änderung bei den restlichen Mutanten reduziert. Zusammenfassend konnte nur unter sGC-Hemmung eine direkte Wirkung von HNO auf die Sensoren beobachtet werden. Die HNO-Donoren können somit eine Konformationsänderung, ähnlich zur cGMP-Bindung in intakten Zellen induzieren.

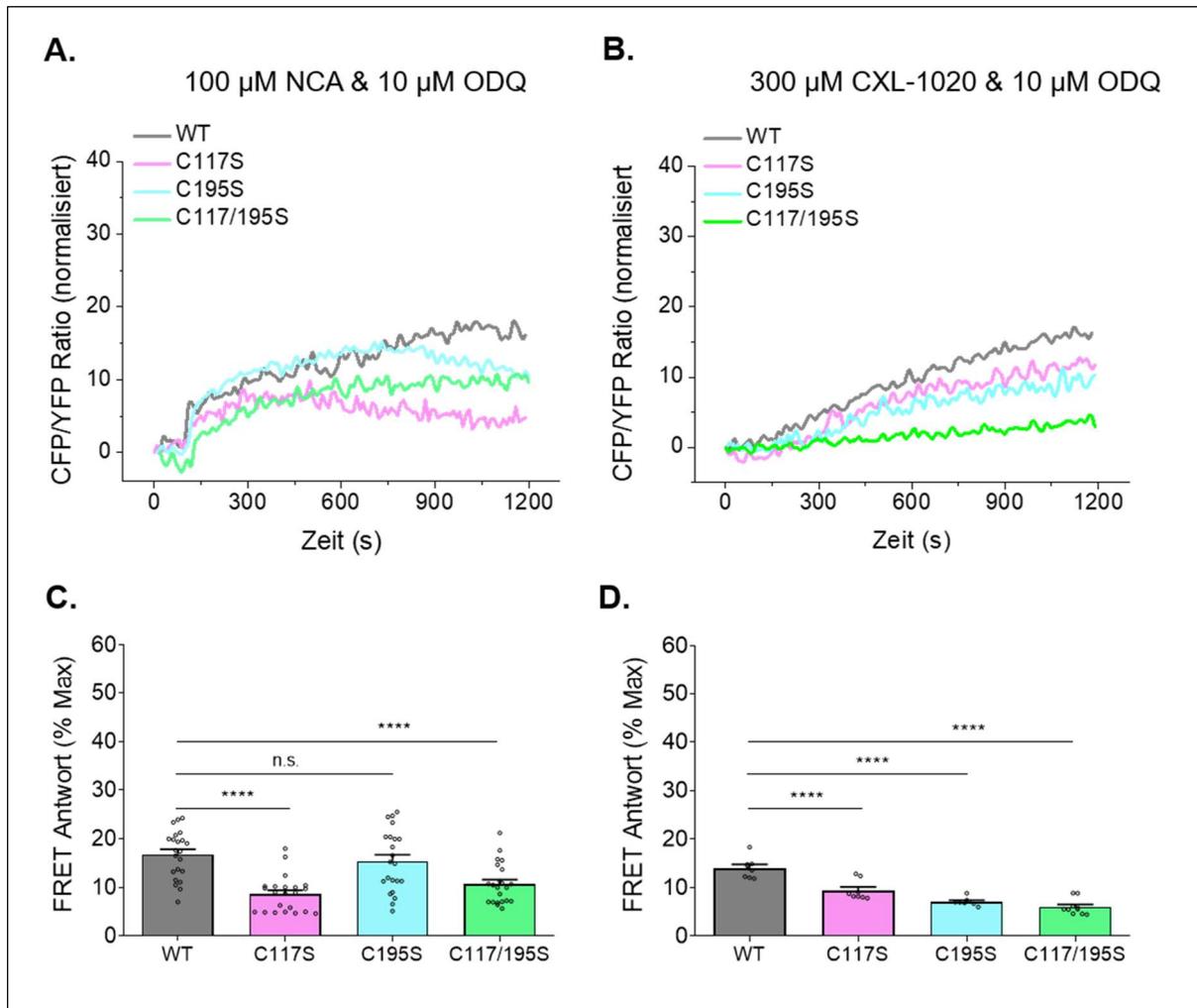


Abb. 3.6: Konformationsänderungen der Sensoren unter HNO-Donor Gabe nach ODQ Vorinkubation. Stimulation der stabil exprimierenden HEK293 Zellen mit den Sensoren cGi500 WT und den Mutanten C117S, C1195S und C117/195S durch 100 μM NCA (**A.**,**C.**) und 300 μM CXL-1020 (**B.**,**D.**) nach ODQ Vorinkubation. **A.** und **B.** zeigen repräsentative FRET-Spuren der einzelnen Experimente innerhalb von 1200 Sekunden, wobei nach 100 Sekunden die Zugabe von NCA oder CXL-1020 erfolgte. Die Balkendiagramme in **C.** und **D.** zeigen die Auswertungen von mehreren Experimenten ($n=8-24$) und Ergebnisse der statistischen Testung (One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test). **** $p < 0.0001$ vs. WT.

3.2.4 Analyse der HNO-induzierten Konformationsänderung in Zelllysaten von WT und Mutanten FRET-Sensoren

Für die FRET-Messungen in Zelllysaten wurden die Zellen zuerst für 10 Minuten mit 100 μM NCA bzw. 300 μM CXL-1020 stimuliert und anschließend aufgeschloßen. Die Lysate wurden direkt auf eine 96-Well Platte aufgetragen und zur Bestimmung der CFP/YFP Ratio vermessen. NCA und CXL-1020 konnten eine signifikante Reduktion des FRET-Signals in

allen FRET-Sensor Mutanten im Vergleich zum WT induzieren (Abb. 3.7). Dies lässt vermuten, dass nur der WT FRET-Sensor eine Intradisulfidbrücke ausbilden kann. Der Nachweis dafür wurde im Kap. 3.2.5 erbracht. Diese Intradisulfidbrücke scheint über einen längeren Zeitraum, zumindest *in vitro* stabil zu sein und bleibt selbst nach dem Aufschließen der Zellen ebenfalls stabil.

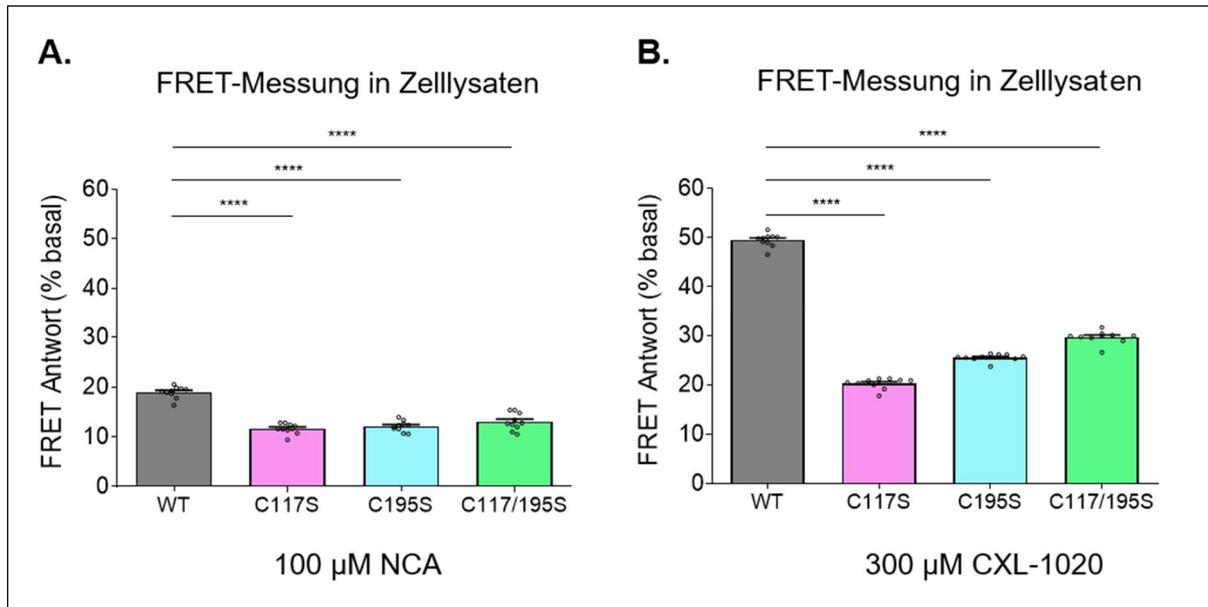


Abb. 3.7: Konformationsänderungen der Sensoren unter HNO-Donor Gabe, gemessen in Zelllysaten. Stabil exprimierende HEK293 Zellen cGi500 WT und Mutanten C117S, C1195S und C117/195S wurden mit 100 µM NCA (A.) und 300 µM CXL-1020 (B.) stimuliert und aufgeschloßen. Die FRET-Änderung wurde dabei in Zelllysaten gemessen. Diese war in allen cGi500 Mutanten signifikant reduziert im Vergleich zum WT FRET-Sensor. Die Balkendiagramme in A. und B. zeigen die Auswertungen von mehreren Experimenten (n=10) und Ergebnisse der statistischen Testung (One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test). **** p<0.0001 vs. WT.

Die Änderung der NCA-vermittelten FRET Antwort war bei WT niedriger im Vergleich zu CXL-1020, ~20 vs. ~50% (Abb. 3.7). Dies lässt sich eventuell mit den unterschiedlichen HNO-Freisetzungskinetiken begründen. Außerdem kommt es nach NCA Exposition in den Zellen zur Bildung reaktiver Nebenprodukte (Sha et al. 2006), welche sich in Zelllysaten anders auf die Messung auswirken können als in Zellen. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass im Fall der Analyse der HNO-induzierten Konformationsänderung in Zelllysaten, sowohl C117 als auch C195 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Intradisulfidbrücke zu spielen scheinen.

3.2.5 Nachweis der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke bei cGi500 WT und mutierten FRET-Sensoren

Zum Nachweis einer Intradisulfidbrücke in den Sensoren wurden die stabilen HEK293 Zelllinien mit 100 μ M NCA, 300 μ M CXL und 0,1% DMSO als Kontrolle mit und ohne ODQ Vorbehandlung stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss mittels Western Immunoblot analysiert und der Sensor wurde dabei mit einem Anti-GFP Antikörper detektiert (Abb. 3.8). Es konnte bestätigt werden, dass die Intradisulfidbrücke nach Stimulation mit HNO-Donoren mit und ohne ODQ nur im cGi500 WT FRET-Sensor nachweisbar war, in allen Mutanten dagegen nicht.

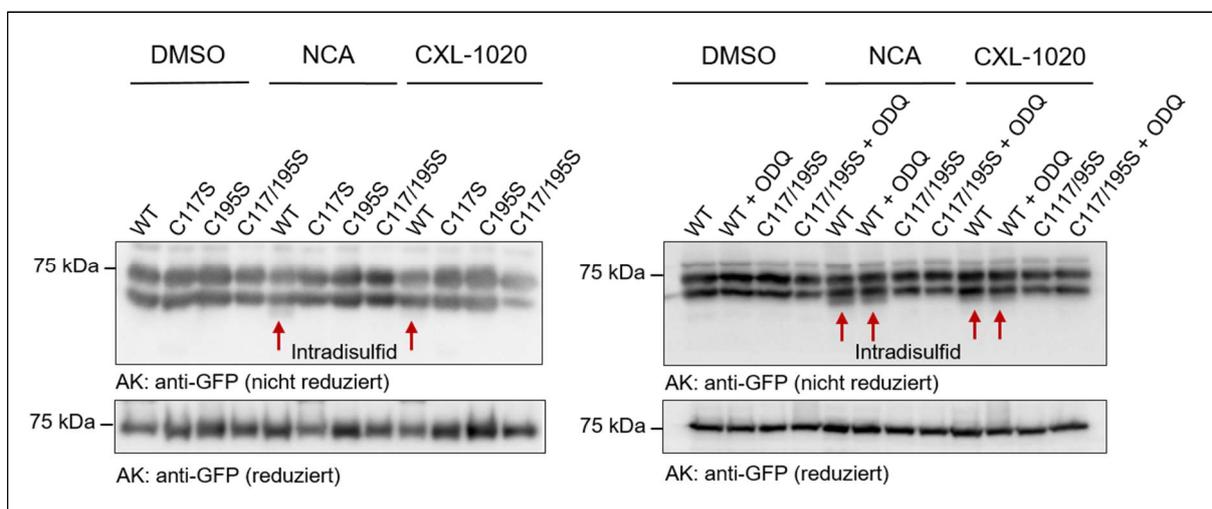


Abb. 3.8: Nachweis einer Intradisulfidbrücke nach HNO-Stimulation mit und ohne ODQ Vorbehandlung in cGi500 WT und Mutanten FRET-Sensoren. Die Ausbildung einer Intradisulfidbrücke (roter Pfeil) unter nativen Blotbedingungen lässt sich nur im cGi500 WT FRET-Sensor mit und ohne ODQ detektieren. Repräsentative Blots (n=3).

3.3 Untersuchung der funktionellen Relevanz der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke

Der *in vitro* Kinase Assay ermöglicht die direkte Untersuchung der Kinaseaktivität unter verschiedenen Bedingungen und ist somit geeignet, um den Effekt der HNO-induzierten Intradisulfidbrückenbildung auf die Kinaseaktivität zu untersuchen. Der Assay wurde in HEK293 Zellen nach Transfektion mit Sequenzen humaner WT, C117S, C195S und C117/195S PKG1 α in voller Länge durchgeführt. Die Abb. 3.9 stellt vier verschiedene Blots

eines Experimentes dar. Der erste Blot zeigt die Phosphorylierung des Substratproteins Myosin Bindeprotein C Fragments C1-M-C2. Dazu wurde der Antikörper Anti-PKA-Phospho-substrat benutzt, der die Konsensus Sequenz RXXpS/T des Substrates erkennt. Diese Sequenz wird von der Familie aller AGC-Kinasen erkannt und phosphoryliert. Im zweiten Blot ist die gesamte Menge des eingesetzten Substrates zu sehen. Das Substrat ist mit einem N-terminalen His-Tag markiert und kann somit durch den Antikörper Anti-His detektiert werden. Der dritte Blot zeigt die Ergebnisse der gesamten PKG α im nicht reduzierten Zustand, wogegen die Proben für den vierten Blot durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert wurden. Beide Blots wurden durch den Anti-PKG Antikörper detektiert.

Die Stimulation mit CXL und NCA HNO-Donoren induzierte eine Inter- und Intradisulfidbrückenbildung in PKG α [Anti-PKG Blot (nicht reduzierend)]. Die Interdisulfidbrücke wurde dabei zwischen Cysteinen 42 zweier Kinase Monomere ausgebildet und konnte anhand der 150 kDa Dimerbande für beide Donoren nachgewiesen werden. Bei ca. 75 kDa liegt die Kinase als Monomer vor. Bei der WT Kinase, im Gegensatz zur mutierten Kinase, konnte eine Intradisulfidbrückenbildung ebenfalls nach NCA und CXL Behandlung als eine zusätzliche Bande mit höherer Mobilität bei ca. 73 kDa detektiert werden. Parallel dazu konnte die Aktivierung der WT Kinase durch eine signifikant erhöhte Substratphosphorylierung nachgewiesen werden (dunkelgraue Balken im Balkendiagramm). Dagegen war die PKG α -Substratphosphorylierung in allen Mutanten C117S, C195S und C117/195S signifikant reduziert. Damit konnte durch den *in vitro* Kinase Assay nachgewiesen werden, dass sowohl C117 als auch C195 entscheidend sind für die Bildung der Intradisulfidbrücke und damit verbundenen oxidativen Aktivierung der Kinase.

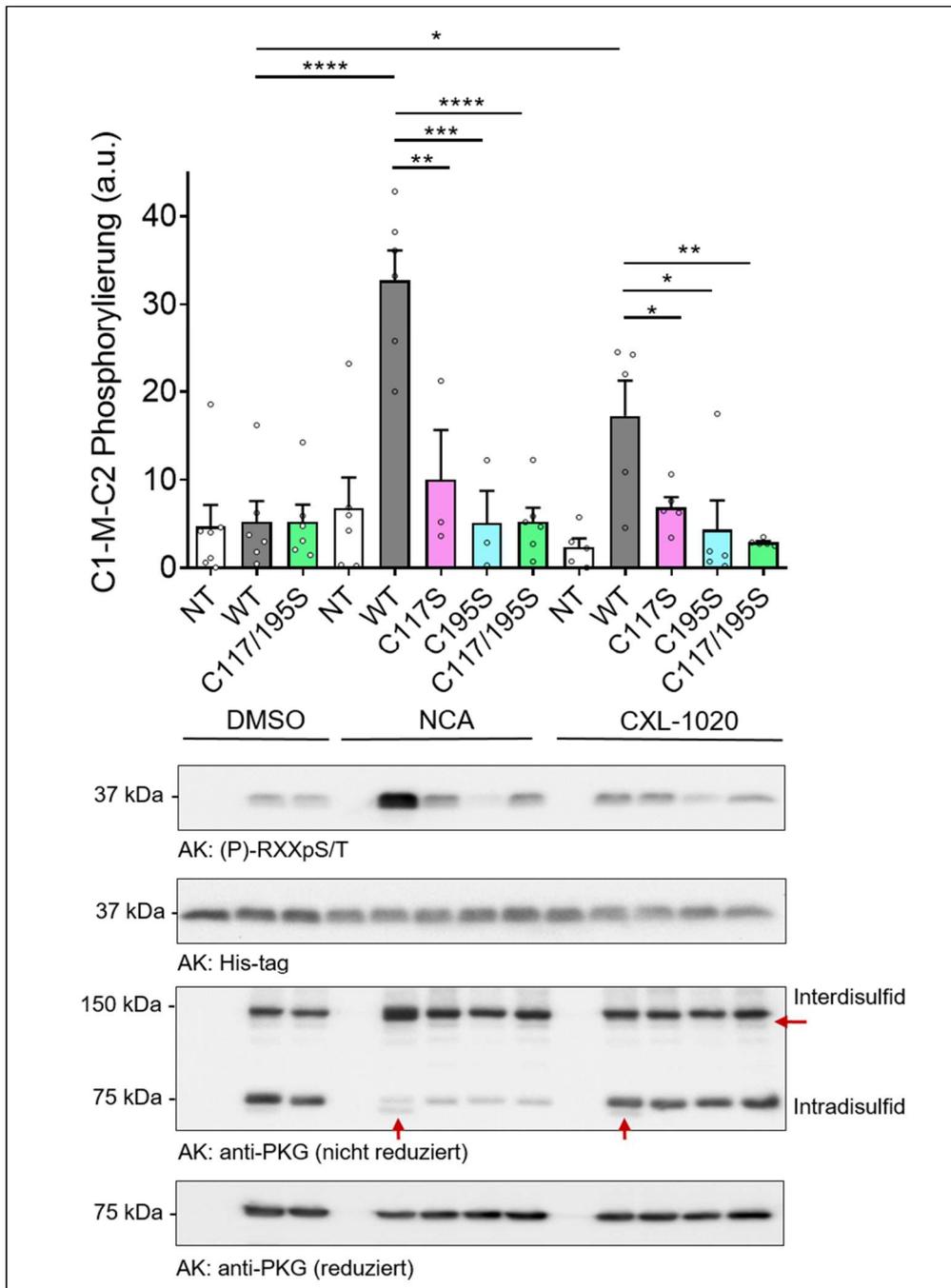


Abb. 3.9: *In vitro* Kinase Assays. Die Experimente wurden durchgeführt mit WT, C117S, C195S und C117/195S PKG α , rekombinant exprimiert in HEK293 Zellen und stimuliert mit NCA (100 μ M, 30 Min), CXL (300 μ M, 20 Min) bzw. DMSO als Kontrolle. Die Intensität der Phosphorylierung des Substrates C1-M-C2 wurde dabei mittels Western Immunoblot und einem phosphospezifischen Antikörper (AK) detektiert und auf die Gesamtmenge des Substrates und die Gesamtmenge der Kinase normalisiert. Normalisierte Werte von mindestens drei Experimenten spiegeln die Kinaseaktivität und die unterschiedlich starke Phosphorylierung des Substrates durch WT und mutierte PKG α wieder und sind auf dem Graphen als arbitrary units (a.u.) aufgetragen. Die Statistik wurde mittels One-way ANOVA durchgeführt, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.4 Validierung HNO-vermittelter Effekte in KI-Mausmodellen

Zur Untersuchung der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke und des individuellen Beitrags der Cysteine 117 und 195 *in* und *ex vivo* wurden von Dr. Borys Skryabin mittels CRISPR/Cas9 Technologie drei neue KI-Mausmodelle generiert. Bei diesen Mäusen wurde C117, C195 oder beide Cysteine gleichzeitig zum nicht-oxidierbaren Serin (Prkg1-C117S, Prkg1-C195S, Prkg1-C117/195S) ausgetauscht. Für die jeweiligen Experimente wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter zwischen 12 und 14 Wochen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J verwendet. Die Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäuse konnten zeitnah generiert werden und wurden somit als Erstes untersucht.

3.4.1 Analyse des Herzgewichts von KI-Mäusen Prkg1-C117S, Prkg1-C195S und WT Geschwistertieren

Nach der Generierung der KI-Mäuse Prkg1-C117S und Prkg1-C195S erfolgte ihre Phänotypisierung bezüglich ihres Verhaltens in der Haltung und ihres gesundheitlichen Zustandes. Die Mäuse beider Einzelmutanten-Linien haben eine normale Lebenserwartung und sahen sowohl äußerlich als auch nach der Sezierung unauffällig aus. Ebenfalls konnte keine sichtbare Abweichung in ihrem Verhalten festgestellt werden. Das Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht bzw. Tibialänge wies keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu WT Geschwistertieren auf (Abb. 3.10).

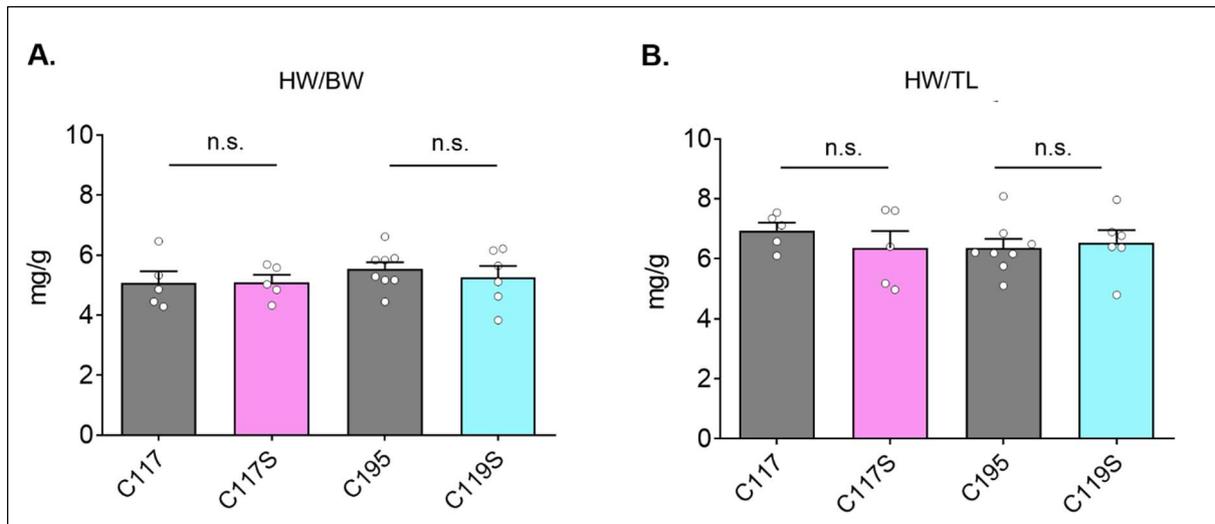


Abb. 3.10: Charakterisierung der KI-Mäuse Prkg1-C117S und Prkg1-C195S im Vergleich zu ihren WT Geschwistertieren hinsichtlich des Herzgewichts (HW) bezogen auf das Körpergewicht (A., BW) und die Tibiallänge (B., TL). Beide Parameter waren zwischen Prkg1-C117S und Prkg1-C195S und deren WT Geschwistertiere vergleichbar. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardfehler mit n=5-8 Mäusen pro Gruppe. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. n.s.-nicht signifikant mit t-Test.

3.4.2 Analyse der PKGI α Expression in verschiedenen Organen von Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Mäusen

Zur Analyse der PKGI α Expression in verschiedenen Organen der KI-Mäuse Prkg1-C117S, Prkg1-C195S und WT Geschwistertiere wurden im nächsten Schritt Aorta, Herz, ein kleiner Abschnitt des Dünndarms, Milz, Lunge, Leber und Niere aus den jeweiligen Mäusen isoliert. Die Organe wurden zuerst in Stickstoff pulverisiert, das Pulver gewogen und mit einem Ultraschallgerät in Lysispuffer homogenisiert. Die Homogenate wurden im Anschluss auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen und die Expression der PKGI α in verschiedenen Organen mit einem Antikörper gegen Gesamt-PKG detektiert (Abb. 3.11). Dabei diente GAPDH als Ladekontrolle. Es konnte kein Unterschied in PKGI α -Expression zwischen den Organen der KI-Mäuse Prkg1-C117S, Prkg1-C195S und WT Geschwistertieren festgestellt werden.

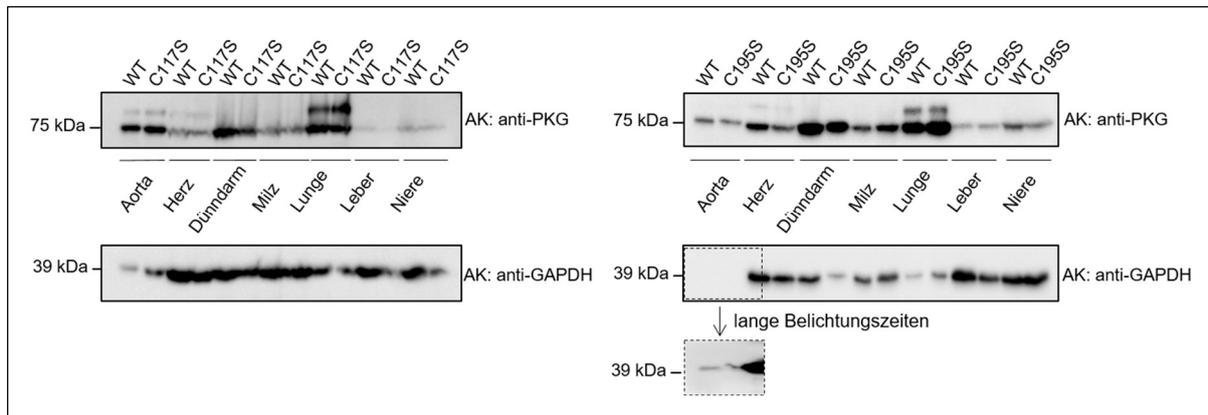


Abb. 3.11: Charakterisierung der KI-Mäuse Prkg1-C117S und Prkg1-C195S und deren WT Geschwistertiere hinsichtlich der PKG α -Expression in verschiedenen Organen. Repräsentative Western Blot Analyse der PKG α -Expression, detektiert mit Antikörpern Anti-PKG α und Anti-GAPDH als Ladekontrolle.

3.4.3 Validierung HNO-vermittelter Effekte in intakten Gefäßen von Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Mäusen

Um die physiologischen Konsequenzen der HNO-Donor vermittelten Ausbildung einer Intradisulfidbrücke und der beteiligten Cysteine auf die Vasorelaxation in intakten Gefäßen zu untersuchen, wurden Abschnitte frisch isolierter Femoralarterien der KI-Mäuse Prkg1-C117S und Prkg1-C195S sowie deren WT Geschwistertiere im Organbad myographisch analysiert. Die *Arteria femoralis* ist ein peripheres Widerstandgefäß und ist an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Nachdem das Gefäß mit dem Myographen verbunden wurde, erfolgte eine Aufzeichnung des Gefäßtonus über die Zeit (Abb. 3.12). Zuerst wurde das Gefäß mit Noradrenalin (NA) vorkontrahiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen von Acetylcholin (ACh), dem NO Donor SNAP oder dem HNO Donor CXL-1020 relaxiert. Zwischen den einzelnen Substanzen erfolgten mehrere Waschschrte mit PSS. Im zweiten Teil des Experimentes wurde zum PSS-Puffer ODQ hinzugefügt. Das Gefäß wurde 45 Minuten mit ODQ vorinkubiert und die gleichen Stimulationen erneut in permanenter Anwesenheit von ODQ durchgeführt. Aus diesen Messungen konnten nun Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. Dabei wurde für jede Konzentration eine Relaxationsamplitude berechnet und als % von der Noradrenalin-Maximalantwort dargestellt. Diese Experimente sind aus einer Zusammenarbeit mit Prof. Cor de Wit entstanden und wurden von Dr. Kjestine Schmidt am Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck durchgeführt.

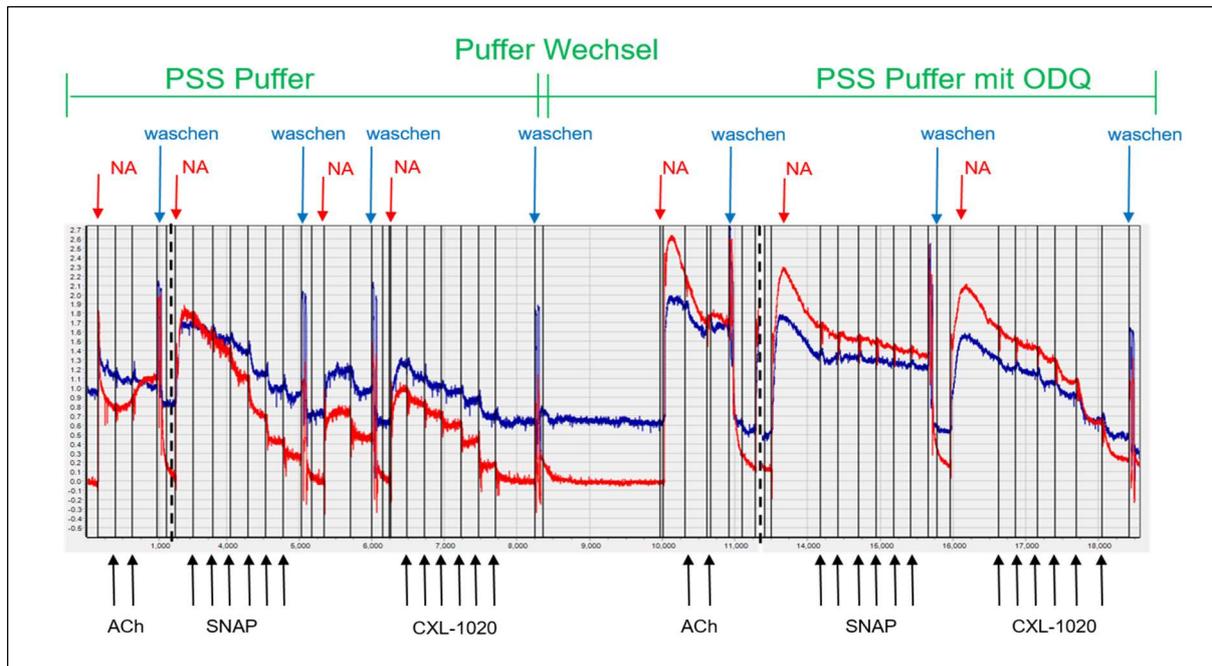


Abb. 3.12: Aufzeichnung des Gefäßtonus über die Zeit am Beispiel der WT-Maus (rote Spur) und Prkg1-C117S KI-Maus (blaue Spur). Die Vorkonstriktion der Gefäße erfolgte mit 3 μM Noradrenalin (NA). Die konzentrationsabhängige Vasorelaxation wurde durch Acetylcholin (ACh; 0,3 und 3 μM), NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine (SNAP; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 μM) und HNO-Donor CXL-1020 (0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 μM) induziert. Die Aufzeichnung des Gefäßtonus wurde im ersten Teil des Experiments ohne Zusatz von sGC-Inhibitor ODQ durchgeführt. Im zweiten Teil des Experiments erfolgte eine Zugabe von 30 μM ODQ zum PSS Puffer.

Zur Kontrolle des Vorhandenseins der physiologischen Vasorelaxation wurde ACh in allen Genotypen getestet (Abb. 3.13 A. und B.). Eine Relaxation auf ACh indiziert ein intaktes Endothel und das erfolgreiche Aufziehen des Gefäßes auf die zwei Drähte im Myographen. ACh induziert eine Vasorelaxation der Gefäße von WT und Prkg1-C117S, Prkg1-C195S KI-Mäusen, die durch ODQ signifikant gehemmt wurde. Jedoch ergab sich keine statistische Signifikanz zwischen den Genotypen. Die Restantwort nach ODQ Behandlung und 3 μM ACh von ca. 26% für das Gefäß von Prkg1-C117S und ca. 9% für das Gefäß von Prkg1-C195S deutet wahrscheinlich auf die ACh vermittelte und NO-unabhängige, endotheliale Hyperpolarisation hin (Zhang et al. 2004).

Der NO-Donor SNAP induziert eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation in perfundierten Femoralarterien der KI-Mäuse Prkg1-C117S, Prkg1-C195S sowie deren WT Geschwistertiere (Abb. 3.13 C. und D.). Unter sGC-Blockade kommt es zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Vasorelaxation, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen WT und Mutanten.

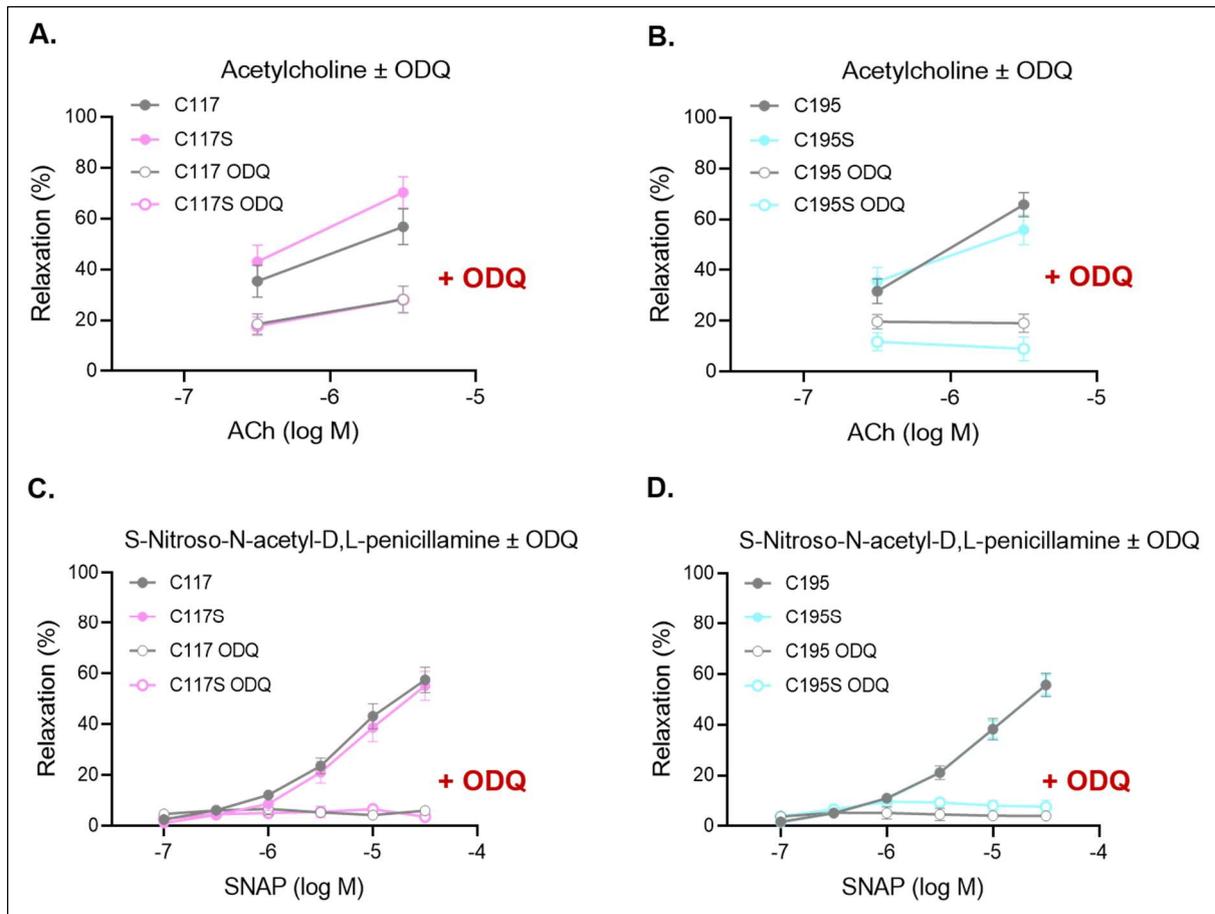


Abb. 3.13: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für Acetylcholin (ACh, A.,B.) und S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, C.,D.) mit und ohne ODQ, gemessen in Femoralarterien von WT und Prkg1-C117S (A.,C.), Prkg1-C195S (B.,D.) KI-Mäusen. ACh und SNAP induzierten unter Kontrollbedingungen und unter sGC-Blockade eine Vasorelaxation von WT-, Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Femoralarterien. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der ACh- und SNAP-Antwort durch den Aminosäureaustausch an Position 117 oder 195 bei unterschiedlichen Konzentrationen und Behandlungen mit und ohne ODQ festgestellt werden (t-Test). ODQ führt bei beiden Genotypen zu einer signifikanten Abschwächung der ACh- und SNAP-Antwort. Insgesamt wurden 69 isolierte Abschnitte (1,3 bis 1,9 mm lang) der *Arteria femoralis* mit einem mittleren Durchmesser von 200 μm aus vier verschiedenen Mausgruppen (Prkg1-C117 WT n=18; Prkg1-C117S n=18; Prkg1-C195 n=16; Prkg1-C195S n= 17) untersucht. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

Das gleiche Experiment wurde nun ebenfalls mit CXL-1020 durchgeführt. Dieser HNO-Donor induzierte eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation in Femoralarterien der WT- und KI-Mäuse (Abb. 3.14 A.,B.), welche zum Teil nach Applikation von ODQ inhibiert wurde. Die Restantwort von ca. 70% (Prkg1-C117 und Prkg1-C117S) bis 75% (Prkg1-C195 und Prkg1-C195S) bei der höchsten CXL-1020 Konzentration deutet auf eine NO-unabhängige Vasorelaxation, auch nach ODQ Inhibierung, die vermutlich durch Oxidation hervorgerufen

wurde. Jedoch zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen, sowohl mit als auch ohne ODQ. Bei 1 μM CXL-1020 könnte ein Trend zur Signifikanz zwischen den Gefäßen, isoliert aus WT und Prkg1-C117S KI-Mäusen beobachtet werden. Vermutlich ist diese Signifikanz auf die Streuung der Werte bei dieser niedrigen Konzentration von CXL-1020 zurückzuführen, da es nur diesen einzelnen Wert betrifft und sich nicht im gesamten Graphen widerspiegelt. Der Austausch eines der beiden Cysteine zu Serin scheint in intakten Gefäßen von KI-Mäusen Prkg1-C117S, Prkg1-C195S keinen signifikanten Einfluss auf die HNO-vermittelte Vasorelaxation zu haben.

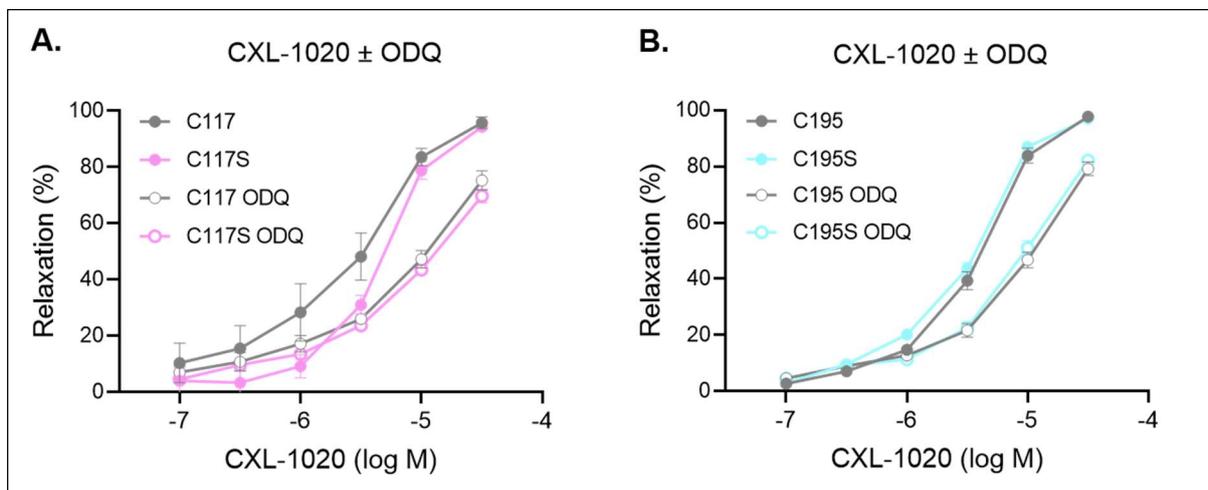


Abb. 3.14: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für CXL-1020 mit und ohne ODQ, gemessen in Femoralarterien von Prkg1-C117S (A.), Prkg1-C195S (B.) KI-Mäusen und WT Geschwister-tieren. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. CXL-1020 induziert unter Kontrollbedingungen und unter der sGC-Blockade eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation von WT, Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Femoralarterien. Weiterhin zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der CXL-Antwort durch den Aminosäureaustausch an Position 117 und 195 zwischen WT und Mutante, außer bei Prkg1-C117S und 1 μM CXL-Konzentration mit $*p=0,043$ (t-Test). Trotz sGC-Blockade bleibt eine ausgeprägte NO-unabhängige Vasorelaxation sowohl bei WT als auch bei Mutanten erhalten. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=16-18$ Experimenten dargestellt.

3.4.4 Analyse der VSMCs, isoliert aus Aorta der Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäuse

3.4.4.1 Immunfluoreszenzanalyse von VSMCs

Die VSMCs bilden die mittlere Schicht der Blutgefäße des Herzkreislaufsystems. Sie sorgen für die Struktur der Gefäßwand und ermöglichen ihr, sich zusammenzuziehen bzw. zu entspannen und somit den Blutfluss zu regulieren (Yap et al. 2021). Die VSMCs besitzen Aktin-

und Myosinfilamente, wobei das α -glatte Muskelaktin [eng. α -smooth muscle actin (α -SMA)] die predominante Isoform der Aktine ist (Perrin und Ervasti 2010). Die glatte Muskulatur-Myosinschwerkette 11 [eng. smooth muscle-myosin heavy chain 11 (SM-MHC11)] ist ein Teil des Myosin-Proteinkomplexes.

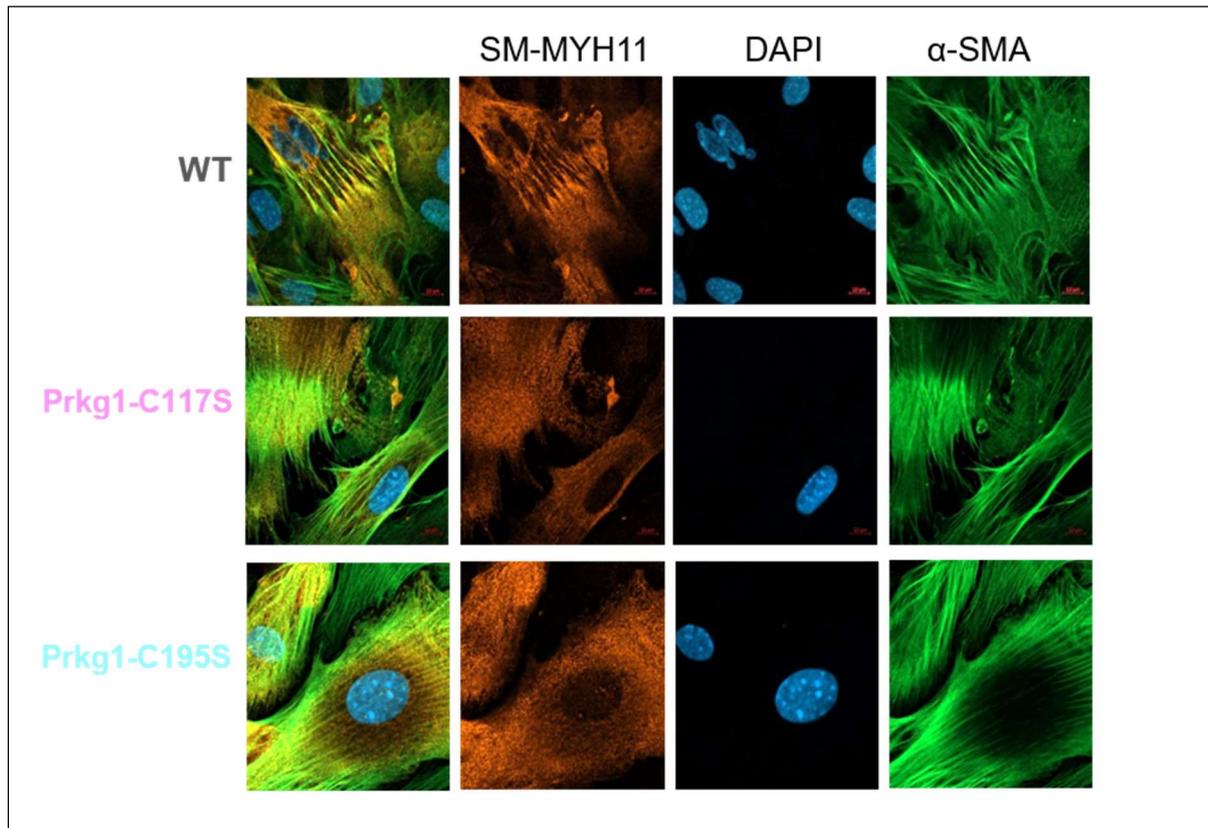


Abb. 3.15: Immunfluoreszenzanalyse der VSMCs. Nach Entnahme der Aorten aus Prkg1-C117S, Prkg1-C195S KI- und WT Geschwistertieren erfolgte eine Isolation von VSMCs. Die aortalen VSMCs wurden mit den primären Antikörpern gegen α -glatte-Muskel-Aktin (α -SMA) und glatte Muskulatur-Myosinschwerkette 11 (SM-MHC11) angefärbt und unter einem Konfokalmikroskop analysiert. Rote Maßstabskalen entsprechen 10 μ m.

Zum Nachweis der erfolgreichen Isolation der aortalen VSMCs aus den Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäusen wurden die Zellen für diese spezifischen Marker angefärbt (Abb. 3.15). Durch die Immunfluoreszenzanalyse konnte bestätigt werden, dass die isolierten und kultivierten Zellen den aortalen VSMCs entsprechen.

3.4.4.2 Analyse der PKG α Aktivität mittels endogener VASP Phosphorylierung in VSMCs aus Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäusen

Zur Analyse der Kinaseaktivität von WT bzw. Prkg1-C117S und Prkg1-C195S Mutanten erfolgte die Messung der endogenen VASP-Phosphorylierung in primären aortalen VSMCs. VASP ist ein endogenes Substrat in VSMCs, das durch die PKG α vorwiegend am Ser293 phosphoryliert wird (Profirovic et al. 2005). Hierzu wurden VSMCs aus Aorten der Maus isoliert und kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit NO- und HNO-Donoren mit und ohne ODQ stimuliert.

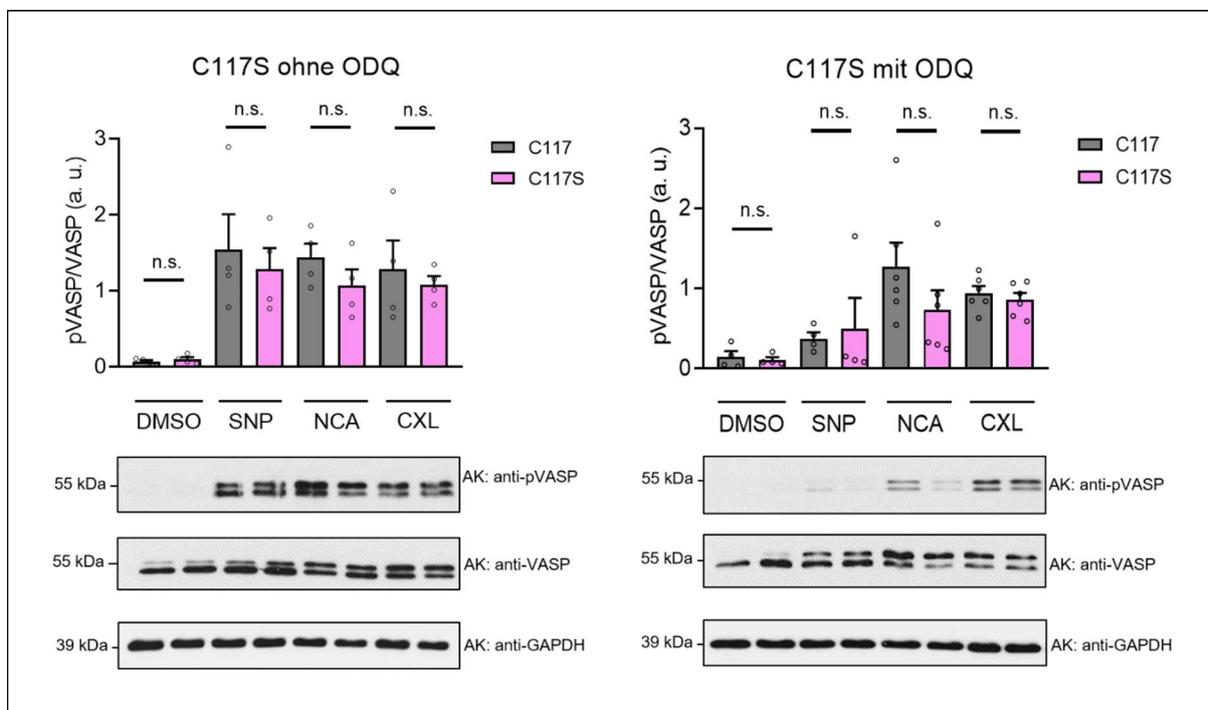


Abb. 3.16: Endogene VASP Phosphorylierung durch PKG α -WT und Mutante PKG α -C117S ohne ODQ (links) und mit ODQ (rechts) Vorinkubation in primären aortalen VSMCs. Die VSMCs wurden mit 0,1% DMSO als Kontrolle, NO-Donor SNP (50 μ M) und HNO-Donoren NCA (100 μ M) und CXL-1020 (300 μ M) stimuliert mit oder ohne ODQ (10 μ M) Vorinkubation. Die Zellen wurden abgelöst, die Zelllysate mit 3x Laemmli Puffer versetzt und eine Western Immunoblot Analyse der Zelllysate durchgeführt. Die Mutation Prkg1-C117S zeigt keinen Effekt auf die HNO-induzierte Kinaseaktivität. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von n=4-6 Experimenten dargestellt. n.s.-nicht signifikant mit One-way ANOVA, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test.

Die Abb. 3.16 und 3.17 zeigen jeweils die Analyse der Phosphorylierung von VASP durch PKG α -C117S und PKG α -C195S Mutanten mit und ohne ODQ im Vergleich zu den entsprechenden PKG α -WT Geschwistertieren. Die Daten sind als Balkendiagramm mit

jeweils drei verschiedene Blots pro Experiment dargestellt. Der erste Blot zeigt die Phosphorylierung des Substrates VASP an Ser293, das durch den Antikörper Anti-Phospho VASP (anti-pVASP) detektiert wurde. Die gesamte Menge von VASP in den aufgetragenen Proben wurde im zweiten Blot durch den Antikörper „total“ VASP (anti-VASP) detektiert. Der dritte Blot zeigt Anti-GAPDH als Ladekontrolle. Sowohl in der Abb. 3.16 als auch in der Abb. 3.17 ohne ODQ Vorinkubation induzieren SNP, NCA und CXL-1020 eine Phosphorylierung von VASP durch WT und PKG α -C117S, PKG α -C195S PKG α Mutanten. Zur Inhibierung der sGC wurden die Zellen mit ODQ vorbehandelt. Die Höhe des Signals war, wie erwartet, besonders nach der Stimulation mit SNP im Vergleich zum SNP-Signal ohne ODQ Vorbehandlung reduziert. Ebenfalls war die Höhe der NCA- und CXL-1020-Signale nach ODQ Vorbehandlung in Vergleich ohne ODQ etwas reduziert. In der Abb. 3.16 ist jedoch kein signifikanter Unterschied in der VASP Phosphorylierung zwischen WT und Mutanten PKG α nach HNO-Donor Stimulation mit ODQ Vorinkubation zu erkennen. Dagegen zeigt Abb. 3.17 einen signifikanten Unterschied in der Kinaseaktivität zwischen PKG α -WT und PKG α -C195S Mutante nach NCA Stimulation mit ODQ.

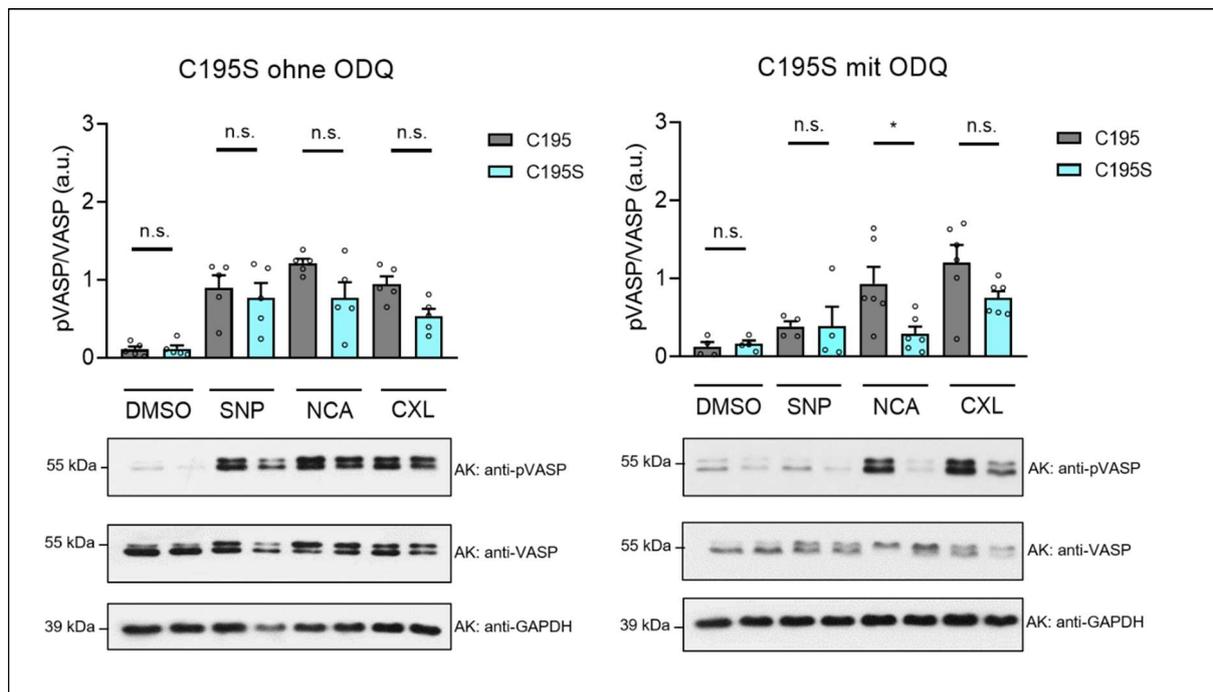


Abb. 3.17: Endogene VASP Phosphorylierung durch PKG α -WT und Mutante PKG α -C195S ohne ODQ (links) und mit ODQ (rechts) Vorinkubation in primären aortischen VSMCs. Die Mutation Prkg1-C195S weist nach NCA Stimulation eine signifikant reduzierte Kinaseaktivität im Vergleich zum WT auf. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4-6$ Experimenten dargestellt. Die Statistik wurde mit One-way ANOVA durchgeführt, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test. * $p < 0,05$, n.s.- nicht signifikant.

Der Austausch eines der beiden Cysteine zu Serin scheint die Kinase-Aktivität von KI-Mäusen Prkg1-C117S, Prkg1-C195S nicht zu beeinflussen, außer PKGI α -C195S nach NCA Stimulation. Dieser Effekt ist vermutlich NCA spezifisch.

3.4.5 Initiale Charakterisierung der Prkg1-C117/195S KI-Maus

Die Generierung des Prkg1-C117/195S KI-Mausmodells, das zwei Mutationen trägt, konnte nur schrittweise durchgeführt werden und nahm eine längere Zeit in Anspruch. Aus diesem Grund konnte erst vor Kurzem mit der Charakterisierung begonnen werden. Diese Linie enthält sowohl die C195S Mutation im Exon 4, als auch zusätzlich die in homozygote Embryonen dieser Mäuse eingeführte Punktmutation C117S im Exon 2 des *Prkg1* Gens. Beide Punktmutationen wurden mittels CRISPR/Cas9 Technologie eingeführt.

3.4.5.1 Zucht und Phänotyp der Prkg1-C117/195S Mäuse

Die Zucht dieser Mäuse war anfänglich durch eine hohe Mortalität, entweder direkt nach der Geburt bzw. im Alter von 3-4 Wochen vor dem Erreichen des Reproduktionsalters erschwert. Homozygote Prkg1-C117/195S Mäuse zeigten bei der Autopsie, ähnlich zu PKGI- (Schlossmann et al. 2005, Föller et al. 2008) und sGC-KO Mäusen (Friebe et al. 2007) morphologische Veränderungen im Viszeralraum (Abb. 3.18 A.). Sie besaßen ein ausgeprägtes Megakolon und Splenomegalie. Die PKGI- und sGC-KO Mäuse können aufgrund der gestörten Darmrelaxation, die ebenfalls durch die NO-cGMP-PKG-Kaskade reguliert wird, ohne spezielle Diät nicht überleben.

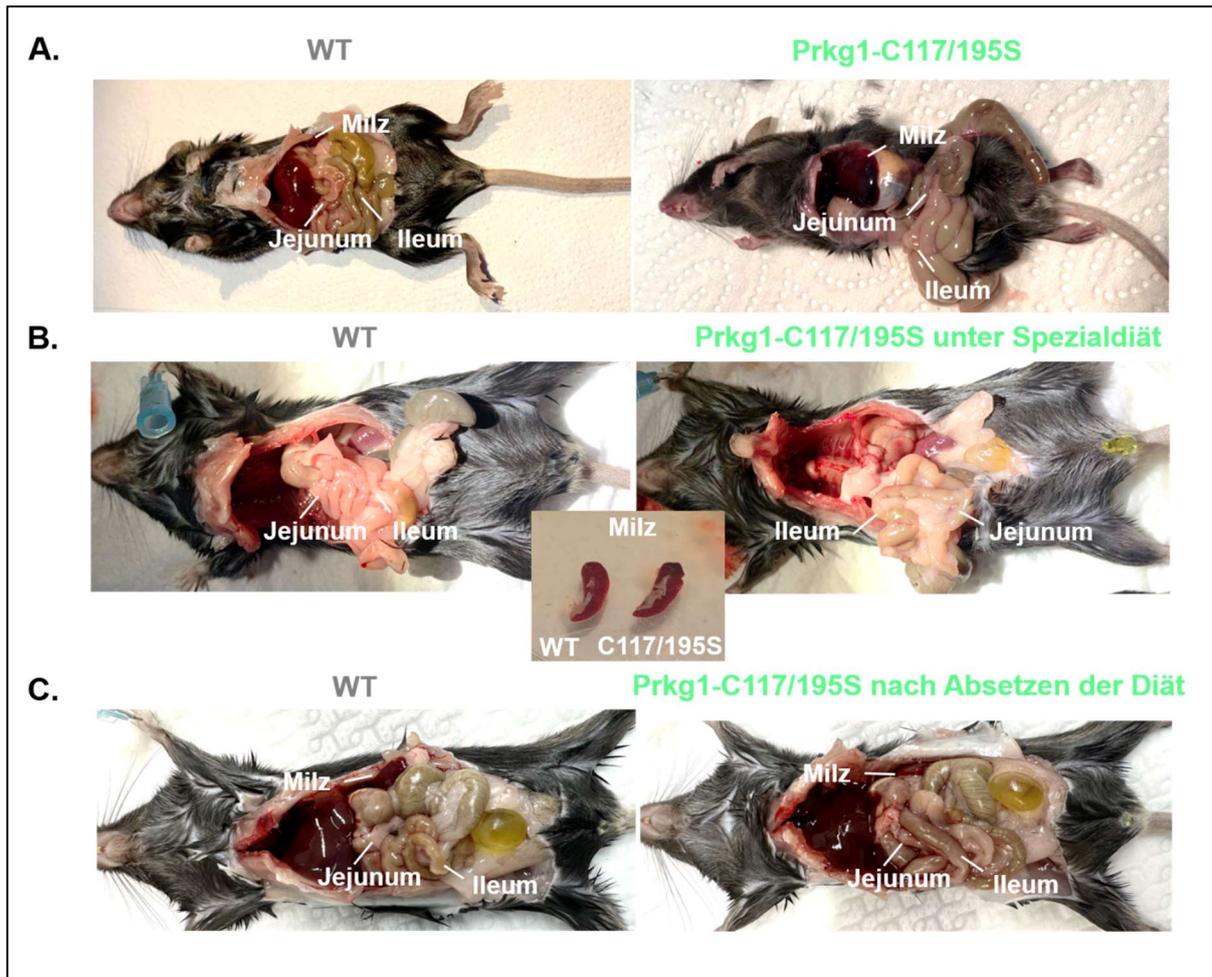


Abb. 3.18: Charakterisierung der Prkg1-C117/195S KI-Maus. **A.** Die doppelmutierte KI-Maus (**rechts**) weist einen erheblichen gastrointestinalen Phänotyp und Splenomegalie im Vergleich zum WT-Geschwistertier auf. **B.** Die rohfaserarmer Diät mit Zusatz von Esomeprazol und Natriumbicarbonat bewirkte bei der Mutante Prkg1-C117/195S (**rechts**) eine Normalisierung der viszerale Organe, vergleichbar mit dem WT (**links**). **C.** Bereits drei Tage nach Absetzen der Diät konnten sichbare Veränderungen des Bauchraums bei der Mutante festgestellt werden.

Aus diesem Grund wurde die Prkg1-C117/195S Linie auf eine rohfaserarmer Spezialdiät umgestellt. Mit dieser Diät konnten die Tiere bis zum Alter von 12-15 Wochen ohne sichtbare Einschränkungen überleben und für die Isolation von aortalen VSMCs verwendet werden. In der Abb. 3.18 B. ist die Maus Prkg1-C117/195S unter Zugabe der Spezialdiät im Vergleich zum WT-Geschwistertier zu sehen. Die Milz zwischen WT und der Mutante unterscheiden sich nicht mehr. Auch der Darm scheint nur noch minimal vergrößert zu sein. Nach Absetzen der Spezialdiät und Zugabe von rohfaserreicherem Futter sind bereits nach drei Tagen sichtbare Vergrößerungen des Ileums bei der Prkg1-C117/195S KI-Maus im Vergleich zum WT zu erkennen (Abb. 3.18 C.).

Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen Herzgewicht und Körpergewicht bzw. Tibialänge unter der Zugabe der rohfasserfreien Spezialdiät untersucht (Abb. 3.19). Prkg1-C117/195S KI-Mäuse zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu WT Geschwistertieren.

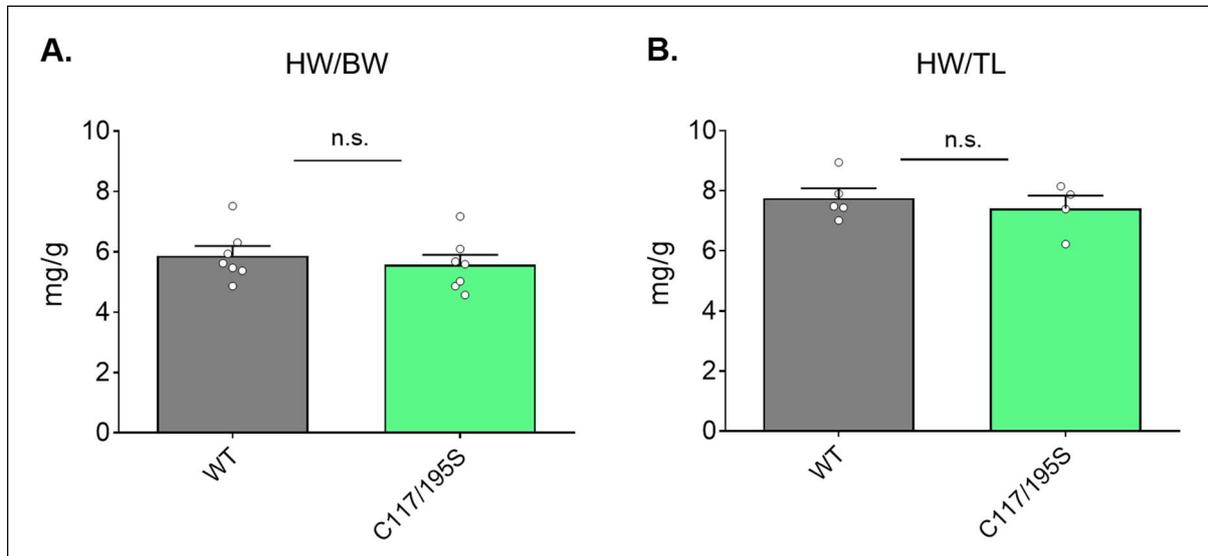


Abb. 3.19: Charakterisierung der KI-Maus Prkg1-C117/195S und der WT Geschwistertiere hinsichtlich des Herzgewichts (HW) bezogen auf das Körpergewicht (A., BW) und die Tibialänge (B., TL) unter rohfasserfreier Spezialdiät. Beide Parameter waren zwischen Prkg1-C117/195S und deren WT Geschwistertieren vergleichbar. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler mit $n=4-7$ Mäusen pro Gruppe. n.s.-nicht signifikant mit t-Test.

3.4.5.2 Analyse der PKG1 α Aktivität mittels endogener VASP Phosphorylierung in VSMCs aus dem Prkg1-C117/C195S KI-Mausmodell

Die Analyse der VASP Phosphorylierung in Prkg1-C117/195S aortalen VSMCs wurde wie bereits im Kap. 3.4.4 beschrieben durchgeführt (Abb. 3.20). Die Stimulation der Zellen ohne ODQ Vorinkubation führte, wie erwartet, zum Anstieg des Signals und zur erhöhten Phosphorylierung des Substrates VASP sowohl durch WT als auch durch PKG1 α -C117/195S, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen WT und Mutante. In Gegenwart von ODQ zeigte die Muntante eine signifikant verminderte Substratphosphorylierung, sowohl nach NCA als auch nach CXL-1020 Stimulation. Daher scheint die oxidative Aktivierung der doppelmutierten Kinase durch HNO aufgehoben zu sein und wäre somit entscheidend für die physiologische Funktion der Kinase.

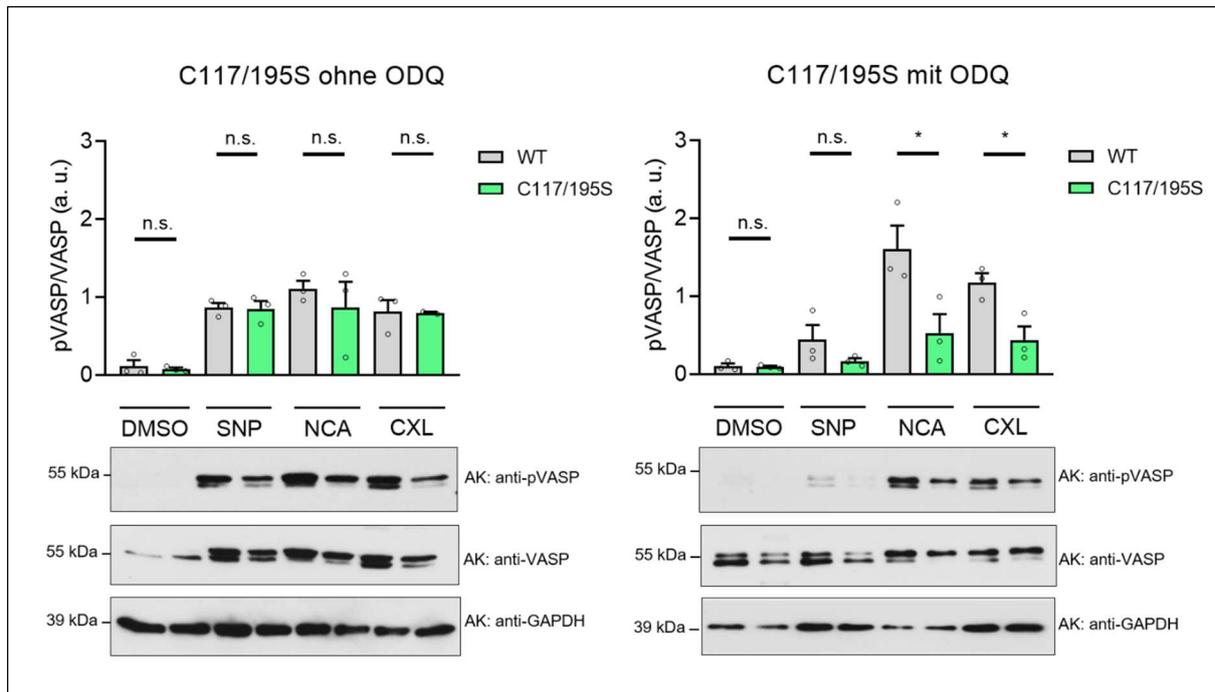


Abb. 3.20: Endogene VASP Phosphorylierung durch PKGI α -WT und Mutante PKGI α -C117/195S ohne ODQ (links) und mit ODQ (rechts) Vorinkubation in primären aortischen VSMCs. Die VSMCs wurden mit 0,1% DMSO als Kontrolle, NO-Donor SNP (50 μ M) und HNO-Donoren NCA (100 μ M) und CXL-1020 (300 μ M), stimuliert mit oder ohne ODQ (10 μ M) Vorinkubation. Die Zellen wurden abgelöst, die Zelllysate mit 3x Laemmli Puffer versetzt und eine Western Blot Analyse der Zelllysate durchgeführt. Die Mutation Prkg1-C117/195S weist nach NCA- und CXL-Stimulation eine signifikant reduzierte Kinaseaktivität im Vergleich zum WT auf. Verwendet wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von n=3 Experimenten dargestellt. Die Statistik wurde mit One-way ANOVA durchgeführt, gefolgt von Sidak's Multiple Comparison Test. * $p < 0,05$; n.s.- nicht signifikant.

Weiterhin wurde die Expression von PKGI α in Prkg1-WT vs. Prkg1-C117/195S VSMCs untersucht. Hier zeigt sich in eine Tendenz für eine verminderte Expression der C117/195S Kinase (Abb. 3.21), jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen WT und Doppelmutante zu erreichen.

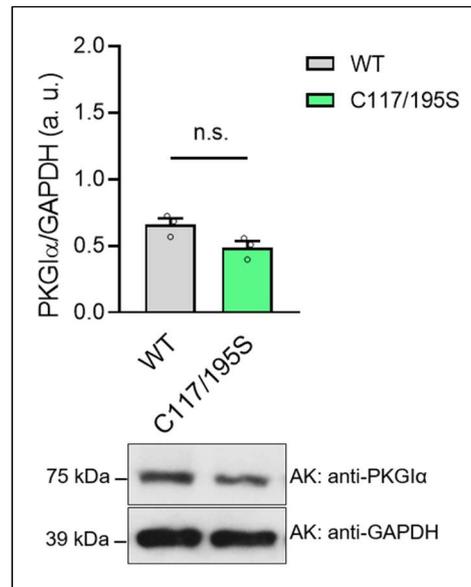


Abb. 3.21: Representativer Immunoblot der PKGI α -Expression in VSMCs, isoliert aus WT und Prkg1-C117/195S Aorten. Die Expression der C117/195S Kinase in VSMCs vermindert, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Expression der WT Kinase. GAPDH wurde als Ladekontrolle untersucht. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=3$ Experimenten dargestellt. n.s.- nicht signifikant mit einem t-Test.

3.4.6 *In vitro* Charakterisierung von Twin-Strep-tag[®] PKGI α C117/195S

Aufgrund der Ähnlichkeit des Phänotyps von Prkg1-C117/195S KI-Mäusen mit den PKGI- und sGC-KO Mäusen (Schlossmann et al. 2005, Friebe et al. 2007, Föller et al. 2008), musste geprüft werden, ob die C117/C195S Kinase in ihren Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich der cGMP-Bindung und der katalytischen Aktivität der WT PKGI α entspricht. Dafür wurden WT und doppelmutierte Kinase rekombinant hergestellt, aufgereinigt und bezüglich der cGMP-Bindung und Kinaseaktivität mit unterschiedlichen Aktivitätsassays untersucht.

3.4.6.1 Herstellung des Twin-Strep-tag[®] PKGI α -C117/195S Konstruktes

Das WT Konstrukt pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α enthält die komplette humane PKGI α Sequenz mit der hochaffinen cGMP-Bindungsdomäne A und den Cysteinen 117 und 195. Zur Herstellung von pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -C117/195S wurden die beiden Cysteine, durch eine Mutation zu Serin ausgetauscht. Das Cystein kodierende Basen-Triplett TGT wurde dabei durch das für Serin kodierende Basen-Triplett AGT ersetzt (Abb. 3.22).

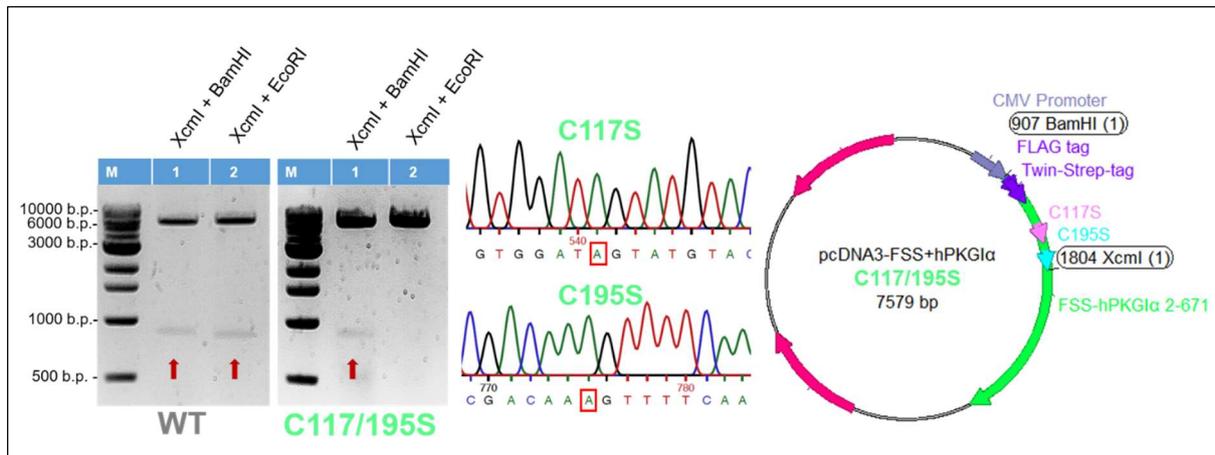


Abb. 3.22: Validierung des Plasmides pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -C117/195S. Links: Agarosegele nach Restriktionsverdau mit XcmI und BamHI (6682 und 897 b.p.) bzw. EcoRI und XcmI (866 und 6713 b.p.) von pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -WT (links) und C117/195S (rechts) zu sehen. Beim korrekten Ligieren von pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -C117/195S eliminiert sich die Schnittstelle für EcoRI, so dass auf dem rechten Gel keine Insert-Bande für die Restriktionsenzyme XcmI + EcoRI vorzufinden ist. Mitte: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Validierung der korrekten Sequenzen mit dem ausgetauschten Basen-Triplett TGT zu AGT. Die Punktmutationen sind rot umrandet. Rechts: Entsprechende Plasmidkarte der Mutante.

Die Klonierung der Mutation C117/195S erfolgte in vier PCR-Ansätzen. Die einzelnen Produkte der ersten drei PCRs wurden als Template für die vierte PCR verwendet. Es erfolgte im Anschluss der Verdau des Vektors pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -WT mit den Enzymen EcoRI und XcmI und des PCR-Produkts mit den Enzymen MfeI und XcmI. Der geschnittene Vektor und das geschnittene PCR-Produkt wurden danach miteinander ligiert. Dabei wurde im finalen Konstrukt von pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -C117/195S die ursprüngliche Schnittstelle von EcoRI eliminiert, da die Sequenz von der Schnittstelle MfeI komplementär zur EcoRI Sequenz ist. Durch einen Kontrollverdau mit den Enzymen EcoRI und XcmI bzw. BamHI und XcmI konnte dieses Ergebnis überprüft werden. Nach der Midipräparation wurde das Konstrukt durch eine Sanger-Sequenzierung verifiziert.

3.4.6.2 Aufreinigung von hPKGI α -WT und hPKGI α -C117/195S

Zur Aufreinigung der humanen WT (hPKGI α -WT) und der C117/196S Kinase (hPKGI α -C117/195) wurden die beiden Konstrukte pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -WT und pcDNA 3.0-FSS+hPKGI α -C117/195S in HEK293 Zellen transfiziert. Aufgrund des vorhandenen und im Expressionsplasmid eingebauten Twin-Strep-tags[®] konnte die Aufreinigung erfolgen. Die

hPKGI α -WT und hPKGI α -C117/195S Kinasen konnten erfolgreich, wie in Abb. 3.23 dargestellt, über das Strep-Tactin[®]-System aus den HEK293 Zellen isoliert werden.

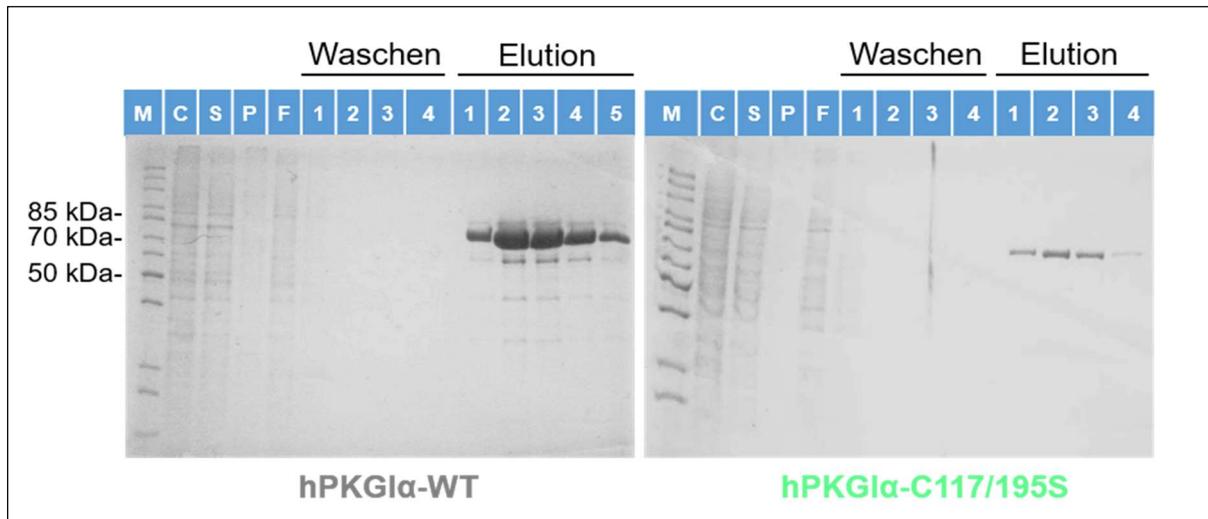


Abb. 3.23: Aufreinigung der hPKGI α -WT und hPKGI α -C117/195S. Zur Überwachung des Aufreinigungsprozesses und der Überprüfung der Reinheit der exprimierten Proteine WT (**links**) und Mutante (**rechts**) wurden Proben "Zelllysat" (C), "Überstand" (S), "Pellet" (P), "Durchfluss" (F), "Waschen" und "Elution" entnommen und mittels SDS-Page detektiert. Die Bande bei 75 kDa zeigt die erfolgreich eluierten Proteine. Die einzelnen Elutionsproben wurden zu einer Probe vereinigt und die Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt: hPKGI α -WT 2,4 μ M; hPKGI α -C117/195S 1,4 μ M.

3.4.6.3 *In vitro* Kinase Assays mit gereinigter WT und C117/195S PKGI α

Die Aktivität der aufgereinigten Kinasen hPKGI α -WT und hPKGI α -C117/195S wurde mittels eines enzymgekoppelten spektrophotometrischen Cook Assays untersucht. Dafür wurde VASptid als Substrat in Gegenwart von aufsteigenden cGMP Konzentrationen ohne (Abb. 3.24 A.) und nach Stimulation mit 100 μ M NCA (Abb. 3.24 B.) verwendet.

Zur Bestimmung von k_{Akt} wurden cGMP Konzentration gegen kalkulierte Werte der spezifischen Aktivität logarithmisch aufgetragen. Sowohl hPKGI α -WT als auch hPKGI α -C117/195S konnten durch cGMP signifikant aktiviert werden (Abb. 3.24 A.). Die Mutante konnte jedoch die maximale Aktivität der WT-Kinase nicht erreichen (Δ spez. Aktivität: hPKGI α -WT: 13,7 U/mg; hPKGI α -C117/195S 12,0 U/mg). Die Aktivierungskonstante für hPKGI α -WT betrug dabei $29,7 \pm 2,9$ nM und für hPKGI α -C117/195S $70,8 \pm 2,2$ nM cGMP. Die Mutante zeigt somit eine 2,4-fach geringere Aktivierbarkeit durch cGMP. Die hPKGI α -C117/195S lässt sich somit schlussfolgernd durch cGMP aktivieren, benötigt jedoch eine höhere cGMP Konzentration für ihre Aktivierung und ist insgesamt weniger maximal aktiv.

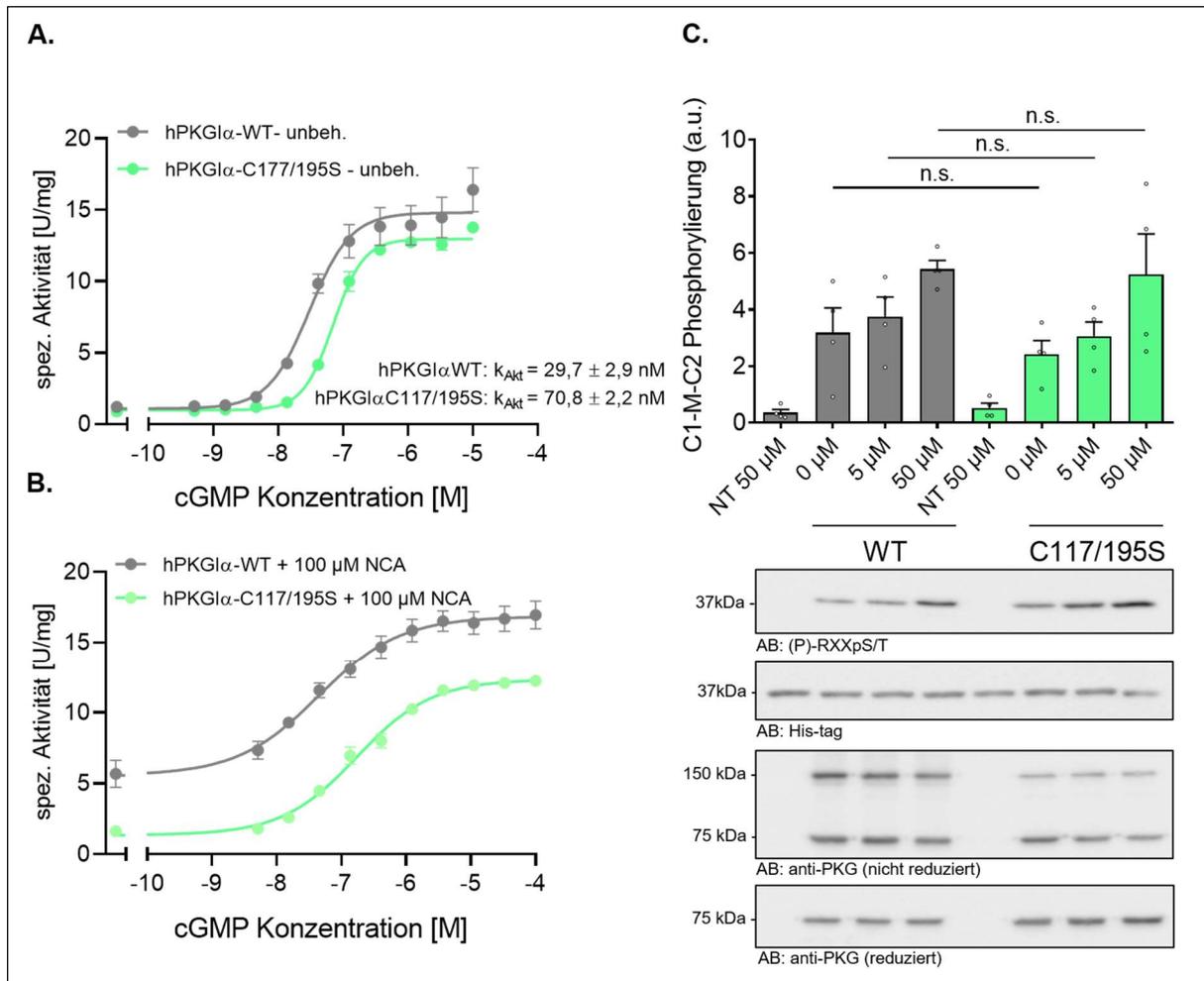


Abb. 3.24: Charakterisierung der Kinaseaktivität mit Cook- und *in vitro* Kinase Assays von hPKGα-WT und hPKGα-C117/195S. **A.,B.** Cook-Assay: Konzentrationsabhängige cGMP Aktivierung der hPKGα-WT (grau) und hPKGα-C117/195S (hell grün), unbehandelt (**A.**, unbeh.) und nach 10 minütiger Stimulation mit 100 μM NCA (**B.**). Unter Verwendung von VASPTide als Substrat unterscheiden sich die Aktivierungskonstanten der beiden Kinasen um den Faktor 2,4 mit $29,7 \pm 2,9$ nM für hPKGα-WT und $70,8 \pm 2,2$ für hPKGα-C117/195S. Alle Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von drei Experimenten (gemessen in Duplikaten) dargestellt. **C.** *In vitro* Kinase Assays: Repräsentative Western Blot Analyse der Substratphosphorylierung von C1-M-C2 durch PKGα-WT und PKGα-C117/195S. Beide Kinasen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Phosphorylierung des Substrates. Die Experimente wurden ohne Plasmid-Transfektion (NT) oder mit WT, C117S, C195S, C117/195S PKGα durchgeführt, rekombinant exprimiert in HEK293 Zellen und stimuliert mit SNP (0, 5, 50 μM; 10 Min). Die Intensität der Phosphorylierung des Substrates wurde dabei durch Western Immunoblot mit einem phosphospezifischen Antikörper [(P)-RXXPS/T] detektiert und auf die Gesamtmenge des Substrates (His-tag) und die Gesamtmenge der Kinase PKG (reduziert) normalisiert. n.s.- nicht signifikant.

In der Abb. 3.24 B. wurde ebenfalls ein Cook-Assay durchgeführt, jedoch wurden die beiden Kinasen vor der Messung für 10 Minuten mit 100 μM NCA stimuliert. Die hPKGα-WT Kinase zeigte bereits basal ohne cGMP eine erhöhte spezifische Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass

die hPKG α -WT Kinase durch NCA Stimulation eine Intradisulfidbrücke ausbilden konnte und somit bereits im aktivierten Zustand vorlag, noch vor der Zugabe von cGMP. Dies war nicht der Fall für die hPKG α -C117/195S Kinase, da sie aufgrund des Austauschs der beiden Cysteine zu nicht-oxidierbaren Serin keine Intradisulfidbrücke auszubilden kann. Somit lag die doppelmutierte Kinase selbst nach NCA Stimulation basal in einer inaktiven Form vor. Zudem konnte beobachtet werden, dass der Effekt von cGMP nach NCA Stimulation der hPKG α -WT Kinase signifikant reduziert war (Δ spez. Aktivität hPKG α -WT ohne NCA: 13,7 U/mg vs. mit NCA: 11,3 U/mg).

Durch weitere unabhängige *in vitro* Kinase Assays wurde die Aktivität der hPKG α -C117/195S und deren cGMP Aktivierbarkeit mit den in HEK293 Zellen rekombinant exprimierten Vollängen WT und C117/195S PKG α pcDNA-PKG α Plasmiden untersucht (Abb. 3.24 C.). Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 5 und 50 μ M NO-Donor SNP stimuliert. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung des Substrates C1-M-C2 durch hPKG α -WT und hPKG α -C117/195S Kinase detektiert werden. Dieses Ergebniss deutet auf eine weitgehend unveränderte Kinaseaktivität der Mutante hinsichtlich der cGMP Aktivierbarkeit hin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hPKG α -C117/195S in der Lage ist, cGMP zu binden und das Substrat ähnlich wie die hPKG α -WT Kinase zu phosphorylieren. Weiterhin lässt sich daraus folgern, dass sowohl die klassische Aktivierung der Kinase über NO/cGMP-Kaskade als auch die oxidativ-induzierte Aktivierung, die zur Bildung einer Intradisulfidbrücke führt, von entscheidender Bedeutung sind für die physiologische Funktion der Kinase.

4 Diskussion

Oxidative Modifikationen in PKG1 α wurden als ein wichtiger Regulationsmechanismus für die Funktion dieser Kinase unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen postuliert (Sheehee et al. 2018, Cuello und Eaton 2019). Gleichwohl werden diese Befunde in der Literatur kontrovers diskutiert (Kalyanaraman et al. 2017). Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass PKG1 α nach HNO Exposition posttranslational modifiziert werden kann und eine aktivatorische Intradisulfidbrücke zwischen den C117 und C195 in der hochaffinen cGMP-Bindungsdomäne ausbildet (Donzelli et al. 2017). Der individuelle Beitrag der beiden Cysteine und die (patho)physiologische Konsequenz sind jedoch dabei nicht vollständig aufgeklärt.

Deshalb bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die HNO-induzierte Intradisulfidbrückenbildung und den individuellen Beitrag der zur Ausbildung dieser Brücke führenden Cysteine 117 und 195 sowie ihre funktionelle Relevanz in diesem Zusammenhang zu charakterisieren. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden erstmalig in einem Hochdurchsatzverfahren FRET Messungen mit mutierten cGi500 Sensoren (C117S, C195S, C117/195S) durchgeführt und drei entsprechende KI-Mausmodelle generiert. Diese wurden im Hinblick auf Vasorelaxation und PKG1 α Substratphosphorylierung charakterisiert. In dieser Arbeit konnten nachfolgende Befunde erhoben werden:

- HNO ist ein starker Aktivator der sGC. Unter sGC-Hemmung sind direkte HNO-Effekte auf PKG1 α detektierbar. Dabei war die HNO-induzierte Konformationsänderung in den cGMP Bindedomänen des Sensors bei allen cGi500 Mutanten im Vergleich zum WT signifikant beeinträchtigt. Hier stellt C195S nach NCA Stimulation eine Ausnahme dar.
- *In vitro* zeigen alle PKG1 α Mutanten eine signifikant verminderte HNO-induzierte Aktivierung und daraus resultierende Substratphosphorylierung.
- *In vivo* werden die Einzelmutanten C117S und C195S hinsichtlich ihrer HNO-induzierten PKG1 α Substratphosphorylierung (eine Ausnahme stellen C195S VSMCs nach NCA Stimulation dar) und Vasorelaxation, gemessen in *Arteria femoralis* Gefäßen, vollständig kompensiert. Die Einzelmutanten zeigen keinen Phänotyp.
- Die gleichzeitige Mutation beider Cysteine C117/195S führt dagegen zu einem pathologischen Phänotyp der Maus, der dem des PKG1 α - und sGC-KO Phänotyps

ähnelt. Die HNO-induzierte Substratphosphorylierung durch PKGI α -C177/195S Mutante war dabei signifikant abgeschwächt.

4.1 Untersuchung von Redox-defizienten FRET-Sensoren

Als Ausgangspunkt für diese Arbeit diente die Publikation von Donzelli et al. Hier wurden erstmalig die Effekte von NCA auf die Konformationsänderung des cGi500 FRET Sensors gezeigt. Allerdings wurden die Messungen nur für die WT Kinasesequenz (Donzelli et al. 2017) unternommen. Diese Experimente haben eine interessante Wechselwirkung zwischen den Effekten von NCA und cGMP enthüllt. Die NCA Stimulation führte durch Oxidation und anschließende Intradisulfidbrückenbildung zwischen C117 und C195 zu einer Konformationsänderung des Sensors, die eine cGMP-induzierte Konformationsänderung imitiert. Nach NCA Stimulation war die cGMP-Bindung an den Sensor stark abgeschwächt, was auf eine Konkurrenz zwischen oxidativ-vermittelter Intradisulfidbrückenbildung und der cGMP-Bindung an den Sensor und im übertragenden Sinn auch auf die Kinase selbst hinweist. Diese Beobachtung ging ebenfalls mit einer verminderten Affinität der Kinase für cGMP in Radioligandenbindungsassays einher (Donzelli et al. 2017). Daher war das übergeordnete Ziel dieser Dissertation, die Wechselwirkung zwischen Oxidation, Intradisulfidbrückenbildung und cGMP in der regulatorischen Domäne von PKGI α , inklusive der individuellen Beiträge der C117 und C195 in diesem posttranslationalen Geschehen genauer zu untersuchen.

Dafür wurden initial mutierte cGi500 Sensoren generiert und stabil in HEK293 Zellen exprimiert, in denen C117, C195 oder beide Cysteine zusammen zu nicht-oxidierbarem Serin ausgetauscht wurden (C117S, C195S, C117/195S). Diese stabilen Zelllinien konnten erfolgreich für FRET Messungen im Hochdurchsatzverfahren auf cGMP- bzw. HNO-induzierte Konformationsänderungen etabliert werden. Alle drei Mutanten zeigten dabei keine beeinträchtigte cGMP-Bindung nach konventioneller Stimulation mit SNP mit EC₅₀ Werten zwischen ~400-700 nM für alle Sensoren. Dies stellt sicher, dass der Austausch eines Cysteins durch Serin nicht *per se* die cGMP-Affinität der Sensoren beeinträchtigt. Ebenfalls waren die Amplituden der FRET Antworten vergleichbar. Daher konnten die Signale von WT und allen Mutanten-Sensoren parallel untersucht und miteinander verglichen werden.

Die HNO Donoren NCA und CXL-1020 induzierten robuste Änderungen der FRET Signale, welche bei verschiedenen Konzentrationen gemessen werden konnten und bei 100 μ M NCA bzw. 300 μ M CXL-1020 ihr Maximum erreichten. Diese Konzentrationen wurden daher für

weitere FRET-Experimente verwendet. Die FRET Signale nach NCA und CXL-1020 Stimulation zeigten überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede in ihrer Amplitude zwischen den 4 Zelllinien. Nach Literaturrecherche konnte eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis postuliert werden. Die sGC lässt sich ebenfalls durch die HNO-Donoren oxidativ aktivieren (Miller et al. 2009, Kemp-Harper et al. 2021). Dieser Prozess überwiegt dabei den direkten Effekt von HNO auf den Sensor und führt zu einer cGMP-abhängigen Sensoraktivierung.

Bei pathophysiologischen Prozessen dagegen spielt der sGC abhängiger Mechanismus eine untergeordnete Rolle. Als Beispiel sind hier die Hypertonie und die Herzinsuffizienz zu nennen. Dort wurde eine Desensitivierung der sCG beschrieben, was die Produktion von cGMP einschränkt (van Heerebeek et al. 2012, Greene et al. 2013, Pieske et al. 2014). Unter diesen pathologischen Bedingungen könnte die direkte Aktivierung von PKG α durch HNO relevanter sein. Durch die Anwendung des prototypischen sGC Inhibitors ODQ konnten diese pathologischen Zustände imitiert werden und der direkte Effekt von HNO auf die oxidative Modifikation der Cysteine in der cGMP Bindedomäne des Sensors demaskiert werden. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den FRET Antworten der mutierten Sensoren im Vergleich zum WT cGi500. Dieses Ergebnis spricht für eine direkte oxidative Modifikation der Cysteine im WT Sensor und ihren Einfluss auf die aktivatorische Konformationsänderung. Die Intradisulfidbrückenbildung wurde unter diesen Bedingungen durch einen Western Immunoblot bestätigt. Keine Verminderung der FRET Antwort konnte nur bei NCA Stimulation des C195S cGi500 Sensors nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Dostmann (Sheehe et al. 2018) konnte in ihren Arbeiten zeigen, dass die Oxidation von C117 nach Stimulation mit H₂O₂ notwendig und ausreichend für die konstitutive Aktivierung der Kinase, unabhängig von der Oxidation an C195 ist. Nach diesem Modell führt die Oxidation von C117 zur Sulfenierung dieses Cysteins. Aufgrund der Mutation von C195 zu C195S gibt es kein weiteres freies Thiol in unmittelbarer Nähe, sodass die Sulfensäure nicht zu einem Disulfid, sondern weiterhin irreversibel zu Sulfin- und Sulfonsäure oxidiert werden könnte. Diese Experimente wurden mit hohen Konzentrationen von H₂O₂ (500 μ M) und nicht mit NCA oder CXL-1020 durchgeführt. Daher lässt sich dieses Erkenntnis nur bedingt auf die in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen übertragen. Vermutlich ist dieses Ergebnis eher ein NCA spezifischer Effekt, da NCA im Gegensatz zu CXL-1020 eine viel längere HNO-Freisetzungskinetik aufweist. Die Halbwertszeit für NCA beträgt dabei 800-900 Minuten (Sha et al. 2006, Shoman et al. 2011) und für CXL-1020 nur 2 Minuten (Sabbah et al. 2013). NCA hydrolysiert bei neutralem pH-Wert langsam und erzeugt über Stunden eine relativ niedrige,

aber konstante HNO-Konzentration. CXL-1020 setzt dagegen HNO als Bolus zu Beginn der Hydrolyse frei, sodass das freigesetzte HNO dem biologischen Target-Cystein nur für eine sehr kurze Zeit zur Verfügung steht. Eine vergleichbare Theorie wurde von Donzelli et al. (Donzelli et al. 2013) zu einem weiteren HNO-Donor namens Angeli's Salt aufgestellt, der ebenfalls eine kurze HNO-Freisetzungskinetik von nur 2-5 Minuten aufweist (Miranda et al. 2005). Somit erzeugt NCA vermutlich eine stärkere Oxidation von C117 und hat einen viel größeren kompensatorischen Effekt als CXL-1020. Eine weitere alternative Erklärung könnte sein, dass NCA, im Gegensatz zu CXL-1020, Thiol-reaktive Nebenprodukte freisetzt (Sha et al. 2006, Shoman et al. 2011), die ebenfalls einen Einfluss auf die Oxidation der Cysteine ausüben könnten.

Unter Bedingungen einer erhöhten und prolongierten intrazellulären ROS Produktion, wie es bei einer Sepsis der Fall ist, wurde die Bildung von 8-Nitro-cGMP beschrieben, was zu einer weiteren oxidativen Modifikation von PKG α , nämlich der S-Guanylierung an C195 führen kann. Diese Beobachtung wurde bislang nur von der Arbeitsgruppe von Akashi et al. beschrieben (Akashi et al. 2016). Eine solche Modifikation des C195 im Sensor mit der C117S Mutation wäre theoretisch möglich, jedoch ist die sGC-abhängige cGMP Synthese in den beschriebenen FRET Experimenten nach Applikation von ODQ aufgehoben. Somit ist die Konzentration von cGMP in der Zelle vermutlich zu gering, um die 8-Nitro-cGMP Bildung und S-Guanylierung von C195 zu induzieren. Auch konnte diese Beobachtung in einer kürzlich durchgeführten Untersuchung, die die Prkg1-C19S KI-Maus einer septischen Intervention unterzog, nicht beobachtet werden (Kamynina et al. 2022).

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der simultanen Modifikation beider Cysteine C117 und C195 in der hochaffinen cGMP-Bindedomäne A, die im cGi500 Sensor enthalten ist und deshalb unter Einsatz dieses Sensors untersucht werden konnte. Eine mögliche Limitation der FRET Methode ist, dass die cGi500 basierten Sensoren nur einen Teil der regulatorischen Domäne der PKG α , genauer gesagt, nur die beiden cGMP Bindestellen, enthalten. Somit kann die durch cGMP- oder HNO-induzierte Konformationsänderung nur in einem Teil des Kinasemoleküls untersucht werden, während der Einfluss der anderen regulatorischen Elemente wie des N-terminalen Leucin-Zippers oder der katalytischen Domäne hier nicht abgebildet wird. Daher können diese Ergebnisse eventuell nicht direkt auf die ganze Kinase übertragen werden. In der Zukunft wäre es interessant, diese 3 Mutationen in den Cygnet2.1 cGMP Sensor einzuführen, was die Untersuchung der Konformationsänderung in dem gesamten Kinasemolekül, ausgenommen dem Leucin-Zipper und der AI Domäne, die in diesem Sensor

nicht enthalten sind, ermöglicht (Honda et al. 2001). Hierbei könnte auch die Rolle weiterer, in der PKG1 α vorhandener Cysteine analysiert werden. Dazu gehören C312 und C518, welche ursprünglich aufgrund der Versuche mit oxidierenden Metallionen als weitere intradisulfidbrückenbildende Cysteine vorgeschlagen wurden (Landgraf et al. 1991). Aus der inzwischen vorhandenen Kristallstruktur der PKG1 α scheint jedoch die Ausbildung dieser Brücke zwischen C312 und C518 aufgrund der ungünstigen sterischen Lage zueinander eher unwahrscheinlich (Osborne et al. 2011).

4.2 Analyse der funktionellen Relevanz der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke

Um den Einfluss der beiden Cysteine auf die Kinaseaktivität zu untersuchen, wurden *in vitro* Kinase Assays unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Aktivierung der WT Kinase durch NCA und CXL-1020 führte zur Ausbildung einer Inter- und Intradisulfidbrücke und zur erhöhten Substratphosphorylierung, welche in allen Mutanten C117S, C195S und C117/195S signifikant reduziert war. Auch die Ausbildung einer Intradisulfidbrücke war in allen Mutanten nicht möglich. Damit konnte nachgewiesen werden, dass *in vitro* sowohl C117 als auch C195 entscheidend sind für die HNO-induzierte oxidative Aktivierung der Kinase. Die Ergebnisse der NCA-vermittelten Effekte auf die WT und C117/195S PKG1 α Aktivität stimmen mit den bereits veröffentlichten Daten von Donzelli et al. überein (Donzelli et al. 2017), während die Daten bezüglich der Aktivität der Einzelmutanten (C117S, C195S) und der CXL-1020 Stimulation in dieser Doktorarbeit erstmalig generiert wurden. Ein Nachweis der nicht vorhandenen Intradisulfidbrücke in den Zelllinien, die die Einzel- und Doppelmutante stabil exprimieren, wurde ebenfalls von Donzelli et al. beschrieben.

Der *in vitro* Kinase Assay wurde in HEK293 Zellen nach Transfektion mit Vollängen-Konstrukten kodierend für die humane WT und die Mutanten C117S, C195S und C117/195S PKG1 α durchgeführt. Intakte Zellen wurden dafür mit HNO-Donoren stimuliert und Zellysate im Anschluss generiert. Die Ergebnisse des Experiments für alle mutierten Kinasen sind signifikant unterschiedlich vom WT. Dagegen ergaben die Ergebnisse für alle Einzelmutanten in Gefäßen keine signifikanten Unterschiede (Kap. 4.3). Die Ergebnisse sind vermutlich beeinflusst durch das Redoxpotenzial der Zellen. In der WT Zelllinie kommt es während der HNO-vermittelten Stimulation und der daraus resultierenden Oxidation zur Ausbildung einer Intradisulfidbrücke zwischen C117 und C195. In mutierten Zelllinien werden dagegen nur

einzelne Cysteine oxidiert. Wenn Zelllysate hergestellt werden, bleibt vermutlich nur die Intradisulfidbrücke intakt. Die Oxidation der einzelnen Cysteine könnte dagegen instabil sein und wird bei der Herstellung der Lysate nicht mehr durch das Redoxpotenzial der Zelle aufrechterhalten. Dadurch kann das Fehlen einzelner Cysteine zumindest unter *in vitro* Bedingungen durch die Oxidation nicht kompensiert werden. In intakten Gefäßen dagegen könnten die Einzelmutanten durch verschiedene Mechanismen, die später diskutiert werden, kompensiert werden.

4.3 HNO-vermittelte Effekte in Prkg1-C117 und Prkg1-C195S KI-Mäusen

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der HNO-induzierten Intradisulfidbrücke und des individuellen Beitrags der Cysteine 117 und 195 *in* und *ex vivo* wurden von Dr. Borys Skryabin mittels CRISPR/Cas9 Technologie durch Austausch einzelner Nukleotide drei neue KI-Mausmodelle generiert. Bei diesen Mäusen wurden C117, C195 oder beide Cysteine gleichzeitig zum nicht-oxidierbaren Serin (Prkg1-C117S, Prkg1-C195S, Prkg1-C117/195S) ausgetauscht.

Während die in dieser Arbeit generierten Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäuse keine Auffälligkeiten der inneren Organe inklusive des Darms und bezüglich ihrer Lebenserwartung im Vergleich zu ihren WT Geschwistertieren zeigten, hatten die vorher publizierten Prkg1-C195S KI-Mäuse eine erhöhte Mortalitätsrate und einen vergrößerten Blinddarm (Kamynina et al. 2022). In beiden Mauslinien konnten dabei keine Unterschiede in der PKGI α Expression in verschiedenen Organen zwischen Mutante- und WT-Tieren detektiert werden. Ein möglicher Grund für die Unterschiede der beiden Mauslinien könnten die verschiedenen Methoden der Mausgenerierung sein. In dieser Arbeit ermöglichte die CRISPR/Cas9 Technologie die Generierung der gewünschten Mauslinie durch den Austausch einer einzelnen Nukleotidbase des C117 bzw. C195 kodierenden Triplets. Bei den klassisch hergestellten Prkg1-C195 KI-Mäusen (Kamynina et al. 2022) wurde dafür stattdessen eine homologe Rekombination durchgeführt. Dabei werden in der Regel größere Teile der Intronsequenzen in ihrer Nukleotidsequenz modifiziert. Obwohl diese Modifikationen keine zusätzliche, außer der gewünschten Veränderung der Exon-Sequenz hervorrufen sollten, können in einzelnen Fällen bestimmte Mechanismen der Genregulation bzw. Expression anderer Gene über die Veränderungen in Intronsequenzen durch Modifikation regulatorischer Elemente und microRNAs beeinflusst werden (Kuhnert et al. 2008, Rappaport und Johnson 2014).

Um die physiologischen Konsequenzen der HNO-Donor-vermittelten Oxidation der beteiligten Cysteine auf die Vasorelaxation in intakten Gefäßen zu untersuchen, wurden Abschnitte frisch isolierter Femoralarterien der KI-Mäuse Prkg1-C117S und Prkg1-C195S sowie von deren WT Geschwistertieren im Organbad myographisch untersucht. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen *in vitro* Experimenten waren die Effekte der einzelnen Mutationen C117S und C195S hinsichtlich Vasorelaxation in Femoralarterien der neu generierten KI-Mäuse komplett kompensiert. Vermutlich kann das verbliebene nicht mutierte Cystein, besonders *in vivo* effektiv oxidiert werden und trägt somit zur Kinaseaktivierung bei. Dies ist in Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten Arbeiten an der Prkg1-C195S Maus (Kamynina et al. 2022) (Kamynina et al. 2022). Die Kompensierung der einzelnen Cysteine kann entweder durch eine direkte Oxidation von C117 (Sheehe et al. 2018) oder durch eine kombinierte Einwirkung von Oxidation und cGMP und daraus resultierende S-Guanylierung von C195 (Akashi et al. 2016) erfolgen. Beide Modifikationen können zu einer aktivatorischen Konformationsänderung der Kinase beitragen. Diese scheinen insbesondere *in vivo* effektiv durch optimale Redox-Bedingungen zu wirken, die möglicherweise in lebenden Zellen intakter Gefäße vorliegen.

Zur Analyse der Aktivität von PKGI α -WT bzw. PKGI α -C117S und PKGI α -C195S Mutanten erfolgte die Messung der endogenen VASP-Phosphorylierung in primären aortalen VSMCs nach HNO-Stimulation. CXL-1020 Effekte wiesen dabei, ähnlich zu den funktionellen Messungen in *Arteria femoralis* Gefäßen keine signifikanten Unterschiede zwischen den C117S bzw. C195S im Vergleich zu WT VSMCs auf. Dagegen war nur die NCA-induzierte VASP Phosphorylierung bei der C195S Mutante signifikant vermindert, was gegebenenfalls mit einer geringerer Probenzahl in Kombination mit hoher biologischer Variabilität zu tun haben könnte.

Nach Auswertung und Analyse der *in vitro* und *in vivo* Experimente kristallisiert sich ein folgender möglicher Zusammenhang heraus: **Je einfacher das System, desto weniger gut können die einzelnen Cystein-Mutationen kompensiert werden.** Folgende Möglichkeiten könnten diese Annahme erklären:

- In einem intakten Gefäß könnte durch das Vorhandensein mehrerer Zelltypen inklusive Endothelzellen die endogene Aktivität des NO/cGMP Systems viel höher sein als in isolierten VSMCs oder HEK293-Zellen in Kultur. Bei der Herstellung von Zelllysaten für *in vitro* Kinase Assays oder für FRET-Messungen wird das vorhandene cGMP der Zellen herausgewaschen bzw. kein cGMP zusätzlich hinzugefügt. Dadurch sinkt die Konzentration an cGMP in Zelllysaten im Vergleich zu intakten Zellen enorm. Intakte

Gefäße sowie die isolierten VSMCs exprimieren vermutlich im Vergleich zu HEK293-Zellen mehr sGC. Durch zusätzliche ODQ Applikation nehmen die cGMP Konzentrationen in HEK293-Zellen umso stärker ab. Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit zur oxidativen Bildung von 8-Nitro-cGMP und somit S-Guanylierung am verbleibenden C195.

- Es könnten in physiologisch intakten Geweben, Gefäßen und Tieren andere Redox-Gleichgewichte herrschen als in isolierten Zellen. Diese tragen möglicherweise zu einer veränderten Wirkung der Oxidantien bei. Unterschiedliche Redox-Potentiale konnten wie zuvor beschrieben mittels Redox Biosensoren in kardialen Fibroblasten und Herzmuskelzellen (isoliert vs. im intakten künstlichen Herzgewebe) (Trautsch et al. 2019) bzw. in verschiedenen Drosophila Organen *in vivo* (Albrecht et al. 2011) nachgewiesen werden.
- Auf subzellulärer Ebene weisen verschiedene Zelltypen eine komplexe Organisation der Komponenten von Signaltransduktionskaskaden auf. In den subzellulären Kompartimenten werden diese in räumlicher Nähe zueinander lokalisiert. Dazu gehören z.B. Rezeptoren, Zyklasen, Kinasen und Phosphatasen mit ihren Substraten. Es ist bekannt, dass diverse Kompartimente bzw. Organellen unterschiedliche Redox-Potentiale oder Gradienten aufweisen (Dooley et al. 2004, Swain et al. 2016). Dies ist entscheidend für die Effizienz der oxidativen Reaktionen in verschiedenen Teilen der Zellen und könnten somit zwischen *in* und *ex cellulo* stark unterschiedlich sein bzw. unterschiedliche Auswirkung auf die komplexen Zellvorgänge haben.

4.4 Charakterisierung der Prkg1-C117/195S KI-Mäuse

Das Prkg1-C117/195S KI-Mausmodell enthält sowohl die C195S Mutation im Exon 4, als auch zusätzlich die in homozygoten Embryonen dieser Mäuse eingeführte Punktmutation C117S im Exon 2 des *Prkg1* Gens. Die Einführung der beiden Mutationen war kompliziert und zeitintensiv, da die Einführung der zweiten Mutation mittels CRISPR/Cas9 Technologie zuvor der Generierung der Einzelmutante bedurfte. Deshalb konnte erst seit Kurzem mit der phänotypischen Charakterisierung dieses Mausmodells begonnen werden.

Zudem war die Zucht dieser Mauslinie durch die hohe Mortalitätsrate geprägt. Die homozygoten Prkg1-C117/195S Mäuse starben direkt nach der Geburt oder spontan im Alter von 3-4 Wochen vor Erreichen des Reproduktionsalters. Bei der Autopsie zeigten sie

vergrößerte Darmbereiche des Ileums und Jejunums. Interessanterweise konnte dies bereits zuvor in PKGI- (Schlossmann et al. 2005, Föller et al. 2008) und sGC-KO Mäusen (Friebe et al. 2007) beschrieben werden. Der Phänotyp dieser beiden Mausmodelle ist auf die gestörte Darmmotilität und die Koordination von Relaxation und Kontraktilität intestinaler glatter Muskelzellen zurückzuführen, welche ebenfalls durch die sGC/cGMP Kaskade reguliert werden. Weiterhin hatten die Prkg1-C117/195S KI-Mäuse, ähnlich zu PKGI-KO Tieren, eine ausgeprägte Splenomegalie. Föller et al. konnten die Splenomegalie der PKGI-KO Mäuse mit beschleunigter Apoptose der Erythrozyten in Verbindung bringen (Föller et al. 2008). Mit Hilfe einer speziellen und rohfasernarmen Diät unter Zusatz von Esomeprazol und Natriumbicarbonat, die ebenfalls bei PKGI- und sGC-KO Mäusen eingesetzt wird, um das Überleben der Tiere zu erreichen, konnten die oben aufgeführten Symptome und die Lebenserwartung der Prkg1-C117/195S Mäuse ebenfalls verbessert bzw. verlängert werden.

Nach erfolgreicher Etablierung der Zucht der Prkg1-C117/195S KI-Mauslinie konnten aus Zeitgründen nur wenige funktionelle Experimente für diese Arbeit durchgeführt werden. Eines dieser Experimente bestand in der Untersuchung der HNO-induzierten VASP-Phosphorylierung durch PKGI α in primären aortalen VSMCs. Die Mutante PKGI α -C117/195S wies dabei nach NCA bzw. CXL-1020 Stimulation und ODQ Vorinkubation eine signifikant reduzierte Kinaseaktivität im Vergleich zur korrespondierenden WT Kinase auf. Daher scheint die oxidative Aktivierung der doppelmutierten Kinase durch HNO aufgehoben zu sein, da in der Doppelmutante keine oxidativ induzierte Intradisulfidbrücke ausgebildet werden kann. Die Beeinträchtigung der HNO-induzierten VASP-Phosphorylierung durch die PKGI α -C117/195S Kinase war im Vergleich zu den Einzelmutanten insgesamt stärker ausgeprägt. Durch verschiedene Mechanismen, die bereits in Kap. 4.3 diskutiert worden sind, konnten in den Einzelmutanten vermutlich die Effekte der einzelnen mutierten Cysteine kompensiert werden, während dies durch das Fehlen beider Cysteine in der Doppelmutante nicht mehr erfolgen kann.

Die PKGI α Expression in allen Mutanten in verschiedenen Organen bzw. in isolierten aortalen VSMCs war vergleichbar mit der Kinaseexpression in den WT Geschwistertieren, sodass der Phänotyp der Prkg1-C117/195S Mäuse nicht mit der Menge der Kinase erklärt werden kann, sondern auf die Aktivierbarkeit durch Oxidanzien zurückzuführen ist, welche eine Intradisulfidbrückenbildung zwischen Cysteinen 117 und 195 induzieren können.

Jedoch könnte kritisch argumentiert werden, dass der beobachtete Phänotyp auf die gestörte cGMP-abhängige Funktion der Kinase, die einen KO-ähnlichen Effekt haben könnte,

zurückzuführen ist. Daher wurden die cGMP-abhängige Aktivierung und die cGMP Affinität der rekombinanten C117/195S Kinase im Vergleich zu WT PKGI α mit unterschiedlichen Aktivitätsassays (Cook-Assay, *in vitro* Kinase Assay) charakterisiert. Hierfür wurden humane rekombinant exprimierte und aufgereinigte Vollängen WT und Doppelmutante Kinase hergestellt. Die beiden Kinasen wurden bezüglich der Aktivierung durch cGMP miteinander verglichen. Hier konnte ein k_{Akt} -Wert von 30 ± 3 nM für hPKGI α -WT und 71 ± 2 nM für hPKGI α -C117/195S ermittelt werden, gemessen mit VASPtide als Substrat. Dabei betrug die Maximalaktivität von hPKGI α -WT 13,7 U/mg und von hPKGI α -C117/195S 12,0 U/mg. Der k_{Akt} -Wert der Mutante liegt somit um das 2,4-fache höher und die Maximalaktivität um das 1,1-fache geringer im Vergleich zur WT-Kinase.

Sharma et al. (Sharma et al. 2022) konnten in ihren Experimenten einen k_{Akt} -Wert von 41 ± 4 nM für hPKGI α -WT messen. Dieser Wert liegt somit um das 1,4-fache höher als der Wert, der im Zuge dieser Arbeit ermittelt wurde. Die Unterschiede könnten mit der Aufreinigungsprozedur der Kinasen, dem Puffer oder der Sensitivität der verwendeten Assays erklärt werden. Hier wird jedoch vielmehr ein direkter Vergleich zwischen WT und Mutante, die zeitgleich prozessiert wurden, angestrebt, um zu untersuchen, wie sich das Fehlen der Intradisulfidbrücke auf die Aktivität der Kinase auswirkt. Da die Proteinpräparation in dieser Arbeit einmalig erfolgte, wäre es sinnvoll, diese Aufreinigung noch mehrmals parallel für WT und Mutante zu wiederholen, um zuverlässige und statistisch auswertbare Daten zu erhalten.

In der Publikation von Kalyanaraman et al. wurden ebenfalls *in vitro* Kinase Assays mit einer C42S mutierten Kinase, die keine Interdisulfidbrücke ausbilden kann, durchgeführt (Kalyanaraman et al. 2017). Obwohl diese Kinase einen 5-fach höheren k_{Akt} -Wert hatte, ($373,0 \pm 17,3$ vs. $74,8 \pm 3,3$ nM für C42S vs. WT Kinase, gemessen mit Glasstide als Substrat), wiesen die C42S KI-Mäuse keinen gastrointestinalen Phänotyp auf (Burgoyne et al. 2007). Damit wird die mögliche kritische Argumentation, dass der dramatische Phänotyp der Prkg1-C117/195S KI-Mäuse auf die gestörte cGMP-abhängige Aktivierbarkeit der mutierten Kinase zurückzuführen ist, nicht bestätigt. Vielmehr wird die Hypothese bekräftigt, dass die oxidativ induzierte Intradisulfidbrückenbildung für die Kinasefunktion entscheidend ist. In diesem Zusammenhang erscheint plausibel, dass sowohl die oxidative Aktivierung der Kinase und die daraus resultierende Bildung der Intradisulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen C117 und C195, insbesondere unter physiologischen Bedingungen *in vivo*, als auch die cGMP-abhängige Aktivierbarkeit unersetzlich sind, für die physiologische Funktion der Kinase.

Dagegen lassen sich die einzelnen mutierten Cysteine durch bereits erwähnte Mechanismen kompensieren.

Eine weitere interessante Beobachtung in diesen Assays war auch, dass bei NCA-Vorstimulation der WT Kinase eine geringere Antwort auf cGMP (Δ spez. Aktivität hPKGI α -WT mit NCA: 11,3 U/mg vs. ohne NCA: 13,7 U/mg) gemessen werden konnte. Dabei war die basale Aktivität der NCA stimulierten WT, aber nicht die der C117/195S Kinase signifikant höher. Diese Beobachtungen bestätigen die Daten von Donzelli et al. (Donzelli et al. 2017) und sprechen für eine aktivierende NCA-induzierte Intradisulfidbrückenbildung.

4.5 Ausblick

Weitere wichtige Experimente sollten mit den *Prkg1*-C117/195S KI-Mäusen in der Zukunft durchgeführt werden. Da die Funktion von glatten Muskelzellen sowohl im Gefäß als auch im Darm durch PKG α reguliert wird, wäre es sinnvoll, den Einfluss der Mutation C117/195S in der Kinase und dadurch das Fehlen der oxidativ induzierten Intradisulfidbrücke auf die Vasorelaxation, die Blutdruckregulation und die Darmperistaltik zu untersuchen. Daher sollte zunächst die Vasorelaxation der *Arteria femoralis*, ebenfalls wie bei den Einzelmutanten in dieser Arbeit gezeigt, myographisch untersucht werden. Im Gegensatz zu den Einzelmutanten könnten sich hier signifikante Unterschiede in der CXL-1020 induzierten Vasorelaxation zwischen WT und C117/195S Arterien ergeben.

In vivo Untersuchungen der Vasorelaxation im präparierten Mesenterium einer lebenden Maus könnten genauso aufschlussreich sein. Blutdruckmessungen in lebenden Tieren sollten auch unter physiologischen und pathophysiologischen (z.B. Angiotensin II Infusionsmodell) Bedingungen erfolgen. Um den Effekt der HNO-Stimulation in Echtzeit zu verfolgen, kann hierfür CXL-1020 im Vergleich zu Vehikel, sowohl in normo- als auch in hypertensive Tiere infundiert werden (Kamynina et al. 2022). Es könnten auch hier signifikante Unterschiede zwischen WT und KI Tieren erwartet werden.

Interessanterweise haben PKGI-KO Mäuse nur im sehr jungen Alter von 4-5 Wochen eine Hypertonie, während diese ab der 7.-8. Lebenswoche durch andere Mechanismen kompensiert wird (Schlossmann et al. 2005). Einer dieser Mechanismen könnte EDHF sein. Da HNO als ein Teil des EDHFs identifiziert wurde (Andrews et al. 2009), wäre hier die Rolle der Intradisulfidbrücke sehr spannend zu untersuchen. Es ist durchaus möglich, dass diese Kompensation in PKGI KO- vs. C117/195S KI-Mäusen unterschiedlich verläuft bzw. in letzteren teilweise oder komplett aufgehoben sein könnte.

Eine gestörte Darmperistaltik gehört neben verminderter Vasorelaxation zu den klassischen Symptomen der PKGI KO-Mäuse (Pfeifer et al. 1998). Darmpassage und Funktion der intestinalen glatten Muskelzellen sollten auch in C117/195S KI-Mäusen genau untersucht werden. Da es Diskrepanzen zwischen den Darm-Phänotypen der in dieser Arbeit generierten C195S und dem klassisch hergestellten C195S KI-Mausmodell gab, könnte es sinnvoll sein, eine mit CRISPR/Cas9 System generierte PKGI KO-Mauslinie als Kontrolle zu haben. Diese könnte durch eine einzelne Frame-Shift-Mutation in den Exon-Sequenzen des *Prkg1* Gens

erzeugt werden und sehr hilfreich sein, um mögliche Effekte von Intronsequenzen des Gens auszuschließen und alle Mausmodelle im gleichen genetischen System zu vergleichen.

5 Zusammenfassung

Die systemische arterielle Hypertonie ist eine weltweit verbreitete kardiovaskuläre Erkrankung, die zu Organschäden und Schlaganfall bzw. Herzinsuffizienz mit Todesfolge führen kann. Trotz vielfältiger Kombinationstherapien wird nach neuen Medikamenten gesucht, die selbst in therapierefraktären Patient*innen effektiv den Blutdruck senken können. Eine vielversprechende therapeutische Alternative zu den verfügbaren Medikamenten, wie Stickstoffmonoxid (NO)-Donoren oder anderen Vasodilatoren, könnte Nitroxyl (HNO) sein. HNO ist die ein-Elektron-reduzierte und protonierte Form von NO, welche eine vasorelaxierende und positive inotrope Wirkung zeigt, jedoch ohne eine Toleranzentwicklung auszulösen. Die HNO-induzierten oxidativen Modifikationen in der cGMP-abhängigen Proteinkinase α (PKG α) und die daraus resultierende Intradisulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen 117 und 195 in der hochaffinen cGMP-Bindedomäne wurden als ein wichtiger Mechanismus für die Regulation der Kinase unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen postuliert. Der individuelle Beitrag der beiden Cysteine ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die HNO-induzierte Intradisulfidbrückenbildung und den individuellen Beitrag der Cysteine 117 und 195 sowie ihre funktionelle Relevanz zu charakterisieren.

Dies wurde mit verschiedenen Verfahren untersucht: (i) PKG α -basierte Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Biosensoren für cGMP-Bindung und Konformationsänderung; (ii) *In vitro* Kinase Assays; (iii) Messungen der VASP Phosphorylierung in isolierten aortalen vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) (iv) Vasorelaxationsmessungen der Arteria femoralis in neu generierten Knockin (KI)-Mausmodellen. Hierzu wurden mittels molekularer Klonierung FRET-Sensoren und mittels CRISPR/Cas9 Technologie drei neue Mauslinien hergestellt, bei denen das Cystein 117 oder 195 bzw. beide gleichzeitig zu nicht oxidierbarem Serin (C117S, C195S, C117/195S) ausgetauscht wurden. Der experimentelle HNO-Donor 1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA) und der klinisch relevante Donor CXL-1020 wurden dabei zur Stimulation der Zellen und Gefäße eingesetzt. Beide HNO-Donoren induzierten in FRET-Experimenten eine aktivatorische Oxidation der löslichen Guanylylcyclase (sGC), die durch den prototypischen sGC Inhibitor 1H-(1,2,4)-Oxadiazolo-(4,3-a)-chinoxalin-1-on (ODQ) aufgehoben werden konnte. Die direkte Oxidation durch HNO in Gegenwart von ODQ führte vergleichbar wie die cGMP-Bindung zu einer Konformationsänderung der Sensoren. Dabei

waren die FRET-Effekte in allen Mutanten, außer nach NCA Stimulation bei C195S, signifikant reduziert. Obwohl die *in vitro* Kinase Assays eine gleichermaßen reduzierte PKGI α Aktivität aufgrund der fehlenden Intradisulfidbrückenbildung in allen Mutanten zeigten, waren die CXL-1020 stimulierte VASP Phosphorylierung in aortalen VSMCs und Vasorelaxation der Arteria femoralis isoliert aus den Prkg1-C117S und Prkg1-C195S KI-Mäusen unauffällig. Hingegen zeigten Prkg1-C117/195S Mäuse neben einer ausgeprägten Splenomagalie und einem dramatischen gastrointestinalen Phänotyp eine signifikant verminderte NCA und CXL-1020 induzierte VASP-Phosphorylierung. Beide Cysteine 117 und 195 sind daher unentbehrlich für die oxidativ induzierte und aktivatorische Intradisulfidbrückenbildung, wogegen einzeln mutierte Cysteine durch unterschiedliche Mechanismen kompensiert werden können. Die oxidative Aktivierung ist somit neben der klassischen cGMP-abhängigen Aktivierung ein wichtiger und unverzichtbarer Prozess für die physiologische Funktion der PKGI α *in vivo*.

5.1 Abstract

Systemic arterial hypertension is a worldwide prevalent cardiovascular disease that can lead to organ damage, stroke or heart failure with fatal consequences. Despite a variety of combination therapies, new drugs are needed that can effectively lower blood pressure even in therapy-resistant patients. A promising therapeutic alternative to the existing drug regime, such as nitric oxide (NO) donors or other vasodilators, could be nitroxyl (HNO). HNO is the one-electron reduced and protonated form of NO, which shows vasorelaxing and positive inotropic effects without tolerance development. The HNO-induced oxidative modifications in cGMP-dependent protein kinase α (PKG α) and the resulting intradisulfide bridge formation between the cysteines 117 and 195 in the high-affinity cGMP-binding domain have been postulated as an important mechanism for the regulation of the kinase under physiological and pathophysiological conditions. However, the individual contribution of the two cysteines is not fully understood. The aim of this study was to characterize the HNO-induced intradisulfide bridge formation and the individual contribution of cysteines 117 and 195 as well as their functional relevance.

This was investigated using a variety of methods: (i) PKG α -based Förster resonance energy transfer (FRET) biosensors for cGMP binding that allow monitoring of conformational changes; (ii) *In vitro* kinase assays; (iii) Measurements of VASP phosphorylation in isolated aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs); (iv) Vasorelaxation measurements of the femoral artery in newly generated knockin (KI) mouse models. To do so, FRET sensors were generated by molecular cloning and three novel mouse lines were produced using CRISPR/Cas9 technology, in which cysteine 117 or 195, or both, were simultaneously exchanged for non-oxidizable serine (C117S, C195S, C117/195S). The experimental HNO donor 1-nitrosocyclohexylacetate (NCA) and the clinically relevant donor CXL-1020 were used to stimulate the cells and vessels. Both HNO donors induced an activating oxidation of soluble guanylyl cyclase (sGC) in FRET experiments, which could be abolished by the prototypical sGC inhibitor 1H-(1,2,4)-Oxadiazolo-(4,3-a)-quinoxaline-1-on (ODQ). Direct oxidation by HNO in the presence of ODQ led to a conformational change of the sensors, similar to cGMP binding. The FRET effects were significantly reduced in all mutants, except after NCA stimulation in C195S. Although the *in vitro* kinase assays showed a similarly reduced PKG α activity in all mutants due to the lack of intradisulfide bridge formation, CXL-1020-induced VASP phosphorylation in aortic VSMCs and vasorelaxation of the femoral artery isolated from

the Prkg1-C117S and Prkg1-C195S KI mice were not affected. In contrast, Prkg1-C117/195S mice showed, in addition to pronounced splenomegaly and a dramatic gastrointestinal phenotype, a significantly reduced NCA and CXL-1020-induced VASP phosphorylation. We conclude that both cysteines, 117 and 195 are essential for the oxidatively induced and activating intradisulfide bridge formation, whereas single-mutated cysteines can be compensated by different mechanisms. Thus, oxidative activation, in addition to the classical cGMP-dependent activation is an important and indispensable process for the physiological functions of PKG α *in vivo*.

6 Literaturverzeichnis

- Akashi S, Ahmed KA, Sawa T, Ono K, Tsutsuki H, Burgoyne JR, Ida T, Horio E, Pryszyzhna O, Oike Y, Rahaman MM, Eaton P, Fujii S, Akaike T (2016). "Persistent Activation of cGMP-Dependent Protein Kinase by a Nitrated Cyclic Nucleotide via Site Specific Protein S-Guanylation." *Biochemistry* **55**(5): 751-761.
- Albrecht SC, Barata AG, Grosshans J, Teleman AA, Dick TP (2011). "In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis." *Cell Metab* **14**(6): 819-829.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L (1998). "The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo." *J Biol Chem* **273**(49): 32950-32956.
- Alverdi V, Mazon H, Versluis C, Hemrika W, Esposito G, van den Heuvel R, Scholten A, Heck AJ (2008). "cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain." *J Mol Biol* **375**(5): 1380-1393.
- Andrews KL, Irvine JC, Tare M, Apostolopoulos J, Favaloro JL, Triggle CR, Kemp-Harper BK (2009). "A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries." *Br J Pharmacol* **157**(4): 540-550.
- Andrews KL, Lumsden NG, Farry J, Jefferis AM, Kemp-Harper BK, Chin-Dusting JP (2015). "Nitroxyl: a vasodilator of human vessels that is not susceptible to tolerance." *Clin Sci (Lond)* **129**(2): 179-187.
- Arencibia JM, Pastor-Flores D, Bauer AF, Schulze JO, Biondi RM (2013). "AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases." *Biochim Biophys Acta* **1834**(7): 1302-1321.
- Bauersachs J, Schäfer A (2005). "Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio--a clue to eNOS uncoupling in diabetes?" *Cardiovasc Res* **65**(4): 768-769.
- Benz PM, Fromel T, Laban H, Zink J, Ulrich L, Groneberg D, Boon RA, Poley P, Renne T, de Wit C, Fleming I (2023). "Cardiovascular Functions of Ena/VASP Proteins: Past, Present and Beyond." *Cells* **12**(13).
- Bindoli A, Fukuto JM, Forman HJ (2008). "Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling." *Antioxid Redox Signal* **10**(9): 1549-1564.
- Boettcher M, de Wit C (2011). "Distinct endothelium-derived hyperpolarizing factors emerge in vitro and in vivo and are mediated in part via connexin 40-dependent myoendothelial coupling." *Hypertension* **57**(4): 802-808.
- Bradford MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bullen ML, Miller AA, Dharmarajah J, Drummond GR, Sobey CG, Kemp-Harper BK (2011). "Vasorelaxant and antiaggregatory actions of the nitroxyl donor isopropylamine NONOate are maintained in hypercholesterolemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(4): H1405-1414.

- Burgoyne JR, Eaton P (2009). "Transnitrosylating nitric oxide species directly activate type I protein kinase A, providing a novel adenylate cyclase-independent cross-talk to beta-adrenergic-like signaling." *J Biol Chem* **284**(43): 29260-29268.
- Burgoyne JR, Eaton P (2010). "Oxidant sensing by protein kinases a and g enables integration of cell redox state with phosphoregulation." *Sensors (Basel)* **10**(4): 2731-2751.
- Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, Charles RL, Brennan JP, Schröder E, Browning DD, Eaton P (2007). "Cysteine redox sensor in PKGI α enables oxidant-induced activation." *Science* **317**(5843): 1393-1397.
- Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM (2012a). "Redox signaling in cardiac physiology and pathology." *Circ Res* **111**(8): 1091-1106.
- Burgoyne JR, Pryszazhna O, Rudyk O, Eaton P (2012b). "cGMP-dependent activation of protein kinase G precludes disulfide activation: implications for blood pressure control." *Hypertension* **60**(5): 1301-1308.
- Cai S, Khoo J, Channon KM (2005). "Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells." *Cardiovasc Res* **65**(4): 823-831.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS (2002). "Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8306-8311.
- Chu DM, Corbin JD, Grimes KA, Francis SH (1997). "Activation by cyclic GMP binding causes an apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **272**(50): 31922-31928.
- Cook PF, Neville ME, Jr., Vrana KE, Hartl FT, Roskoski R, Jr. (1982). "Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit." *Biochemistry* **21**(23): 5794-5799.
- Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM (1991). "Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells." *Mol Pharmacol* **40**(6): 923-931.
- Cowart DW, Ventuti R, Guptill J, Noveck R, Foo S (2015). "A phase 1 study of the safety and pharmacokinetics of the intravenous nitroxyl prodrug, CXL-1427." *J Am Coll Cardiol* **65**(10 Suppl): A876.
- Crawford JH, Chacko BK, Pruitt HM, Pikhova B, Hogg N, Patel RP (2004). "Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease." *Blood* **104**(5): 1375-1382.
- Cuello F, Eaton P (2019). "Cysteine-Based Redox Sensing and Its Role in Signaling by Cyclic Nucleotide-Dependent Kinases in the Cardiovascular System." *Annu Rev Physiol* **81**: 63-87.
- Czernichow S, Bertrais S, Blacher J, Galan P, Briançon S, Favier A, Safar M, Hercberg S (2005). "Effect of supplementation with antioxidants upon long-term risk of hypertension in the SU.VI.MAX study: association with plasma antioxidant levels." *J Hypertens* **23**(11): 2013-2018.
- D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, Laviola L, Giorgino F (2020). "The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor." *Oxid Med Cell Longev* **2020**: 5732956.
- DeMaster EG, Quast BJ, Redfern B, Nagasawa HT (1995). "Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide." *Biochemistry* **34**(36): 11494-11499.

- Derbyshire ER, Marletta MA (2012). "Structure and regulation of soluble guanylate cyclase." *Annu Rev Biochem* **81**: 533-559.
- DeYulia GJ, Jr., Cárcamo JM, Bórquez-Ojeda O, Shelton CC, Golde DW (2005). "Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(14): 5044-5049.
- Diering S, Stathopoulou K, Goetz M, Rathjens L, Harder S, Piasecki A, Raabe J, Schulz S, Brandt M, Pflaumenbaum J, Fuchs U, Donzelli S, Sadayappan S, Nikolaev VO, Flenner F, Ehler E, Cuello F (2020). "Receptor-independent modulation of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphatase signaling in cardiac myocytes by oxidizing agents." *J Biol Chem* **295**(45): 15342-15365.
- Ding W, Li Z, Shen X, Martin J, King SB, Sivakumaran V, Paolucci N, Gao WD (2011). "Reversal of isoflurane-induced depression of myocardial contraction by nitroxyl via myofilament sensitization to Ca²⁺." *J Pharmacol Exp Ther* **339**(3): 825-831.
- Donzelli S, Fischer G, King BS, Niemann C, DuMond JF, Heeren J, Wieboldt H, Baldus S, Gerloff C, Eschenhagen T, Carrier L, Böger RH, Espey MG (2013). "Pharmacological characterization of 1-nitrosocyclohexyl acetate, a long-acting nitroxyl donor that shows vasorelaxant and antiaggregatory effects." *J Pharmacol Exp Ther* **344**(2): 339-347.
- Donzelli S, Goetz M, Schmidt K, Wolters M, Stathopoulou K, Diering S, Pryszazhna O, Polat V, Scotcher J, Dees C, Subramanian H, Butt E, Kamynina A, Schobesberger S, King SB, Nikolaev VO, de Wit C, Leichert LI, Feil R, Eaton P, Cuello F (2017). "Oxidant sensor in the cGMP-binding pocket of PKGI α regulates nitroxyl-mediated kinase activity." *Sci Rep* **7**(1): 9938.
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY (2004). "Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators." *J Biol Chem* **279**(21): 22284-22293.
- Doyle MP, Mahapatro SN, Broene RD, Guy JK (1988). "Oxidation and reduction of hemoproteins by trioxodinitrate (II). The role of nitrosyl hydride and nitrite." *Journal of the American Chemical Society* **110**(2): 593-599.
- Eaton P (2006). "Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures." *Free Radic Biol Med* **40**(11): 1889-1899.
- El-Armouche A, Wahab A, Wittköpper K, Schulze T, Böttcher F, Pohlmann L, King SB, DuMond JF, Gerloff C, Böger RH, Eschenhagen T, Carrier L, Donzelli S (2010). "The new HNO donor, 1-nitrosocyclohexyl acetate, increases contractile force in normal and β -adrenergically desensitized ventricular myocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **402**(2): 340-344.
- Esplugues JV, Rocha M, Nuñez C, Bosca I, Ibiza S, Herance JR, Ortega A, Serrador JM, D'Ocon P, Victor VM (2006). "Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants." *Circ Res* **99**(10): 1067-1075.
- Föllner M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F, Feil R (2008). "Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(18): 6771-6776.
- Förster T (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Annalen der Physik* **437**(1-2): 55-75.

- Förstermann U, Sessa WC (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *Eur Heart J* **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." *Pharmacol Rev* **62**(3): 525-563.
- Francis SH, Corbin JD (1994). "Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases." *Annu Rev Physiol* **56**: 237-272.
- Frantz S, Klaiber M, Baba HA, Oberwinkler H, Volker K, Gabetaner B, Bayer B, Abebetuer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M (2013). "Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I." *Eur Heart J* **34**(16): 1233-1244.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A, Koesling D (2007). "Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18): 7699-7704.
- Froehlich JP, Mahaney JE, Keceli G, Pavlos CM, Goldstein R, Redwood AJ, Sumbilla C, Lee DI, Tocchetti CG, Kass DA, Paolocci N, Toscano JP (2008). "Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl." *Biochemistry* **47**(50): 13150-13152.
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD (1999). "Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072." *J Biol Chem* **274**(16): 10927-10935.
- Fukuto JM, Jackson MI, Kaludercic N, Paolocci N (2008). "Examining nitroxyl in biological systems." *Methods Enzymol* **440**: 411-431.
- Gao WD, Murray CI, Tian Y, Zhong X, DuMond JF, Shen X, Stanley BA, Foster DB, Wink DA, King SB, Van Eyk JE, Paolocci N (2012). "Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofilament cysteines enhances contractile function." *Circ Res* **111**(8): 1002-1011.
- Geiselhöringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J (2004). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." *FEBS Lett* **575**(1-3): 19-22.
- Gewaltig MT, Kojda G (2002). "Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential." *Cardiovasc Res* **55**(2): 250-260.
- Gladwin MT (2006). "Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome." *J Clin Invest* **116**(9): 2330-2332.
- Greene SJ, Gheorghide M, Borlaug BA, Pieske B, Vaduganathan M, Burnett JC, Jr., Roessig L, Stasch JP, Solomon SD, Paulus WJ, Butler J (2013). "The cGMP signaling pathway as a therapeutic target in heart failure with preserved ejection fraction." *J Am Heart Assoc* **2**(6): e000536.
- Griendling KK, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Montezano AC, Touyz RM (2021). "Oxidative Stress and Hypertension." *Circ Res* **128**(7): 993-1020.
- Harrison DG, Gongora MC (2009). "Oxidative stress and hypertension." *Med Clin North Am* **93**(3): 621-635.
- Hengel FE, Benitah JP, Wenzel UO (2022). "Mosaic theory revised: inflammation and salt play central roles in arterial hypertension." *Cell Mol Immunol* **19**(5): 561-576.
- Hofmann F (2005). "The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases." *J Biol Chem* **280**(1): 1-4.

- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." *J Cell Sci* **113 (Pt 10)**: 1671-1676.
- Hofmann F, Wegener JW (2013). "cGMP-dependent protein kinases (cGK)." *Methods Mol Biol* **1020**: 17-50.
- Honda A, Adams SR, Sawyer CL, Lev-Ram V, Tsien RY, Dostmann WR (2001). "Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98(5)**: 2437-2442.
- Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F (2018). "Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases." *Vascul Pharmacol* **100**: 1-19.
- Irvine JC, Ritchie RH, Favalaro JL, Andrews KL, Widdop RE, Kemp-Harper BK (2008). "Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story." *Trends Pharmacol Sci* **29(12)**: 601-608.
- Jordan J, Birkenfeld AL, Melander O, Moro C (2018). "Natriuretic Peptides in Cardiovascular and Metabolic Crosstalk: Implications for Hypertension Management." *Hypertension* **72(2)**: 270-276.
- Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, Silver J (1997). "Nanoliter scale PCR with TaqMan detection." *Nucleic Acids Res* **25(10)**: 1999-2004.
- Kalyanaraman H, Zhuang S, Pilz RB, Casteel DE (2017). "The activity of cGMP-dependent protein kinase I α is not directly regulated by oxidation-induced disulfide formation at cysteine 43." *J Biol Chem* **292(20)**: 8262-8268.
- Kamynina A, Guttzeit S, Eaton P, Cuello F (2022). "Nitroxyl Donor CXL-1020 Lowers Blood Pressure by Targeting C195 in Cyclic Guanosine-3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase I." *Hypertension* **79(5)**: 946-956.
- Kelly TN, Sun X, He KY, Brown MR, Taliun SAG, Hellwege JN, Irvin MR, Mi X, Brody JA, Franceschini N, Guo X, Hwang SJ, de Vries PS, Gao Y, Moscati A, Nadkarni GN, Yanek LR, Elfassy T, Smith JA, Chung RH, Beitelshes AL, Patki A, Aslibekyan S, Blobner BM, Peralta JM, Assimes TL, Palmas WR, Liu C, Bress AP, Huang Z, Becker LC, Hwa CM, O'Connell JR, Carlson JC, Warren HR, Das S, Giri A, Martin LW, Craig Johnson W, Fox ER, Bottinger EP, Razavi AC, Vaidya D, Chuang LM, Chang YC, Naseri T, Jain D, Kang HM, Hung AM, Srinivasasainagendra V, Snively BM, Gu D, Montasser ME, Reupena MS, Heavner BD, LeFaive J, Hixson JE, Rice KM, Wang FF, Nielsen JB, Huang J, Khan AT, Zhou W, Nierenberg JL, Laurie CC, Armstrong ND, Shi M, Pan Y, Stilp AM, Emery L, Wong Q, Hawley NL, Minster RL, Curran JE, Munroe PB, Weeks DE, North KE, Tracy RP, Kenny EE, Shimbo D, Chakravarti A, Rich SS, Reiner AP, Blangero J, Redline S, Mitchell BD, Rao DC, Ida Chen YD, Kardia SLR, Kaplan RC, Mathias RA, He J, Psaty BM, Fornage M, Loos RJF, Correa A, Boerwinkle E, Rotter JI, Kooperberg C, Edwards TL, Abecasis GR, Zhu X, Levy D, Arnett DK, Morrison AC (2022). "Insights From a Large-Scale Whole-Genome Sequencing Study of Systolic Blood Pressure, Diastolic Blood Pressure, and Hypertension." *Hypertension* **79(8)**: 1656-1667.
- Kemp-Harper BK, Horowitz JD, Ritchie RH (2016). "Therapeutic Potential of Nitroxyl (HNO) Donors in the Management of Acute Decompensated Heart Failure." *Drugs* **76(14)**: 1337-1348.
- Kemp-Harper BK, Velagic A, Paolocci N, Horowitz JD, Ritchie RH (2021). "Cardiovascular Therapeutic Potential of the Redox Siblings, Nitric Oxide (NO \bullet) and Nitroxyl (HNO), in the Setting of Reactive Oxygen Species Dysregulation." *Handb Exp Pharmacol* **264**: 311-337.

- Kennelly PJ, Krebs EG (1991). "Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases." *J Biol Chem* **266**(24): 15555-15558.
- Kim HY, Suh PG, Kim JI (2021). "The Role of Phospholipase C in GABAergic Inhibition and Its Relevance to Epilepsy." *Int J Mol Sci* **22**(6).
- Kim MK, Sasaki S, Sasazuki S, Okubo S, Hayashi M, Tsugane S (2002). "Lack of long-term effect of vitamin C supplementation on blood pressure." *Hypertension* **40**(6): 797-803.
- Kim TK, Eberwine JH (2010). "Mammalian cell transfection: the present and the future." *Anal Bioanal Chem* **397**(8): 3173-3178.
- Kitazawa T, Gaylinn BD, Denney GH, Somlyo AP (1991). "G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation." *J Biol Chem* **266**(3): 1708-1715.
- Kobsar A, Koessler J, Kehrer L, Gambaryan S, Walter U (2012). "The thrombin inhibitors hirudin and Refludan(®) activate the soluble guanylyl cyclase and the cGMP pathway in washed human platelets." *Thromb Haemost* **107**(3): 521-529.
- Kohr MJ, Kaludercic N, Tocchetti CG, Dong Gao W, Kass DA, Janssen PM, Paolocci N, Ziolo MT (2010). "Nitroxyl enhances myocyte Ca²⁺ transients by exclusively targeting SR Ca²⁺-cycling." *Front Biosci (Elite Ed)* **2**(2): 614-626.
- Kovács Á, Alogna A, Post H, Hamdani N (2016). "Is enhancing cGMP-PKG signalling a promising therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction?" *Neth Heart J* **24**(4): 268-274.
- Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, Kuo CJ (2008). "Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126." *Development* **135**(24): 3989-3993.
- Kuwabara Y, Nishino T, Okamoto K, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T (2003). "Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8170-8175.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S (2003). "Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* **278**(25): 22546-22554.
- Lalli J, Harrer JM, Luo W, Kranias EG, Paul RJ (1997). "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with a marked decrease in sensitivity in aortic smooth muscle." *Circ Res* **80**(4): 506-513.
- Lalli MJ, Shimizu S, Sutliff RL, Kranias EG, Paul RJ (1999). "[Ca²⁺]_i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice." *Am J Physiol* **277**(3): H963-970.
- Lambeth JD (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." *Nat Rev Immunol* **4**(3): 181-189.
- Lancel S, Zhang J, Evangelista A, Trucillo MP, Tong X, Siwik DA, Cohen RA, Colucci WS (2009). "Nitroxyl activates SERCA in cardiac myocytes via glutathiolation of cysteine 674." *Circ Res* **104**(6): 720-723.
- Landgraf W, Regulla S, Meyer HE, Hofmann F (1991). "Oxidation of cysteines activates cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **266**(25): 16305-16311.

- Landsberg L (2001). "Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why)." *J Hypertens* **19**(3 Pt 2): 523-528.
- Laurent S, Agabiti-Rosei C, Bruno RM, Rizzoni D (2022). "Microcirculation and Macrocirculation in Hypertension: A Dangerous Cross-Link?" *Hypertension* **79**(3): 479-490.
- Li Q, Youn JY, Cai H (2015). "Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension." *J Hypertens* **33**(6): 1128-1136.
- Mancia G, Grassi G (2014). "The autonomic nervous system and hypertension." *Circ Res* **114**(11): 1804-1814.
- Mancia G, Kreutz R, Brunstrom M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, Muiesan ML, Tsioufis K, Agabiti-Rosei E, Algharably EAE, Azizi M, Benetos A, Borghi C, Hitij JB, Cifkova R, Coca A, Cornelissen V, Cruickshank K, Cunha PG, Danser AHJ, de Pinho RM, Delles C, Dominiczak AF, Dorobantu M, Dumas M, Fernandez-Alfonso MS, Halimi JM, Jarai Z, Jelakovic B, Jordan J, Kuznetsova T, Laurent S, Lovic D, Lurbe E, Mahfoud F, Manolis A, Miglinas M, Narkiewicz K, Niiranen T, Palatini P, Parati G, Pathak A, Persu A, Polonia J, Redon J, Sarafidis P, Schmieder R, Spronck B, Stabouli S, Stergiou G, Taddei S, Thomopoulos C, Tomaszewski M, Van de Borne P, Wanner C, Weber T, Williams B, Zhang ZY, Kjeldsen SE, Authors/Task Force M (2023). "2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension Endorsed by the European Renal Association (ERA) and the International Society of Hypertension (ISH)." *J Hypertens*.
- Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fässler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F (1999). "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." *J Exp Med* **189**(8): 1255-1264.
- Miller TW, Cherney MM, Lee AJ, Francoleon NE, Farmer PJ, King SB, Hobbs AJ, Miranda KM, Burstyn JN, Fukuto JM (2009). "The effects of nitroxyl (HNO) on soluble guanylate cyclase activity: interactions at ferrous heme and cysteine thiols." *J Biol Chem* **284**(33): 21788-21796.
- Miranda KM, Katori T, Torres de Holding CL, Thomas L, Ridnour LA, McLendon WJ, Cologna SM, Dutton AS, Champion HC, Mancardi D, Tocchetti CG, Saavedra JE, Keefer LK, Houk KN, Fukuto JM, Kass DA, Paolocci N, Wink DA (2005). "Comparison of the NO and HNO donating properties of diazeniumdiolates: primary amine adducts release HNO in Vivo." *J Med Chem* **48**(26): 8220-8228.
- Miranda KM, Paolocci N, Katori T, Thomas DD, Ford E, Bartberger MD, Espey MG, Kass DA, Feelisch M, Fukuto JM, Wink DA (2003). "A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9196-9201.
- Miranda KM, Yamada K, Espey MG, Thomas DD, DeGraff W, Mitchell JB, Krishna MC, Colton CA, Wink DA (2002). "Further evidence for distinct reactive intermediates from nitroxyl and peroxyxynitrite: effects of buffer composition on the chemistry of Angeli's salt and synthetic peroxyxynitrite." *Arch Biochem Biophys* **401**(2): 134-144.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014). "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury." *Antioxid Redox Signal* **20**(7): 1126-1167.
- Mohamed HA, Abdel-Aziz M, Abuo-Rahma Gel D, King SB (2015). "New acyloxy nitroso compounds with improved water solubility and nitroxyl (HNO) release kinetics and inhibitors of platelet aggregation." *Bioorg Med Chem* **23**(17): 6069-6077.

- Moltzau LR, Aronsen JM, Meier S, Nguyen CH, Hougen K, Orstavik O, Sjaastad I, Christensen G, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Qvigstad E (2013). "SERCA2 activity is involved in the CNP-mediated functional responses in failing rat myocardium." *Br J Pharmacol* **170**(2): 366-379.
- Monken CE, Gill GN (1980). "Structural analysis of cGMP-dependent protein kinase using limited proteolysis." *J Biol Chem* **255**(15): 7067-7070.
- Münzel T, Daiber A, Gori T (2011). "Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance." *Circulation* **123**(19): 2132-2144.
- Münzel T, Daiber A, Mülsch A (2005). "Explaining the phenomenon of nitrate tolerance." *Circ Res* **97**(7): 618-628.
- Nakamura T, Ranek MJ, Lee DI, Shalkey Hahn V, Kim C, Eaton P, Kass DA (2015). "Prevention of PKG1alpha oxidation augments cardioprotection in the stressed heart." *J Clin Invest* **125**(6): 2468-2472.
- Nikolaev VO, Gambaryan S, Lohse MJ (2006). "Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP." *Nat Methods* **3**(1): 23-25.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." *Nature* **404**(6779): 787-790.
- Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Hori H, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T (2005). "Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant." *J Biol Chem* **280**(26): 24888-24894.
- Obst M, Tank J, Plehm R, Blumer KJ, Diedrich A, Jordan J, Luft FC, Gross V (2006). "NO-dependent blood pressure regulation in RGS2-deficient mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**(4): R1012-1019.
- Olsen MH, Angell SY, Asma S, Boutouyrie P, Burger D, Chirinos JA, Damasceno A, Delles C, Gimenez-Roqueplo AP, Hering D, Lopez-Jaramillo P, Martinez F, Perkovic V, Rietzschel ER, Schillaci G, Schutte AE, Scuteri A, Sharman JE, Wachtell K, Wang JG (2016). "A call to action and a lifecourse strategy to address the global burden of raised blood pressure on current and future generations: the Lancet Commission on hypertension." *Lancet* **388**(10060): 2665-2712.
- Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifkova R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, Whelton PK (2018). "Hypertension." *Nat Rev Dis Primers* **4**: 18014.
- Orescanin ZS, Milovanović SR, Spasić SD, Jones DR, Spasić MB (2007). "Different responses of mesenteric artery from normotensive and spontaneously hypertensive rats to nitric oxide and its redox congeners." *Pharmacol Rep* **59**(3): 315-322.
- Osborne BW, Wu J, McFarland CJ, Nickl CK, Sankaran B, Casteel DE, Woods VL, Jr., Kornev AP, Taylor SS, Dostmann WR (2011). "Crystal structure of cGMP-dependent protein kinase reveals novel site of interchain communication." *Structure* **19**(9): 1317-1327.
- Osei-Owusu P, Sun X, Drenan RM, Steinberg TH, Blumer KJ (2007). "Regulation of RGS2 and second messenger signaling in vascular smooth muscle cells by cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **282**(43): 31656-31665.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* **87**(1): 315-424.

- Padmanabhan S, Dominiczak AF (2021). "Genomics of hypertension: the road to precision medicine." *Nat Rev Cardiol* **18**(4): 235-250.
- Paolocci N, Jackson MI, Lopez BE, Miranda K, Tocchetti CG, Wink DA, Hobbs AJ, Fukuto JM (2007). "The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO." *Pharmacol Ther* **113**(2): 442-458.
- Paolocci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA (2001). "Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10463-10468.
- Perrin BJ, Ervasti JM (2010). "The actin gene family: function follows isoform." *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**(10): 630-634.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszódi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, Hofmann F (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." *Embo j* **17**(11): 3045-3051.
- Pieske B, Butler J, Filippatos G, Lam C, Maggioni AP, Ponikowski P, Shah S, Solomon S, Kraigher-Krainer E, Samano ET, Scalise AV, Müller K, Roessig L, Gheorghiade M (2014). "Rationale and design of the SOLuble guanylate Cyclase stimulatOR in heArT failurE Studies (SOCRATES)." *Eur J Heart Fail* **16**(9): 1026-1038.
- Profirovic J, Gorovoy M, Niu J, Pavlovic S, Voyno-Yasenetskaya T (2005). "A novel mechanism of G protein-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein." *J Biol Chem* **280**(38): 32866-32876.
- Prysyazhna O, Eaton P (2015). "Redox regulation of cGMP-dependent protein kinase I α in the cardiovascular system." *Front Pharmacol* **6**: 139.
- Prysyazhna O, Rudyk O, Eaton P (2012). "Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension." *Nat Med* **18**(2): 286-290.
- Rappaport A, Johnson L (2014). "Genetically engineered knock-in and conditional knock-in mouse models of cancer." *Cold Spring Harb Protoc* **2014**(9): 897-911.
- Rodriguez EA, Campbell RE, Lin JY, Lin MZ, Miyawaki A, Palmer AE, Shu X, Zhang J, Tsien RY (2017). "The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins." *Trends Biochem Sci* **42**(2): 111-129.
- Roof SR, Ueyama Y, Mazhari R, Hamlin RL, Hartman JC, Ziolo MT, Reardon JE, Del Rio CL (2017). "CXL-1020, a Novel Nitroxyl (HNO) Prodrug, Is More Effective than Milrinone in Models of Diastolic Dysfunction-A Cardiovascular Therapeutic: An Efficacy and Safety Study in the Rat." *Front Physiol* **8**: 894.
- Roy B, Mo E, Vernon J, Garthwaite J (2008). "Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors." *Br J Pharmacol* **153**(7): 1495-1504.
- Rudyk O, Phinikaridou A, Prysyazhna O, Burgoyne JR, Botnar RM, Eaton P (2013). "Protein kinase G oxidation is a major cause of injury during sepsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(24): 9909-9913.
- Rudyk O, Prysyazhna O, Burgoyne JR, Eaton P (2012). "Nitroglycerin fails to lower blood pressure in redox-dead Cys42Ser PKG1 α knock-in mouse." *Circulation* **126**(3): 287-295.
- Russwurm M, Mullershausen F, Friebe A, Jager R, Russwurm C, Koesling D (2007). "Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach." *Biochem J* **407**(1): 69-77.

- Ruth P, Pfeifer A, Kamm S, Klatt P, Dostmann WR, Hofmann F (1997). "Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase I α ." *J Biol Chem* **272**(16): 10522-10528.
- Sabbah HN, Tocchetti CG, Wang M, Daya S, Gupta RC, Tunin RS, Mazhari R, Takimoto E, Paolucci N, Cowart D, Colucci WS, Kass DA (2013). "Nitroxyl (HNO): A novel approach for the acute treatment of heart failure." *Circ Heart Fail* **6**(6): 1250-1258.
- Sahoo H (2011). "Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications." *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **12**: 20-30.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G (2000). "Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle." *J Biol Chem* **275**(28): 21722-21729.
- Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P (2003). "RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation." *J Biol Chem* **278**(11): 9472-9480.
- Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, Akaike T (2007). "Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate." *Nat Chem Biol* **3**(11): 727-735.
- Sawada N, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K (2001). "cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(3): 798-805.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β ." *Nature* **404**(6774): 197-201.
- Schlossmann J, Feil R, Hofmann F (2003). "Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases." *Ann Med* **35**(1): 21-27.
- Schlossmann J, Feil R, Hofmann F (2005). "Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice." *Front Biosci* **10**: 1279-1289.
- Scotcher J, Prysyzhna O, Boguslavskiy A, Kistamas K, Hadgraft N, Martin ED, Worthington J, Rudyk O, Rodriguez Cutillas P, Cuello F, Shattock MJ, Marber MS, Conte MR, Greenstein A, Greensmith DJ, Venetucci L, Timms JF, Eaton P (2016). "Disulfide-activated protein kinase G I α regulates cardiac diastolic relaxation and fine-tunes the Frank-Starling response." *Nat Commun* **7**: 13187.
- Sechi AS, Wehland J (2004). "ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics." *Front Biosci* **9**: 1294-1310.
- Sha X, Isbell TS, Patel RP, Day CS, King SB (2006). "Hydrolysis of acyloxy nitroso compounds yields nitroxyl (HNO)." *J Am Chem Soc* **128**(30): 9687-9692.
- Sharina IG, Martin E (2017). "The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Expression and Splicing of Nitric Oxide Receptor." *Antioxid Redox Signal* **26**(3): 122-136.
- Sharma AK, Zhou GP, Kupferman J, Surks HK, Christensen EN, Chou JJ, Mendelsohn ME, Rigby AC (2008). "Probing the interaction between the coiled coil leucine zipper of cGMP-

- dependent protein kinase I α and the C terminus of the myosin binding subunit of the myosin light chain phosphatase." *J Biol Chem* **283**(47): 32860-32869.
- Sharma R, Kim JJ, Qin L, Henning P, Akimoto M, VanSchouwen B, Kaur G, Sankaran B, MacKenzie KR, Melacini G, Casteel DE, Herberg FW, Kim C (2022). "An auto-inhibited state of protein kinase G and implications for selective activation." *Elife* **11**.
- Sheehe JL, Bonev AD, Schmoker AM, Ballif BA, Nelson MT, Moon TM, Dostmann WR (2018). "Oxidation of cysteine 117 stimulates constitutive activation of the type I α cGMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **293**(43): 16791-16802.
- Shoman ME, DuMond JF, Isbell TS, Crawford JH, Brandon A, Honovar J, Vitturi DA, White CR, Patel RP, King SB (2011). "Acyloxy nitroso compounds as nitroxyl (HNO) donors: kinetics, reactions with thiols, and vasodilation properties." *J Med Chem* **54**(4): 1059-1070.
- Sivakumaran V, Stanley BA, Tocchetti CG, Ballin JD, Caceres V, Zhou L, Keceli G, Rainer PP, Lee DI, Huke S, Ziolo MT, Kranias EG, Toscano JP, Wilson GM, O'Rourke B, Kass DA, Mahaney JE, Paolocci N (2013). "HNO enhances SERCA2a activity and cardiomyocyte function by promoting redox-dependent phospholamban oligomerization." *Antioxid Redox Signal* **19**(11): 1185-1197.
- Smith BC, Underbakke ES, Kulp DW, Schief WR, Marletta MA (2013). "Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(38): E3577-3586.
- Somlyo AP, Somlyo AV (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." *Physiol Rev* **83**(4): 1325-1358.
- Sorescu D, Griendling KK (2002). "Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure." *Congest Heart Fail* **8**(3): 132-140.
- Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH (2006). "Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels." *J Clin Invest* **116**(9): 2552-2561.
- Stubbert D, Prysyazhna O, Rudyk O, Scotcher J, Burgoyne JR, Eaton P (2014). "Protein kinase G I α oxidation paradoxically underlies blood pressure lowering by the reductant hydrogen sulfide." *Hypertension* **64**(6): 1344-1351.
- Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE (1991). "Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation." *Hypertension* **17**(6 Pt 1): 723-732.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME (1999). "Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α ." *Science* **286**(5444): 1583-1587.
- Swain L, Kesemeyer A, Meyer-Roxlau S, Vettel C, Zieseniss A, Güntsch A, Jatho A, Becker A, Nanadikar MS, Morgan B, Dennerlein S, Shah AM, El-Armouche A, Nikolaev VO, Katschinski DM (2016). "Redox Imaging Using Cardiac Myocyte-Specific Transgenic Biosensor Mice." *Circ Res* **119**(9): 1004-1016.
- Szczepanska-Sadowska E, Wsol A, Cudnoch-Jedrzejewska A, Żera T (2021). "Complementary Role of Oxytocin and Vasopressin in Cardiovascular Regulation." *Int J Mol Sci* **22**(21).

- Takio K, Wade RD, Smith SB, Krebs EG, Walsh KA, Titani K (1984). "Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families." *Biochemistry* **23**(18): 4207-4218.
- Thomas SR, Witting PK, Drummond GR (2008). "Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* **10**(10): 1713-1765.
- Thoonen R, Giovanni S, Govindan S, Lee DI, Wang GR, Calamaras TD, Takimoto E, Kass DA, Sadayappan S, Blanton RM (2015). "Molecular Screen Identifies Cardiac Myosin-Binding Protein-C as a Protein Kinase G- α Substrate." *Circ Heart Fail* **8**(6): 1115-1122.
- Thunemann M, Fomin N, Krawutschke C, Russwurm M, Feil R (2013a). "Visualization of cGMP with cGi biosensors." *Methods Mol Biol* **1020**: 89-120.
- Thunemann M, Wen L, Hillenbrand M, Vachaviolos A, Feil S, Ott T, Han X, Fukumura D, Jain RK, Russwurm M, de Wit C, Feil R (2013b). "Transgenic mice for cGMP imaging." *Circ Res* **113**(4): 365-371.
- Titze J, Luft FC (2017). "Speculations on salt and the genesis of arterial hypertension." *Kidney Int* **91**(6): 1324-1335.
- Tocchetti CG, Wang W, Froehlich JP, Huke S, Aon MA, Wilson GM, Di Benedetto G, O'Rourke B, Gao WD, Wink DA, Toscano JP, Zaccolo M, Bers DM, Valdivia HH, Cheng H, Kass DA, Paolocci N (2007). "Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling." *Circ Res* **100**(1): 96-104.
- Trautsch I, Heta E, Soong PL, Levent E, Nikolaev VO, Bogeski I, Katschinski DM, Mayr M, Zimmermann WH (2019). "Optogenetic Monitoring of the Glutathione Redox State in Engineered Human Myocardium." *Front Physiol* **10**: 272.
- Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, de Jonge HR (1996). "N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II." *J Biol Chem* **271**(12): 7025-7029.
- van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FW, Niessen HW, Paulus WJ (2012). "Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction." *Circulation* **126**(7): 830-839.
- Veal EA, Day AM, Morgan BA (2007). "Hydrogen peroxide sensing and signaling." *Mol Cell* **26**(1): 1-14.
- Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, Benetos A, Biffi A, Boavida JM, Capodanno D, Cosyns B, Crawford C, Davos CH, Desormais I, Di Angelantonio E, Franco OH, Halvorsen S, Hobbs FDR, Hollander M, Jankowska EA, Michal M, Sacco S, Sattar N, Tokgozoglu L, Tonstad S, Tsioufis KP, van Dis I, van Gelder IC, Wannan C, Williams B (2021). "2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice." *Eur Heart J* **42**(34): 3227-3337.
- Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, Macdonald BA, Gibson RR, Trewhella J (2003). "Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2380-2385.
- Warner TD, Mitchell JA, Sheng H, Murad F (1994). "Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation." *Adv Pharmacol* **26**: 171-194.

- Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, Schulz E, Wickramanayake JM, Müller J, Schuhmacher S, Hortmann M, Baldus S, Gori T, Brandes RP, Münzel T, Daiber A (2008). "First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction." *Antioxid Redox Signal* **10**(8): 1435-1447.
- Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989). "The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase." *FEBS Lett* **251**(1-2): 191-196.
- Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdodi F, Ma C, Borman MA, Hartshorne DJ, Haystead TA (2004). "Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides." *J Biol Chem* **279**(33): 34496-34504.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL (1996). "Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6770-6774.
- Yao Q, Huang Y, Liu AD, Zhu M, Liu J, Yan H, Zhang Q, Geng B, Gao Y, Du S, Huang P, Tang C, Du J, Jin H (2016). "The vasodilatory effect of sulfur dioxide via SGC/cGMP/PKG pathway in association with sulfhydryl-dependent dimerization." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **310**(11): R1073-1080.
- Yao X, Garland CJ (2005). "Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels." *Circ Res* **97**(9): 853-863.
- Yap C, Mieremet A, de Vries CJM, Micha D, de Waard V (2021). "Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4)." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **41**(11): 2693-2707.
- Zhang DX, Gauthier KM, Campbell WB (2004). "Acetylcholine-induced relaxation and hyperpolarization in small bovine adrenal cortical arteries: role of cytochrome P450 metabolites." *Endocrinology* **145**(10): 4532-4539.
- Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW (2015). "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS." *J Pharmacol Sci* **129**(2): 83-94.
- Zhou B, Collaborators (2021). "Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants." *Lancet* **398**(10304): 957-980.
- Zhou B, Perel P, Mensah GA, Ezzati M (2021). "Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension." *Nat Rev Cardiol* **18**(11): 785-802.
- Zhu G, Groneberg D, Sikka G, Hori D, Ranek MJ, Nakamura T, Takimoto E, Paolucci N, Berkowitz DE, Friebe A, Kass DA (2015). "Soluble guanylate cyclase is required for systemic vasodilation but not positive inotropy induced by nitroxyl in the mouse." *Hypertension* **65**(2): 385-392.
- Zweier JL, Chen CA, Druhan LJ (2011). "S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling." *Antioxid Redox Signal* **14**(10): 1769-1775.

II. Danksagung

Die Danksagung wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Danksagung

III. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

IV. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: